



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

TESIS DOCTORAL

**TRATAMIENTO A PRESIÓN E HIDRÓLISIS
DEL HUESO DE ACEITUNA. FERMENTACIÓN
DE HIDROLIZADOS CON *PACHYSOLEN
TANNOPHILUS***

**PRESENTADA POR:
MARWA SALEH**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. SEBASTIÁN SÁNCHEZ VILLASCLARAS
DR. D. MANUEL CUEVAS ARANDA**

JAÉN, 6 DE MARZO DE 2014

ISBN 978-84-8439-970-4

Tratamientos a presión e hidrólisis del hueso de aceituna. Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen tannophilus*

Esta memoria constituye la Tesis Doctoral y se presenta a la Comisión Evaluadora en Jaén a 5 de febrero de 2014.

Fdo. Marwa Saleh

Sebastián Sánchez Villasclaras, Catedrático de Ingeniería Química del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén.

Como Tutor de Dña. Marwa Saleh en la Tesis de Doctorado “Tratamientos a presión e hidrólisis del hueso de aceituna. Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen tannophilus*” durante el periodo 2009-2014.

INFORMA: Que la presente Tesis de Doctorado *Tratamientos a presión e hidrólisis del hueso de aceituna. Fermentación de hidrolizados con Pachysolen tannophilus* ha sido realizada por la Licenciada Dña. Marwa Saleh en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén, bajo la dirección de los Dres. D. Sebastián Sánchez Villasclaras y D. Manuel Cuevas Aranda.

Jaén, febrero de 2014

Fdo. Sebastián Sánchez Villasclaras

*Catedrático de Universidad
Ingeniería Química*

Fdo. Manuel Cuevas Aranda

*Profesor Contratado Doctor
Ingeniería Química*

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una beca para estudios de postgrado de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID), y a la financiación obtenida de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, de la Junta de Andalucía, en el marco del Proyecto de Investigación de Excelencia AGR-6509 titulado “Producción de biocombustibles utilizando hueso de aceituna y residuo de poda de olivar”.

Agradezco profundamente,

*A mis directores, D. Manuel Cuevas y
D. Sebastián Sánchez, quienes con su dedicación, consejos
y enseñanzas, hicieron posible la realización de este trabajo.*

*A mi Marido, Mohammed Saleh quien es mi mayor motivación
A mis padres, Nabeel y Amal, quienes son
mi mayor apoyo en el logro de mis objetivos
personales y profesionales.*

*A mis hermanos Ahmed, Maryam, Manal y Israa
A mi amiga Nadya Benavides por su ayuda.*

*A mis demás familiares y amigos,
por la confianza que siempre han depositado en mí.*

Marwa Saleh

ÍNDICE

Tesis de doctorado
*Tratamientos a presión e hidrólisis del hueso de aceituna.
Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen tannophilus**

1.	RESUMEN y OBJETIVOS	1
1.1	Resumen.....	3
1.2	Objetivos.....	7
2.	INTRODUCCIÓN	11
2.1	Situación energética actual.....	13
2.2	La biomasa como fuente de energía y de productos químicos	15
2.2.1	Biomasa agrícola en España	16
2.2.2	Hueso de aceituna	18
2.2.2.1	<i>Caracterización físico-química del hueso de aceituna</i>	20
2.2.2.2	<i>Vías de aprovechamiento para el hueso de aceituna</i>	22
2.3	Procesos de hidrólisis.....	25
2.3.1	Pretratamiento	25
2.3.1.1	<i>Pretratamientos físicos</i>	26
2.3.1.2	<i>Pretratamientos químicos</i>	26
2.3.1.3	<i>Pretratamientos físico-químicos</i>	28
2.3.2	Hidrólisis enzimática	30
2.4	Acondicionamiento de hidrolizados.....	37
2.5	Fermentación.....	41
3.	PARTE EXPERIMENTAL	45
3.1	Materiales.....	47
3.1.1	Materia prima.....	47
3.1.2	Enzimas.....	47
3.1.3	Levadura	47
3.1.4	Reactivos químicos y ‘kits’ de análisis	47

3.2	Métodos analíticos	51
3.2.1	Caracterización de los residuos sólidos	51
3.2.1.1	<i>Humedad y materia volátil</i>	51
3.2.1.2	<i>Fibra Neutro Detergente (FND)</i>	51
3.2.1.3	<i>Fibra Ácido Detergente (FAD)</i>	52
3.2.1.4	<i>Lignina</i>	53
3.2.1.5	<i>Cenizas</i>	53
3.2.2	Caracterización de los hidrolizados líquidos	54
3.2.2.1	<i>Medida de pH</i>	54
3.2.2.2	<i>Método de Miller para la determinación de ART</i>	54
3.2.2.3	<i>Método enzimático para la determinación de D-glucosa</i>	55
3.2.2.4	<i>Detección amperométrica de carbohidratos y 5-hidroximetilfurfural (5-HMF)</i>	56
3.2.2.5	<i>Método para la determinación de ácido acético</i>	56
3.2.2.6	<i>Contenido de oligosacáridos</i>	58
3.2.3	Caracterización en el transcurso de la fermentación.....	58
3.2.3.1	<i>Biomasa</i>	58
3.2.3.2	<i>Sustratos</i>	59
3.2.3.3	<i>Etanol</i>	59
3.2.3.4	<i>Xilitol</i>	60
3.3	Instalaciones experimentales.....	63
3.3.1	Trituración y tamizado de sólidos.....	63
3.3.2	Reactor a presión para hidrólisis a alta temperatura	63
3.3.3	Equipo para la post-hidrólisis	64
3.3.4	Acondicionamiento del hidrolizado.....	64
3.4	Procedimiento experimental	65
3.4.1	Tratamiento a presión	65
3.4.2	Severidades de tratamiento	65

3.4.3 Metodología de superficies de respuesta	69
3.4.4 Hidrólisis enzimática	70
3.4.5 Fermentación	71
3.4.5.1 Precultivo en medio sólido	72
3.4.5.2 Inóculo líquido.....	72
3.4.5.3 Medio de cultivo	73
3.4.5.4 Preparación y comienzo del bioproceso.....	73
3.4.5.5 Desarrollo y finalización del bioproceso	74
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
4.1 Caracterización del hueso de aceituna	77
4.2 Pretratamiento (PT).....	79
4.2.1 Estudios previos de hidrólisis a presión con agua y ácidos sulfúrico y nítrico.....	79
4.2.1.1 Caracterización del residuo sólido para la serie PT1	80
4.2.1.2 Caracterización del hidrolizado líquido para la serie PT1.....	83
4.2.1.2.1 Hidrolizado líquido obtenido con agua ultrapura.....	83
4.2.1.2.2 Hidrolizado líquido obtenido con disoluciones diluidas de ácidos sulfúrico y nítrico	86
4.2.2 Optimización de la hidrólisis con ácido sulfúrico. Influencia de la temperatura y el tiempo de hidrólisis.....	89
4.2.2.1 Caracterización del residuo sólido para la serie PT2.....	90
4.2.2.2 Caracterización del hidrolizado líquido para la serie PT2.....	93
4.2.2.3 Caracterización del residuo sólido para la serie PT3.....	95
4.2.2.4 Caracterización del hidrolizado líquido para la serie PT3.....	99
4.2.3 Optimización de la hidrólisis con ácido sulfúrico. Influencia de la concentración de ácido y la carga de hueso (PT4).....	104
4.2.3.1 Caracterización del residuo sólido.....	105
4.2.3.2 Caracterización del hidrolizado líquido.....	107
4.2.4 Estudios previos de hidrólisis a presión con agua y ácidos sulfúrico y nítrico.....	110

4.2.4.1 Caracterización del residuo sólido.....	110
4.2.4.2 Caracterización del hidrolizado líquido.....	111
4.3 Hidrólisis enzimáticas (HE).....	113
4.3.1 Hidrólisis del sólido pretratado. Influencia de la carga de enzima (HE1).....	113
4.3.2 Hidrólisis del sólido pretratado. Efecto de la temperatura de pretratamiento (HE2).....	115
4.3.3 Hidrólisis del sólido pretratado. Influencia del tamaño de partícula (HE3)	117
4.3.4 Hidrólisis conjunta de sólido pretratado e hidrolizado líquido (HE4).....	121
4.4 Fermentación de hidrolizados (FE).....	123
4.4.1 Fermentación del prehidrolizado ácido OPT-PT2 (FE1).....	125
4.4.2 Fermentación del prehidrolizado ácido OPT-PT3 (FE2).....	128
4.4.3 Fermentación de hidrolizados enzimáticos (FE3)	133
4.5 Proceso completo de transformación. Balances de materia	137
5. CONCLUSIONES	139
6. NOMENCLATURA	149
7. BIBLIOGRAFÍA	155
8. APÉNDICE.....	175
9. CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS	231

1. RESUMEN Y OBJETIVOS

Tesis de doctorado

*Tratamientos a presión e hidrólisis del hueso de aceituna.
Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen tannophilus**

1.1 Resumen

El trabajo que se describe en esta Memoria forma parte de la línea de investigación aplicada del Grupo de Investigación “Bioprocesos” (TEP-138, Junta de Andalucía) sobre aprovechamiento de biomásas lignocelulósicas, y ha sido llevado a cabo en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén.

La biomasa vegetal es una fuente potencial de gran magnitud, y carácter renovable, para la obtención de energía y productos químicos diversos. Cada región del planeta deberá estudiar las mejores fórmulas de aprovechamiento de sus recursos biomásicos locales. En este sentido, en España, Andalucía y Jaén es necesario realizar estudios para lograr la mejor valorización de los materiales lignocelulósicos derivados del olivar, ya que es el cultivo arbóreo que ocupa mayor superficie en estos territorios. El olivar andaluz proporciona, además de aceite de oliva, subproductos entre los que destacan el material de poda, orujos de aceituna, orujillos y huesos de aceituna.

La transformación bioquímica de los materiales lignocelulósicos se basa en aplicar una serie de etapas consecutivas que, en general, serían: pretratamiento, hidrólisis de polisacáridos, acondicionamiento de hidrolizados, proceso de fermentación y separación de bioproductos. Entre las diversas alternativas para la despolimerización de carbohidratos, el empleo de agua y ácidos diluidos a altas temperaturas permite la hidrólisis selectiva de la fracción de hemicelulosas preservando, en gran medida, la celulosa y la lignina del material original. El efecto concreto dependerá de cada biomasa y de las condiciones de hidrólisis, fundamentalmente temperatura, tiempo de reacción y concentración de ácido. Una vez recuperado el sólido tratado, que será rico en lignina y celulosa, éste podrá sufrir una segunda etapa de hidrólisis, basada en el empleo de ácidos o enzimas celulolíticas, para transformar la celulosa en D-glucosa. Las hidrólisis descritas pueden generar, además de carbohidratos fermentables, compuestos inhibidores de la acción microbiana, por lo que, con carácter práctico, es necesario fermentar los medios azucarados comprobando la capacidad metabólica de los microorganismos seleccionados para la obtención de bioproductos. El empleo de levaduras no tradicionales (*Pichia stipitis*, *Candida tropicalis*, *Pachysolen tannophilus*...) permitiría el aprovechamiento de hexosas (D-glucosa) y pentosas (D-xilosa), lo que resulta de interés a la hora de proceder al fraccionamiento industrial de los materiales lignocelulósicos.

El principal objetivo de la investigación fue analizar la utilización del hueso de aceituna como fuente de carbohidratos, etanol o xilitol. Para ello se aplicaron distintos métodos

hidrolíticos así como la fermentación de hidrolizados con la levadura no tradicional *P. tannophilus*.

La materia prima utilizada en este estudio, endocarpios fragmentados de aceituna procedentes de almazara, se caracteriza por su pequeño tamaño (inferior a 5 mm), su gran dureza (posiblemente como consecuencia del alto contenido de lignina) y por poseer un porcentaje de carbohidratos cercano al 55%. El material se secó en laboratorio antes de la realización de los ensayos.

Para el seguimiento de las pruebas experimentales, se han aplicado distintos métodos analíticos tanto a las muestras de biomasa sólida como a los hidrolizados líquidos. En el primer caso, los análisis se basaron en la determinación de humedad y materia volátil, celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas. Los hidrolizados se caracterizaron mediante cromatografía líquida (D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, oligosacáridos, 5-hidroxiacetilfurfural) o por métodos colorimétricos enzimáticos (D-glucosa y ácido acético). En relación a los procesos de fermentación, los parámetros adicionales calculados fueron: biomasa, etanol y xilitol.

En primer lugar, se comparó el efecto hidrolítico de tres medios (agua, ácido sulfúrico y ácido nítrico, ambos a una concentración de 0,025 M) trabajando en el rango de temperaturas 200–220°C. El tiempo de permanencia a la máxima temperatura fue de 0 minutos, y la relación Sólido/Líquido en el reactor se fijó en 1/6. Aunque los tres agentes de hidrólisis permitieron solubilizar la fracción de hemicelulosas de la materia prima, el ácido sulfúrico fue el mejor medio para la recuperación selectiva de D-xilosa, proporcionando un 18,1% de monosacárido a 210°C. Los análisis posteriores se centraron en el empleo de ácido sulfúrico.

La optimización de los procesos de hidrólisis ácidos a presión con ácido sulfúrico se llevó a cabo mediante el empleo de tres diseños factoriales del tipo 2^2 . Para una concentración fija de ácido sulfúrico existen unas condiciones de temperatura y tiempo de reacción que maximizan el rendimiento de D-xilosa en fase líquida (prehidrolizado). Así, para H_2SO_4 (0,010 M) los valores fueron 201°C y 5,2 min (20,1% D-xilosa), mientras que para H_2SO_4 (0,025 M) los valores fueron 195°C y 5 min (20,9% D-xilosa). Se comprobó cómo un incremento de la concentración de ácido hizo que el máximo de D-xilosa se alcanzara con tratamientos a menor temperatura.

En general, el incremento de la carga de sólido añadida al reactor de hidrólisis a presión (aumento de la relación Sólido/Líquido por encima de la 1/6) produjo descensos en el

rendimiento de D-xilosa. Sin embargo, la reducción se minimiza cuando la reacción es llevada a cabo manteniendo un porcentaje de ácido, respecto a peso seco de hueso, del 0,59%. De esta manera, se pudieron conseguir prehidrolizados con concentraciones de D-xilosa próximas a 100 g/L.

El estudio de la hidrólisis enzimática se centró en el uso, como sustrato, de los residuos sólidos ricos en lignina y celulosa procedentes de las hidrólisis ácidas. En esta fase de la investigación se comprobó como la esterilización, en autoclave, de los sólidos resultó muy negativa para la producción enzimática de D-glucosa. El incremento de la carga de enzimas celulolíticas ('Celluclast 1.5'), desde 0 hasta 60 UPF/g sólido, provocó un aumento considerable del rendimiento de D-glucosa; sin embargo, para cargas iguales o superiores a 40 UPF/g sólido el incremento en la digestibilidad enzimática se suavizó, por lo que ese valor parece ser el más idóneo a la hora de realizar los procesos de hidrólisis enzimática.

Las condiciones de hidrólisis ácida (temperatura máxima alcanzada) y el tamaño de partícula fueron otros dos factores que afectaron notablemente a la digestibilidad enzimática de la celulosa pretratada, por lo que estos dos factores fueron estudiados; el primero ensayando 6 temperaturas de hidrólisis ácida (en el rango 190–215°C); el segundo con sólidos de 4 tamaños: <0,125 mm, 0,125–0,300 mm, 0,425–0,600 mm, >1,6 mm.

La presencia de prehidrolizado, junto a los sólidos pretratados, fue otro factor que afectó al desarrollo de las hidrólisis enzimáticas. Se ha observado como los bioprocesos cuyo único sustrato es el sólido pretratado, limpio y seco, son más favorables que aquellos que trabajan con el conjunto "sólido pretratado-prehidrolizado".

La fermentación, con *P. tannophilus*, de los dos prehidrolizados ácidos que maximizan la producción de D-xilosa, trabajando con concentraciones de ácido sulfúrico 0,010 M y 0,025 M, se llevó a cabo de forma satisfactoria, aunque se necesitó reducir las concentraciones de inhibidores microbianos (ácido acético, 5-hidroxiacetilfurfural y furfural) mediante una etapa previa de detoxificación en rotavapor. Los bioprocesos estuvieron fuertemente condicionados por la concentración de inóculo en el rango 0,5–4,0 g/L. El xilitol fue el producto principal de estas fermentaciones, y su concentración máxima alcanzó 8,2 g/L, equivalente a un rendimiento de 0,44 g xilitol por gramo de D-xilosa consumida.

La fermentación de los líquidos generados por hidrólisis enzimática de los sólidos pretratados con ácido sulfúrico en las condiciones de pretratamiento para las que se maximizan

las producciones de D-xilosa, fue rápida (se completó, como máximo, en 24 h) para los cuatro inóculos de *P. tannophilus* ensayados (0,5, 1,0, 2,0 y 4,0 g/L). Los rendimientos en etanol fueron muy elevados, muy próximos al rendimiento teórico de Gay-Lussac (0,51 g etanol/g D-glucosa).

Al aplicar balances macroscópicos de materia sobre el conjunto de operaciones necesarias para la transformación del hueso de aceituna (hidrólisis ácida a presión, hidrólisis enzimática y proceso de fermentación), se obtuvo que a partir de 100 kg de materia prima (en base seca) fue posible, trabajando en las condiciones más favorables, producir 10,3 kg de etanol y 9,2 kg de xilitol.

1.2 Objetivos

El objeto principal de esta Tesis Doctoral es analizar la utilización de una biomasa abundante en la provincia de Jaén, el endocarpio del fruto del olivo, como fuente de carbohidratos, etanol o xilitol. Una ventaja del hueso de aceituna, respecto a otros materiales lignocelulósicos agrícolas, como la poda de olivar, es que éste se concentra en plantas industriales de transformación, ya sea de aceitunas (almazaras y empresas de encurtido) o de orujos (extractoras), lo que implica un abaratamiento de los costes de recogida y transporte de la biomasa. Para el aprovechamiento bioquímico de los materiales lignocelulósicos habitualmente se emplea un esquema de proceso con cuatro etapas básicas: pretratamiento del material, hidrólisis ácida o enzimática de los sólidos pretratados, acondicionamiento de hidrolizados y proceso de fermentación. El grupo de investigación “Bioprocesos” (TEP-138, Junta de Andalucía) ya ha realizado estudios de aprovechamiento bioquímico del hueso de aceituna, analizando el empleo de agua a alta temperatura como medio hidrolítico (Cuevas, 2007). Ahora se pretenden ampliar los conocimientos previos incorporando, en la etapa de pretratamiento, dos nuevos agentes de hidrólisis, como son el ácido sulfúrico y el ácido nítrico, ensayando nuevas enzimas comerciales para la despolimerización de la celulosa y fermentando (con *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691) tanto hidrolizados de pretratamientos ácidos como hidrolizados enzimáticos. Todo ello permitirá adquirir un conocimiento amplio del hueso de aceituna como fuente de bioproductos.

En la primera etapa del trabajo experimental se compararán los efectos hidrolíticos del agua y los ácidos sulfúrico y nítrico (0,025 M) al actuar sobre los polisacáridos de la materia prima en el intervalo de temperaturas 200-220°C utilizando un reactor discontinuo a presión. A continuación, los hidrolizados líquidos (prehidrolizados) y los sólidos pretratados se analizarán mediante la determinación de los siguientes parámetros:

En los prehidrolizados,

- Concentración de azúcares reductores totales.
- Concentración de D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa y D-galactosa.
- Concentración de 5-hidroximetilfurfural.
- Concentración de ácido acético.

En los sólidos pretratados,

- Humedad y materia volátil.
- Contenido en fibras (celulosa, hemicelulosas y lignina).
- Contenido en cenizas.

Se deberá seleccionar aquel medio que proporcione la conversión más alta de hemicelulosas a D-xilosa; es decir, que consiga los prehidrolizados más ricos en ese monosacárido. La hidrólisis deberá ser lo más selectiva posible, de manera que se consiga la eliminación total de hemicelulosas preservando, al mismo tiempo, la celulosa.

Posteriormente, una vez seleccionado el mejor medio para producir D-xilosa en la fase líquida, se optimizará la hidrólisis a alta temperatura del hueso en dicho medio. La optimización consistirá en encontrar las condiciones de operación que maximizan la recuperación de D-xilosa en el prehidrolizado. Para ello, los ensayos experimentales se organizarán de acuerdo a diseños factoriales, método de trabajo que permite modificar simultáneamente varias variables (factores) y determinar el efecto que produce en un parámetro determinado (respuesta). Se propone el empleo del software 'MODDE 6' para el análisis estadístico de datos. Las variables a estudiar serán:

- Máxima temperatura de hidrólisis.
- Tiempo de residencia a la máxima temperatura.
- Concentración de ácido.
- Relación Sólido/Líquido.

Una vez optimizada la recuperación de D-xilosa en el prehidrolizado, se estudiará la fermentación del mismo empleando la levadura no tradicional *P. tannophilus*. En esta etapa se prestará atención a dos cuestiones,

- a Necesidad de detoxificación del hidrolizado. Para ello se ensayará su tratamiento en rotavapor a vacío a distintos tiempos, y el efecto que ésta práctica produce en la concentración de inhibidores microbianos como ácido acético y 5-hidroximetilfurfural.
- b Influencia de la concentración inicial de biomasa (inóculo) en la fermentación. Para ello se ensayarán inóculos de levadura en el rango de concentración 0,5-4,0 g/L.

Los procesos de fermentación serán seguidos mediante la determinación experimental de las siguientes variables,

- concentración de biomasa,
- concentración de D-xilosa en el medio de cultivo,
- concentración de D-glucosa en el medio de cultivo,
- concentración de ácido acético en el medio de cultivo,

- concentración de etanol producido,
- concentración de xilitol obtenido,

lo que permitirá calcular parámetros de fermentación tales como rendimientos y productividades volumétricas instantáneas de bioproductos.

Los residuos sólidos que resultan de los pretratamientos que maximizan la recuperación de D-xilosa en los prehidrolizados serán medios con altos porcentajes de lignina y celulosa. Para seguir aprovechando la fracción celulósica que contienen, se estudiará su hidrólisis enzimática empleando celulasas y β -glucosidasas suministradas por la empresa 'Novo Nordisk Bioindustrial' (Madrid, España). En esta fase de la Tesis, se analizará el efecto de distintas variables en la producción de D-glucosa:

- temperatura de pretratamiento,
- tamaño de partícula,
- carga de enzimas,
- esterilización previa del residuo en autoclave y
- mezcla de sustratos sólidos con prehidrolizados líquidos.

Se deberán fijar las mejores condiciones de operación, en hidrólisis enzimática, para obtener hidrolizados ricos en D-glucosa.

Finalmente, se fermentarán los hidrolizados enzimáticos con *P. tannophilus* para determinar el rendimiento máximo de producción de etanol. Al igual que para las fermentaciones de hidrolizados ácidos, se ensayarán inóculos de levadura en el rango de concentración 0,5-4,0 g/L.

Los resultados obtenidos en esta investigación permitirán establecer las condiciones más favorables para la hidrólisis selectiva de la fracción de hemicelulosas del hueso de aceituna, así como para la conversión de D-xilosa a xilitol o etanol, mediante la levadura *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691. Por otra parte, para el proceso completo (pretratamiento–hidrólisis enzimática–fermentación) los rendimientos globales en bioproductos (etanol y xilitol) de las alternativas más viables quedarán expresados en forma de balances macroscópicos de materia.

2. INTRODUCCIÓN

Tesis de doctorado
*Tratamientos a presión e hidrólisis del hueso de aceituna.
Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen tannophilus**

2.1 Situación energética actual

El consumo de energía por habitante constituye uno de los indicadores más fiables del desarrollo económico de una sociedad. En este sentido, la demanda energética de un país se asocia, de forma generalizada, con su Producto Nacional Bruto (PNB), su capacidad industrial y el nivel de vida alcanzado por sus habitantes. En la actualidad, existen países desarrollados que consumen, per cápita, 40 veces más energía que otros no desarrollados. Mientras Europa, incluyendo la antigua URSS, con una población de 870 millones de habitantes, necesita anualmente 3.000 millones de toneladas equivalentes de petróleo (Mtep), África, con parecida población (831 millones), sólo requiere 400 Mtep (BP, 2013).

El consumo mundial de energía primaria se ha incrementado de forma considerable en las últimas décadas hasta superar los 12.000 Mtep/año en 2012. Esta cifra supone doblar los consumos globales calculados para la década de 1960. En el corto plazo, el consumo mundial de energía primaria aumentó un 1,8% en 2012 con respecto a 2011, dato que muestra como se están produciendo escaladas del parámetro incluso en momentos en los que importantes regiones del planeta se encuentran estancadas económicamente. Los crecimientos de la población mundial, y del número de personas que se instalarán en las denominadas “clases medias”, son factores que impulsarán, en el futuro, los consumos globales de energía (EIA, 2007).

En la actualidad, la Humanidad usa intensivamente ciertos recursos fósiles almacenados en la litosfera (petróleo, carbón, gas natural...) para la generación energética. El inconveniente de estos depósitos de carbono orgánico es que tienen carácter limitado, por lo que su sobreexplotación conducirá a su agotamiento y al consiguiente incremento del precio de la energía. Hoy en día, el petróleo ocupa la primera posición en el escafón de producción energética con 4.130 Mtep consumidas en 2012 (BP, 2013), seguido de cerca por el carbón. El gas natural ocupa la tercera posición con 2.990 Mtep consumidas en 2012. En el mercado de la energía también existen fuentes de tipo renovable (por tanto, de carácter ilimitado) como hidráulica, eólica, biomasa, solar-termica, solar-fotovoltaica, maremotriz, geotérmica... que, sin embargo, suponen un bajo porcentaje, inferior al 10%, del total producido. Algunos problemas de estas tecnologías son el no garantizar una generación estable de energía (ya que ésta sólo es posible bajo ciertas condiciones climatológicas), los bajos rendimientos y su carácter local. Esta última característica hace que cada país, cada región, deba investigar sobre sus capacidades de producción de energía limpia, inclinándose por aquellas alternativas que sean más viables económicamente.

Por otra parte, el incremento de los consumos energéticos ha traído consigo impactos a nivel ambiental. La contaminación atmosférica es una realidad, cada vez más evidente, ligada al crecimiento económico mundial. Las principales vías de contaminación atmosférica proceden de la combustión de recursos fósiles en el sector industrial y del transporte, así como en los hogares, lo que genera dióxido y monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno y azufre, partículas, etc. La concentración de dióxido de carbono en la atmósfera ha aumentado de forma alarmante en los últimos 150 años, y se prevé que su incremento sea aún mayor en los próximos años, lo que intensificará el efecto invernadero y, con él, el aumento de la temperatura media del planeta (Greenpeace, 2009).

En definitiva, la enorme demanda mundial de energía, su posible incremento en el corto y medio plazo, la preocupante dependencia de la Humanidad a recursos energéticos de carácter limitado y los efectos negativos en el medioambiente de los gases producto de la generación energética convencional son hechos que crean gran incertidumbre en el horizonte económico y ecológico mundial. Por ello, es imprescindible investigar sobre fuentes energéticas renovables, haciendo hincapié en aquellas que tengan mayor potencial en cada zona geográfica.

2.2 La biomasa como fuente de energía y de productos químicos

El término “biomasa” hace referencia a cualquier tipo de materia orgánica, terrestre o acuática, animal o vegetal, generada por transformaciones biológicas ocurridas en un pasado inmediato. A partir de la definición, los combustibles fósiles no deben ser considerados “biomasa” debido a que, aunque son compuestos orgánicos originados mediante procesos con raíz biológica, su génesis se prolongó a lo largo de millones de años.

La biomasa vegetal es aquella producida mediante las reacciones propias de la fotosíntesis, es decir, el conjunto de reacciones capaz de almacenar energía solar en forma de energía química; energía contenida en los enlaces químicos de polisacáridos, ligninas y otras estructuras orgánicas presentes en las plantas. Se ha estimado que nuestro planeta almacena alrededor de $4 \cdot 10^{18}$ kJ en forma de biomasa vegetal (Fischer y Schrattenholzer, 2001). Además, los ritmos de crecimiento de este recurso son lo suficientemente grandes, $1,46 \cdot 10^{11}$ t/año (Demirbaş, 2002), como para considerarlo una poderosa fuente de carbono orgánico.

El uso de la biomasa vegetal no es reciente. Desde tiempos remotos las maderas se han empleado como materiales de construcción y, sufriendo reacción química, también para proporcionar calor. La combustión de la leña es, posiblemente, la primera conversión química llevada a cabo conscientemente por el hombre. Posteriormente, la celulosa se aprovechó para fabricar papel, y del aguarrás de la madera se obtuvieron adhesivos, saborizantes y fragancias. En la primera mitad del siglo XX se aplicó hidrólisis ácida sobre maderas para obtener azúcares simples y, con ellos, vía fermentativa, etanol que fue usado para accionar motores de combustión interna durante la Segunda Guerra Mundial. La crisis energética iniciada en 1973 renovó el interés por la conversión de la celulosa hasta etanol. La posibilidad de sintetizar este alcohol más rápidamente partiendo de recursos alimenticios tales como maíz, bagazo de la caña de azúcar o distintos tipos de cereales ha incrementado, en ciertos momentos y en ciertos lugares, los precios de los alimentos, lo cual ha suscitado un gran debate social centrado en la necesidad de desligar la producción de biocarburantes (bioetanol y biodiesel) de aquellos materiales que tengan valor alimentario, para basarla en sustratos sin interés nutricional o, aún mejor, de naturaleza residual.

En los últimos años se ha ampliado el abanico de productos generados a partir de biomasa vegetal: oligosacáridos, antioxidantes naturales, xilitol, arabitol, etc. El xilitol es un compuesto con gran interés comercial (Martínez et al., 2012). Es un edulcorante que no provoca problemas sobre la salud dental del consumidor y, además, puede ser usado como fuente viable de azúcares para diabéticos. Su calor de disolución hace que en la boca genere una sensación de frescor muy

valorada por los fabricantes de chicles, helados y bebidas refrescantes (Sánchez et al., 2008). En la actualidad, la mayor parte del xilitol se sintetiza por vía química, lo que implica trabajar a altas presiones (por encima de 50 atm), a temperaturas de 80-140°C y con catalizadores caros (aleaciones Ni-Raney). La producción biotecnológica de xilitol es una alternativa cada vez más atractiva frente a la ruta química.

Por tanto, y a diferencia de otras fuentes de energía renovable, la biomasa presenta la gran ventaja de poder proveer varios tipos de productos, no sólo energéticos como electricidad y biocarburantes, también compuestos con interés alimentario, farmacéutico o químico. Esta capacidad podría hacer que, en el futuro, las industrias basadas en la biomasa verde se conviertan en verdaderas biorefinerías.

2.2.1 Biomasa agrícola en España

España dispone de una importante cantidad de residuos biomásicos debido a su gran extensión agrícola y forestal, por lo que habría que incentivar activamente la investigación sobre sus posibilidades de uso. Según Ericsson y Nilsson (2006), el país ocupaba el cuarto puesto, dentro de la Europa “de los quince”, en superficie forestal (alrededor de 10 Mha) y el segundo en superficie agrícola (30 Mha). Sin embargo, también es verdad que se vislumbran incertidumbres respecto a este aprovechamiento ya que si, por un lado, la tasa de radiación solar que se recibe (1.200-1.800 kWh/(m² año), García, 2006) es muy favorable para el crecimiento de las plantas, por otro, los pobres regímenes pluviométricos de amplias zonas de la península Ibérica, sobre todo del Sureste, representan una rémora a tener en cuenta.

En España se generan unos 27 millones de toneladas anuales de residuos de cultivos agrícolas (Cuadros, 2008). Los residuos originados en la poda de árboles frutales representan algo más del 58% del total, con 15,7 millones de toneladas anuales. Dentro de este apartado, Castilla-La Mancha y Andalucía suman 8,8 Mt/año, lo que supone más del 50% nacional. En estas zonas geográficas, la vid y el olivo suponen el 83% del capítulo, es decir, 7,3 Mt/año. Solamente Ciudad Real y Toledo producen el 35% de los residuos españoles de la vid, y Jaén y Córdoba concentran el 35% de las biomásas procedentes del olivar. Rosúa y Pasadas (2012) cuantificaron, por comunidades autónomas, la biomasa generada en España en los cultivos de álamo, árboles frutales, olivos y vid, concluyendo que alrededor del 50% de esa biomasa se generaba en Andalucía y Castilla-La Mancha. El potencial total de biomasa de Andalucía, cuantificado por la Agencia Andaluza de la Energía, fue de 3.958 ktep/año en 2010 (AAE, 2011). En la Figura 2.1 se muestra la generación biomásica por tipo de procedencia. Se puede destacar cómo la Comunidad Autónoma Andaluza cuenta con una importante generación de

biomasas industriales (26% del total) derivadas, fundamentalmente, del sector agroalimentario, principalmente industrias del olivar. Sevilla y Jaén son las provincias andaluzas con mayor potencial biomásico, destacando nuevamente el procedente del olivar, un 38% del potencial total según se muestra en la Figura 2.2. En definitiva, el olivar es la fuente de materiales lignocelulósicos más importante del sur de España, Andalucía y Jaén.

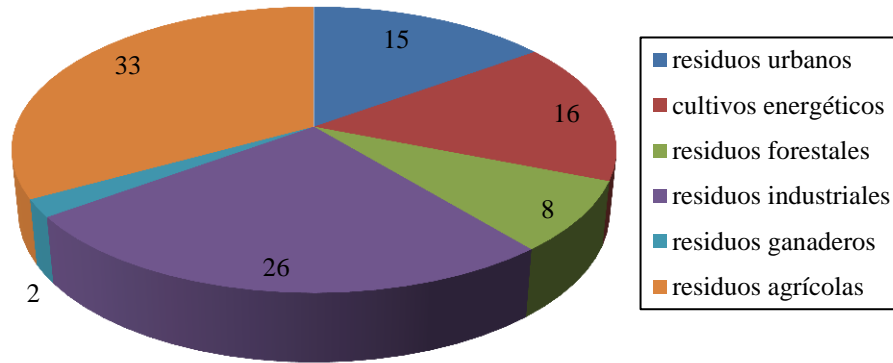


Figura 2.1 Distribución (%) de los tipos de biomasa en Andalucía. Fuente: AAE (2011)

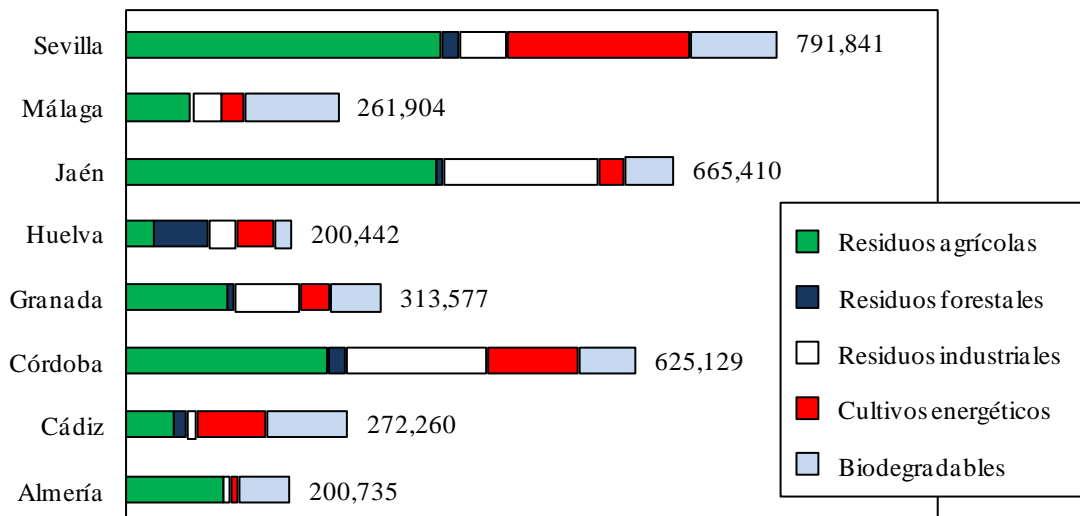


Figura 2.2 Desglose provincial del potencial total de biomasa en Andalucía en 2003 (ktep/año). Fuente: SODEAN, S.A. (2003)

El olivo (*Olea europea* L.) es el árbol característico de la cuenca mediterránea. Desde las costas libanesas hasta las españolas, desde Croacia hasta Túnez, un manto verde de olivos extiende su presencia a lo largo y ancho de los bordes bañados por el *Mare Nostrum*. El fruto del olivo, la aceituna, es una drupa con alto contenido en aceite. El aceite de oliva es un alimento procesado y consumido desde hace miles de años y, hoy por hoy, sus características nutricionales, organolépticas y de salud hacen que sea una de las grasas vegetales más

apreciadas. En el caso español y andaluz, el olivo adquiere una relevancia que sobrepasa, con creces, los aspectos meramente económicos para alcanzar influencias en el campo ambiental y paisajístico, o en el social y cultural. El olivar andaluz, con sus casi $1,5 \cdot 10^6$ ha de extensión, ocupa el 16% de la Comunidad Autónoma, mientras que en la provincia de Jaén se ha convertido en un auténtico monocultivo que cubre el 85% de su superficie agrícola. Aunque el principal producto derivado del olivar es la aceituna y su zumo oleoso, es evidente que la gestión agrícola del cultivo lleva a la producción de importantes cantidades de podas y, con ellas, tanto de maderas de diverso diámetro como de hojas. Por otra parte, el procesamiento de la aceituna en las almazaras genera dos grandes subproductos como son los endocarpios fragmentados (procedentes del separador de pulpa y hueso) y los orujos húmedos de dos fases. Cada uno de los cuatro materiales antes nombrados (maderas, hojas, endocarpios y orujos) presentarán distintas composiciones y propiedades físico-químicas (Tabla 2.1), por lo que generalmente son destinados a usos diferentes.

Tabla 2.1 Características físico-químicas de los subproductos del olivar

	Poda		Orujo	Hueso
	(1)	(2)	(1)	(1)
Análisis elemental (% peso)				
Carbono	49,5	49,0	47,0	50,8
Hidrógeno	5,9	6,1	5,6	6,0
Nitrógeno	0,4	0,5	1,0	0,5
Azufre	< 0,1	0,1	0,1	0,0
Oxígeno	44,2	44,3	46,3	42,7
Poder calorífico (kcal kg⁻¹)				
Superior	4.600	4.334	4.500	4.800
Inferior	4.300	-	4.250	4.500

(1) SODEAN, 1999

(2) Rojas et al., 1992

2.2.2 Hueso de aceituna

Tal y como se muestra en la Figura 2.3, el fruto del olivo se puede dividir, estructuralmente, en cuatro regiones (Nefzaoui, 1983; Bianchi, 2003):

1. Piel, también llamada epicarpio, y que representa entre el 1,0 y el 3,0% del peso de la drupa. La piel contiene compuestos como clorofilas, carotenoides, antocianinas, etc.
2. La pulpa, denominada mesocarpio, supone entre un 70 y un 80% del peso total del fruto. Es, por tanto, la parte mayoritaria de la aceituna y se utiliza como fuente de reserva de todos los componentes.

3. El endocarpio (18-22% del peso de la aceituna) es la cápsula lignocelulósica que protege a la región más interna del fruto, la semilla (4). Esta última región viene a representar entre el 2,2 y el 5,5% del peso total del fruto. Hay que destacar el elevado peso del endocarpio en relación al del resto de estructuras.

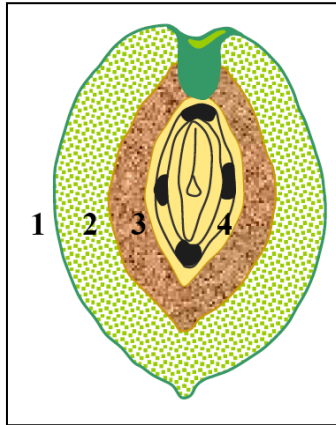


Figura 2.3 Estructura interna de la aceituna

Según los datos de la Agencia Andaluza de la Energía, Andalucía dispone de $1,4 \cdot 10^6$ ha de olivar que produjeron, según los datos de la campaña 2008-2009, $4 \cdot 10^6$ t de aceitunas. De esta cantidad, $3,7 \cdot 10^6$ t fueron destinadas a almazara para la extracción de $0,8 \cdot 10^6$ t de aceite de oliva y la recuperación (en las separadoras de pulpa y hueso) de $0,37 \cdot 10^6$ t de huesos triturados. Por otro lado, $0,3 \cdot 10^6$ t de fruto fueron llevadas a industrias de aderezo de aceitunas de mesa que, a su vez, generaron unos $2,2 \cdot 10^4$ t de hueso entero (AAE, 2008). Se podría decir que las cantidades teóricas máximas de hueso, para Andalucía, se situarían alrededor de $0,8 \cdot 10^6$ t/año.

Los endocarpios de aceituna pueden obtenerse tanto en almazaras como en industrias de encurtido y extractoras de aceite de orujo. En la Figura 2.4 se observan los posibles tratamientos que pueden sufrir los orujos grasos húmedos procedentes de almazara. Las tres vías de aprovechamiento más interesantes son: secado y extracción del aceite residual en extractoras de hexano (con separación previa del hueso o sin ella), combustión del orujo para cogeneración de electricidad y vapor y, finalmente, compostaje. Sólo el primer camino permitiría disponer de huesos para su comercialización, que derivarían del deshuesado, en húmedo, del orujo o de una separación neumática a partir de orujillos.

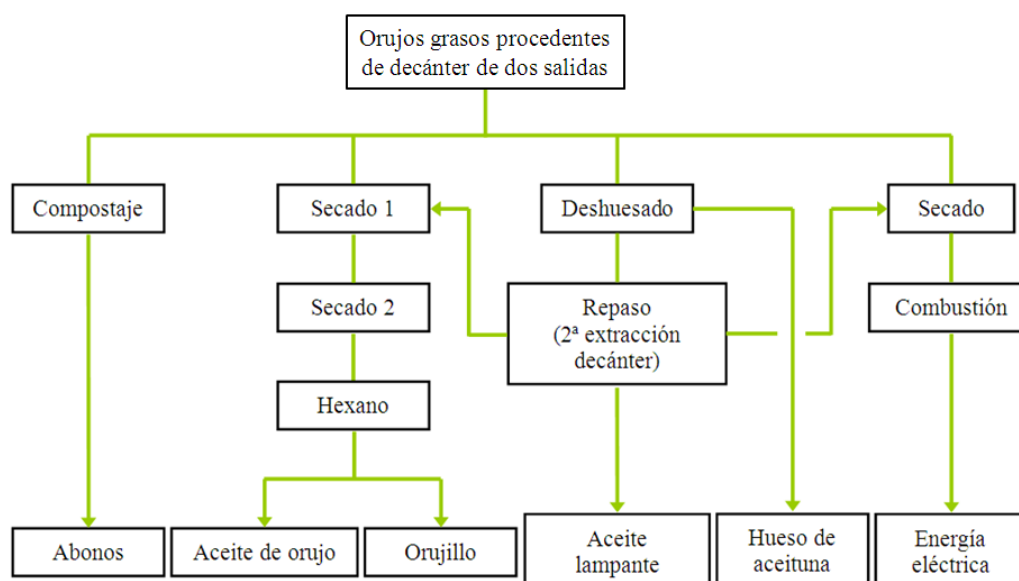


Figura 2.4 Sistemas de valorización de orujos procedente de decánter de dos salidas (Cuevas, 2007)

2.2.2.1 Caracterización físico-química del hueso de aceituna

El hueso de aceituna ha sido analizado, con frecuencia, desde el punto de vista del análisis elemental. En la Tabla 2.2 aparecen algunos datos extraídos de la bibliografía, detectándose un elevado contenido de carbono y oxígeno, y un porcentaje muy bajo de azufre. Los componentes mayoritarios de las cenizas generadas por calcinación de huesos son SiO₂ y CaCO₃.

Tabla 2.2 Análisis elemental del hueso de aceituna

Composición, % (base seca)					Referencia
C	O	H	N	S	
52,8	38,3	6,7	0,5	0,1	Jenkin et al., 1998
51,5	43,1	6,1	0,1	0,1	Blanco et al., 2002
46,5	n.d.	6,4	0,4	0,0	González et al., 2004
51,1	39,9	6,6	2,1	0,2	Taralas y Kontominas, 2005
51,6	38,8	8,5	1,1	0,0	Skodras et al., 2006
52,3	40,5	7,1	0,0	<0,1	Blázquez et al., 2009
49,6	-	7,1	1,5	0,1	El Bakouri et al., 2009
50,8	42,7	7,1	0,5	0,0	Ben Driss, 2010

Respecto a la composición molecular de los endocarpios de aceituna se observa, por un lado, las escasas fuentes que tratan el tema y, por otro, la diversidad de valores encontrados en la

literatura científica. Esto último podría deberse a cuestiones tales como el uso de distintas variedades de fruto, cambios en las condiciones climáticas de las campañas y de los cultivos, forma de separación de los endocarpios del resto de componentes del fruto, técnicas analíticas empleadas, etc. En la Tabla 2.3 se muestran algunos datos extraídos de la revisión bibliográfica.

Tabla 2.3 Composición del hueso de aceituna

Material	Composición, % (base seca)				Referencia
	CEL	HEM	LIG	CEN	
Huesos enteros					
	31,9	21,9	26,5	-	Fernández-Bolaños et al., 2001
	28,0	37,3	25,3	3,0	Montané et al., 2002
Endocarpios					
	36,4	26,8	26,0	-	Fernández-Bolaños et al., 2001
	11,82	24,16	50,45	0,9	Blanco et al., 2002
		38,3	28,1	4,4	Taralas y Kontominas, 2005
	27,1	32,2	40,4	-	Calero et al., 2009*
	24,8	34,2	41,0	-	Ben Driss, 2010*

* Composiciones en base libre de extractos.

Uno de los pocos trabajos que aborda el análisis de la estructura del hueso de aceituna, centrándose exclusivamente en el endocarpio y en sus polisacáridos, es el realizado por Coimbra et al., (1995). Estos investigadores concluyeron que el endocarpio es un sistema con un contenido total en carbohidratos (celulosa y hemicelulosas) del 62%. El porcentaje calculado de α -celulosa fue del 31%. Respecto a los polisacáridos no celulósicos, se informó que éstos poseen estructuras muy complejas, pudiéndose distinguir dos grandes tipos: los construidos con cadenas de xilanos ligeramente ramificadas, y con grados de polimerización en el rango 90-100, y los que aparecen como xilanos fuertemente ramificados con 30-60 monómeros por cadena. Por hidrólisis, las hemicelulosas darían lugar a una distribución de monosacáridos caracterizada por poseer grandes porcentajes de D-xilosa (>80% molar) y bajos de D-glucosa (<1% molar). El segundo monómero en importancia, dentro de esta fracción, sería la L-arabinosa existiendo, además, cantidades casi trazas de D-galactosa y D-manosa. Por otro lado, las hemicelulosas poseerían relaciones molares de D-xilosa a ácidos urónicos muy altas, próximas a 9:1, lo que implicaría una alta producción de ácido acético por hidrólisis del polímero.

Montané et al. (2002) determinaron, para huesos de aceituna, un contenido máximo de pentosanos del 18,5% en base seca. Finalmente, Nabarlantz et al. (2004) indicaron que los

porcentajes de D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa y grupos acetilo para el mismo tipo de materia prima fueron del 24,0%, 23,3%, 1,4% y 3,1%, respectivamente.

2.2.2.2 Vías de aprovechamiento para el hueso de aceituna

El hueso de aceituna puede ser aprovechado de dos maneras fundamentales:

- 1) para obtener energía y
- 2) para obtener productos químicos no energéticos.

Caso 1

Hoy en día existen numerosas investigaciones en curso que tratan de desarrollar métodos para la valorización energética de la biomasa y, en particular, de los materiales lignocelulósicos. El objetivo es producir biocombustibles sólidos, líquidos o gaseosos. En el caso del hueso de aceituna, éste se usa fundamentalmente como combustible sólido, aunque se sabe que también podría ser transformado hasta combustibles líquidos (etanol por conversión bioquímica, alquitranes por pirolisis) o gaseosos (metano vía digestión anaerobia, gas de síntesis por gasificación).

Tradicionalmente, el hueso de aceituna se ha utilizado en calderas de industrias del olivar, tanto almazaras como extractoras, así como en otros sectores como el cerámico, granjas, etc. En la actualidad cada vez están cobrando más importancia los usos en el sector doméstico y residencial para suministro de agua caliente sanitaria y calefacción. La tecnología ha experimentado un gran avance, importándose en la actualidad equipos con muy alto rendimiento y bajos niveles de emisiones. Para facilitar el acopio de combustible se está comenzando a comercializarse el hueso en sacos de 15 kg, de fácil distribución y manejo, óptimo para su uso en el sector doméstico, y con un precio considerablemente menor al de otros combustibles de similares prestaciones, como el pellets de madera.

En la Figura 2.5 se muestran las distintas posibilidades que existen para el aprovechamiento energético de los materiales biomásicos. Para usos energéticos, la biomasa se somete a transformaciones que persiguen alcanzar tres objetivos fundamentales: conseguir el estado de agregación adecuado para el equipo donde se alimentará el combustible, producir un sistema de máxima densidad energética y, finalmente, que éste no provoque fallos de funcionamiento en los dispositivos de generación de calor ni problemas de naturaleza ambiental. Respecto a otros combustibles, la biomasa generalmente es favorable atendiendo al tercer objetivo, al presentar bajas cantidades de azufre y cenizas en su composición, pero desfavorable si se atiende al segundo, por sus bajos poderes caloríficos, o al primero, porque normalmente aparece en estado sólido.

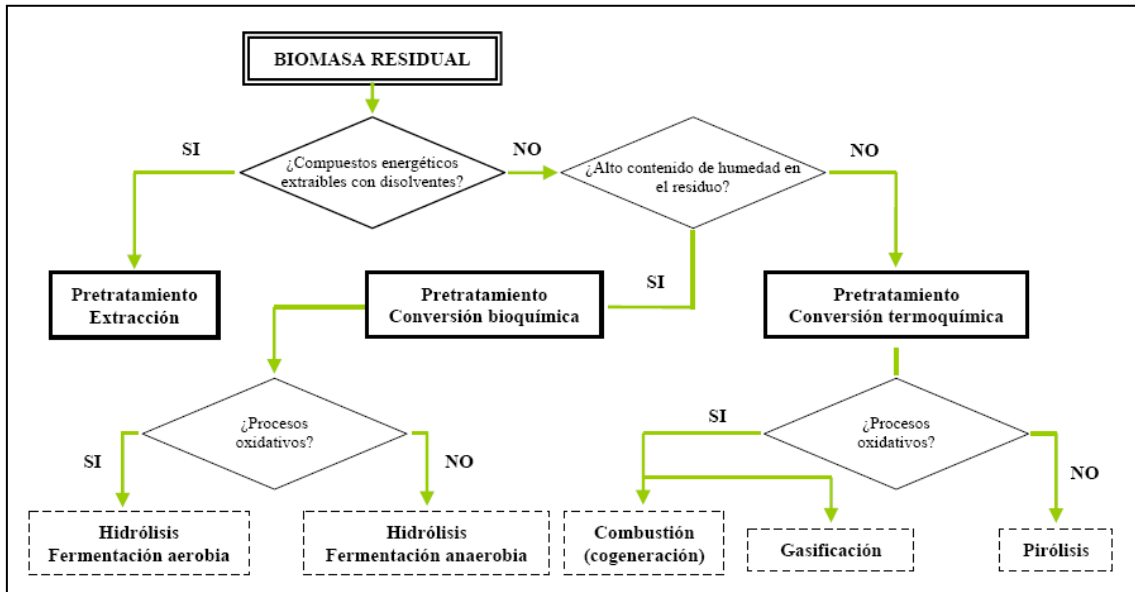


Figura 2.5 Vías para la transformación de la biomasa residual en energía

Caso 2

La consecución de productos químicos no energéticos a partir de huesos de aceituna ha sido, hasta el momento, poco estudiada. Calero et al. (2009) y Ben Driss (2010) indagado sobre el uso directo del endocarpio como adsorbente de metales pesados. González et al. (1994) y El-Sheikh et al. (2004) analizaron su transformación hacia carbón activo, mientras Montané et al. (2002) informaron sobre su uso para la producción de furfural. Fernández-Bolaños et al. (1999) estudiaron los compuestos que surgen al degradar la lignina del hueso de aceituna mediante explosión con vapor (*steam explosion*), lo que ha desembocado en su aprovechamiento como fuente de antioxidantes naturales. Finalmente, Abdi et al. (2000), Fernández-Bolaños et al. (2001) y Cuevas et al. (2009, 2013) utilizaron huesos como generadores de carbohidratos. Para este fin se sirvieron de enzimas que aplicaron sobre el sistema pretratado.

2.3 Procesos de hidrólisis

La ruta bioquímica para producir etanol o xilitol, partiendo de biomasa vegetal, consta de cuatro etapas fundamentales: pretratamiento, hidrólisis de polisacáridos, fermentación de azúcares y recuperación de bioproductos. El paso crítico, el más importante, es el segundo, ya que una vez obtenido un medio azucarado rico en monosacáridos, y sin inhibidores microbianos, las etapas de fermentación y separación de productos serían tecnológicamente sencillas. En la Figura 2.6 se muestra un esquema del proceso bioquímico para la obtención de etanol.

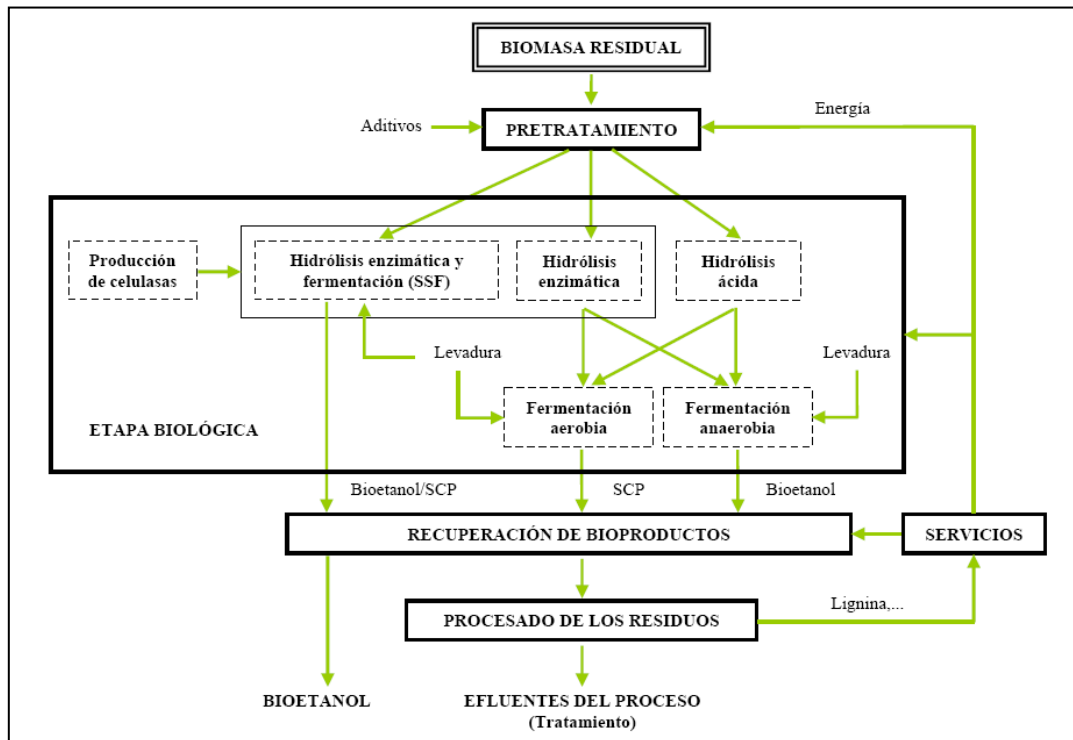


Figura 2.6 Vías para la transformación bioquímica de materiales lignocelulósicos

2.3.1 Pretratamiento

El término “pretratamiento” se refiere a un conjunto de transformaciones que tienen como objetivo modificar ciertas características del material para que las etapas hidrolíticas posteriores sucedan de la mejor manera posible. En la Figura 2.7 se muestran distintos tipos de pretratamientos, distinguiéndose entre operaciones de naturaleza física, química, físico-química y biológica.

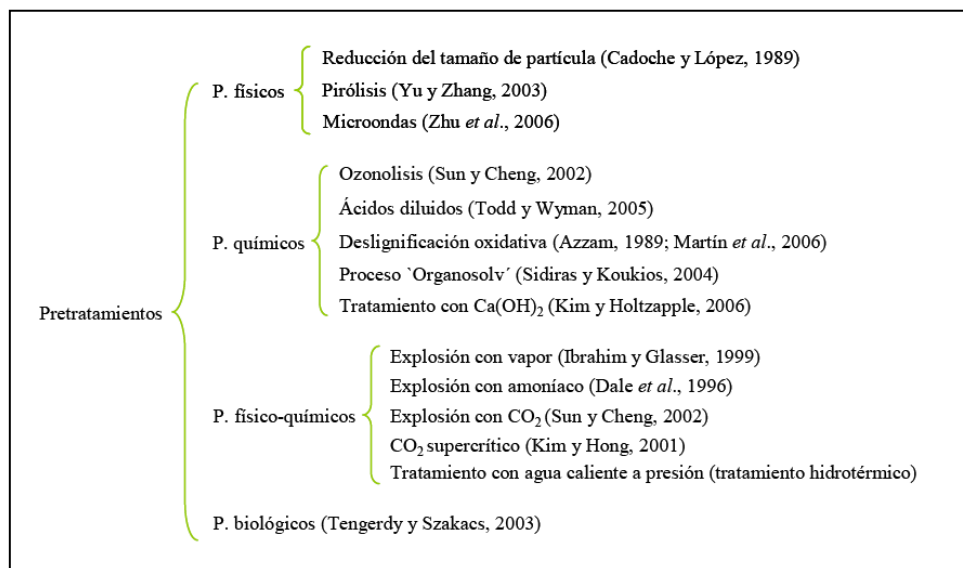


Figura 2.7 Tipos de pre-tratamiento aplicables sobre la biomasa

2.3.1.1 Pretratamientos físicos

Entre los pretratamientos de tipo físico, se puede destacar la reducción del tamaño de partícula. Generalmente, esta operación mejora el rendimiento de los procesos de hidrólisis de polisacáridos, así como la velocidad global de los mismos, al transcurrir las reacciones en fase heterogénea (sólido-líquido). La trituración del sólido consume energía, por lo que habrá que llegar a una situación de compromiso en la que el aumento de superficie específica del material no se traduzca en gastos energéticos elevados.

2.3.1.2 Pretratamientos químicos

En ellos se producen modificaciones de la composición de los materiales biomásicos. La hidrólisis ácida de los materiales lignocelulósicos es un proceso conocido desde 1819 (Larsson, 2000), y alcanzó su mayor desarrollo durante las dos Guerras Mundiales, períodos en los que la escasez de petróleo hizo que la madera se empleara masivamente para producir etanol. Entonces se desarrollaron numerosos procesos de hidrólisis ácida (Scholler, Madison, Bergius) que posteriormente fueron cayendo en desuso por razones económicas. Aunque para la hidrólisis de polisacáridos es posible utilizar diferentes clases de ácidos inorgánicos, como el sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico (Galbe y Zacchi, 2002), sólo los ácidos clorhídrico y sulfúrico han sido empleados a escala industrial.

Los procesos de hidrólisis ácida pueden agruparse, en función de la concentración de ácido, en dos categorías:

Hidrólisis con ácido concentrado

Su empleo no se contempla a nivel de pretratamiento. Los procesos que trabajan con ácidos concentrados operan a bajas temperaturas, pudiendo obtenerse altos rendimientos de hidrólisis (superiores al 90%) en la transformación de celulosa a D-glucosa. A pesar de esto, los procesos no son rentables debido al alto coste del ácido y de la posterior etapa de neutralización de los hidrolizados (Keller, 1996), así como a los intensos efectos corrosivos de los medios que obligan a construir reactores con materiales especiales y caros. Hay que indicar que, en los últimos años, los procesos que utilizan ácidos concentrados han adquirido un renovado interés debido a nuevos métodos que mejoran la economía de recuperación de los ácidos y que han sido desarrollados por varias compañías como *Masada Resource Group* (Birmingham, Ala), *Arkenol* (Mission Viejo, California) y *APACE* (Australia) (Katzen, 1997).

Hidrólisis con ácidos diluidos

Permite la solubilización de la fracción de hemicelulosas de la biomasa vegetal, generando un residuo sólido que contiene celulosa y lignina. Este pretratamiento posibilitaría, por tanto, la eliminación de una barrera física (hemicelulosas) que interfiere en la hidrólisis de la celulosa. Las condiciones de operación (concentración de ácido, temperatura y tiempo de reacción) deberán ser optimizadas para cada material biomásico y cada tipo de ácido ensayado. La hidrólisis ácida diluida de la hemicelulosa debe dar lugar a hidrolizados ricos en monosacáridos, en los que existan las menores cantidades posibles de productos de degradación. En bibliografía se ha informado de rendimientos de recuperación de monosacáridos hemicelulósicos entre el 80 y el 90% utilizando ácido sulfúrico sobre distintos tipos de biomásas (Tabla 2.4). En la tabla se observa cómo, en general, a medida que disminuye la temperatura para la que se maximiza la recuperación de D-xilosa se necesitan mayores tiempos de reacción y mayores concentraciones de ácido sulfúrico.

Tabla 2.4 Condiciones de operación y resultados de hidrólisis ácidas (H₂SO₄) de hemicelulosas

Material	T (°C)	t (min)	Conc. (M)	Rto. D-xilosa (%)	Referencia
PA	198	10	0,051	80,8	Karimi et al., 2006
PB	190	5	0,025	80	Sánchez et al., 2004
RE	157	20	0,066	79,6	Canettieri et al., 2007
CA	141,6	36,4	0,130	94	Shatalov y Pereira, 2012
RAP	119	60	0,204	91,3	Rahman et al., 2007

PA: paja de arroz; PB: paja brava; RE: residuos de eucalipto; CA: carrizo; RAP: residuos del procesado del aceite de palma.

Otro ácido que podría ser utilizado para la hidrólisis de hemicelulosas es el ácido nítrico. Este compuesto, aunque es más caro que el H_2SO_4 , presenta varias ventajas:

- En algunos casos, conduce a mayores rendimientos de sacarificación (Rodríguez-Chong et al., 2004).
- Su empleo acorta los tiempos de reacción (Zhang et al., 2011).
- Tras la etapa de neutralización, los compuestos nitrogenados que se forman pueden servir como fuente de nitrógeno en una posterior fermentación (Kim et al., 2014).
- El ácido nítrico puede ser producido, en grandes cantidades, vía captura de NO_x de los gases de combustión de instalaciones industriales (Kim y Han, 2013).

En bibliografía existen pocas referencias al uso de ácido nítrico para la hidrólisis de hemicelulosas; no obstante, en la Tabla 2.5 se incorporan datos de dos investigaciones en las que se hidrolizó paja de arroz y tallos de maíz, mostrándose como el ácido nítrico permite despolimerizar con eficacia las hemicelulosas hasta sus monómeros constitutivos.

Tabla 2.5 Condiciones de operación y resultados de hidrólisis ácidas (HNO_3) de hemicelulosas

Material	T (°C)	t (min)	Conc. (M)	Rto. D-xilosa (%)	Referencia
PA	158,8	5,86	0,103	86,5	Kim et al., 2014
TM	150	1	0,095	95,9	Zhang et al., 2011

PA: paja de arroz; TM: tallos de maíz.

2.3.1.3 Pretratamientos físico-químicos

Entre los pretratamientos de tipo físico-químico, el uso de agua líquida a alta temperatura (160–220°C, Haghghi Mood et al. 2013) ha mostrado ser una alternativa interesante para producir la solubilización completa de las hemicelulosas con una baja alteración de las fracciones de celulosa y lignina. Este pretratamiento también se denomina “hidrotérmico”. La hidrólisis de la hemicelulosa se produce como consecuencia de la liberación al medio acuoso de ciertos compuestos químicos de carácter ácido (ácido urónico y ácido acético) procedentes de radicales ácidos (grupos uronatos y acetilo) existentes en las cadenas de hemicelulosa. Existe, pues, una generación endógena de ácidos que ayuda a la hidrólisis del polisacárido, característica típica de las reacciones auto-catalíticas. Por ello, en ocasiones a este pretratamiento también se le denomina “autohidrólisis”. Hay que tener en cuenta, además, que a alta temperatura el agua da lugar a gran cantidad de iones hidronio, lo que favorece su carácter ácido. Así, por ejemplo, a 220°C el pH del agua pura es de 5,5.

El pretratamiento con agua a alta temperatura es una interesante alternativa para la transformación de la biomasa vegetal por las siguientes razones:

- No se necesitan productos químicos distintos al agua.
- Es un pretratamiento medioambientalmente poco agresivo en el que no existen graves problemas de corrosión ni de neutralización de hidrolizados.
- Las hemicelulosas pueden ser solubilizadas con facilidad en condiciones en las que existen bajas degradaciones de monosacáridos y reducida presencia de inhibidores fermentativos (Laser et al. 2002).
- Las pequeñas alteraciones físico-químicas experimentadas por la estructura de la celulosa y la lignina generan un residuo sólido rico en lignina y celulosa que, posteriormente, puede volver a fraccionarse. La eliminación de la fracción de hemicelulosas mejoraría la hidrólisis enzimática de la celulosa pretratada.

Sin embargo, el tratamiento hidrotérmico presenta inconvenientes, siendo uno de los principales el hecho de que las hemicelulosas se hidrolicen formando, principalmente, oligosacáridos. Estos productos no pueden ser metabolizados directamente por microorganismos, por lo que habría que proceder a su posterior hidrólisis (ácida o enzimática) para obtener sustratos de fermentación. Hay que resaltar que, en numerosas citas bibliográficas, se ha informado sobre el interés práctico y las vías de producción de los oligosacáridos (Aragon et al., 2013; Chapla et al., 2012; Sato et al., 2010).

Overend y Chornet (1987) propusieron un factor ('R0') que tuviera en cuenta, de forma combinada, los efectos de las variables 'tiempo' y 'temperatura' durante el tratamiento hidrotérmico de la biomasa. Este parámetro ha sido aplicado, desde entonces, en gran número de investigaciones (Garrote et al., 2002; Mateo et al., 2013; Roos et al., 2009). Por su parte, el grupo de investigación "Bioprocesos" (Universidad de Jaén) ha informado sobre la completa solubilización de las hemicelulosas del hueso de aceituna tras la aplicación de tratamientos hidrotérmicos con valores de 'log R0' iguales o superiores a 4,0 (Cuevas et al., 2009).

Los pretratamientos de explosión con vapor, o 'steam explosion', son pretratamientos de tipo físico-químico ampliamente estudiados (Oliveira et al., 2013; Martín-Sampedro et al., 2012). En ellos se combina la acción hidrolítica del agua a alta temperatura con los efectos mecánicos de una rápida descompresión. Las diferencias derivadas del uso de la autohidrólisis, frente al tratamiento de 'steam explosion', no están totalmente dilucidadas, aunque parece que el primero logra una mejor solubilización de la hemicelulosa preservando a los pentosanos en forma de oligómeros (Allen et al., 2001). Esto último obligaría, si se quiere obtener etanol, a implementar

una nueva etapa de hidrólisis, posterior al pre-tratamiento, para transformar los oligosacáridos en monómeros. Laser et al. (2002) indican que los hidrolizados generados mediante explosión con vapor poseen, frente a los del ataque con agua caliente, mayor cantidad de inhibidores fermentativos. Otro inconveniente del 'steam explosion' es su dificultad para trabajar en continuo.

Con relación al hueso de aceituna, el pretratamiento de explosión con vapor ha sido investigado por Fernández-Bolaños et al., 2001. Este grupo de investigación concluyó que el pretratamiento lograba una mejora significativa en la digestibilidad enzimática de la biomasa frente al caso de no pretratar los huesos de aceituna.

2.3.2 Hidrólisis enzimática

Para transformar los polisacáridos de la biomasa vegetal en monosacáridos, y de esta forma obtener un medio acuoso rico en azúcares, es preciso romper (hidrolizar) la estructura de la celulosa y la hemicelulosa. Para ello, se han ensayado distintas fórmulas de ataque que emplean compuestos químicos, orgánicos e inorgánicos, de carácter ácido (hidrólisis ácida) o bien sistemas enzimáticos (hidrólisis enzimática).

Aunque la hidrólisis enzimática de la celulosa parte de los trabajos realizados por Seillière (1906) y Reese et al. (1950), su aplicación sobre materiales lignocelulósicos da comienzo en la década de los setenta del siglo pasado al disponerse de las primeras preparaciones comerciales de biocatalizadores. Pronto se observó cómo esta técnica presentaba importantes ventajas frente a la hidrólisis ácida, derivadas de las suaves condiciones de operación (temperaturas entre 50 y 55°C, pH entre 4,5 y 5,0, ausencia de ácidos concentrados...) que conducían a menores gastos energéticos, a reducidas corrosiones en equipos y a evitar las etapas de neutralización de hidrolizados. Sin embargo, el empleo de enzimas, frente a ácidos, tenía tres grandes inconvenientes: menores velocidades de reacción, mayores costes del biocatalizador y elevada complejidad en los mecanismos de ataque sobre los sustratos.

La complejidad estructural de la celulosa impide que ésta pueda ser hidrolizada por un solo tipo de enzima. La hidrólisis enzimática de la celulosa resulta de la acción sinérgica de tres tipos de biocatalizador (Lynd et al., 2002; Deswal et al., 2011):

1. Endoglucanasas (EC 3.2.1.4), capaces de atacar regiones internas de baja cristalinidad, con lo que surgirían nuevos extremos de cadenas.
2. Exoglucanasas (Celobiohidrolasas, EC 3.2.1.91), especializadas en degradar las cadenas de celulosa atacando sus extremos libres.
3. β -glucosidasas (EC 3.2.1.21), que hidrolizan la celobiosa hacia D-glucosa. Su actuación no sólo es importante por aumentar los rendimientos en el monosacárido sino, también, por disminuir el efecto de inhibición que la celobiosa ejerce durante la hidrólisis.

Aunque las celulasas pueden obtenerse mediante diversas fuentes (bacterias, hongos, tejido vegetal...), son las metabolizadas a partir de organismos fúngicos las que más han llamado la atención a la comunidad científica, sobre todo las procedentes de *Trichoderma reesei* y *Trichoderma viride* (Galbe y Zacchi, 2002). *T. reesei* es el microorganismo que produce más eficientemente endo- y exoglucanasas (Miettinen-Oinonen y Suominen, 2002), aunque no es capaz de excretar suficientes cantidades de β -glucosidasas (Bollok y Reczey, 2005). Por este motivo, se debe complementar su actividad hidrolítica mediante β -glucosidasas procedentes de otros organismos, como los hongos del género *Aspergillus* (Juhász et al., 2003).

En las últimas décadas, y mediante ingeniería genética, se han logrado importantes avances en la producción de enzimas, lo que ha permitido aumentar las productividades de celulasas. No obstante, hoy todavía las enzimas son caras. Según Ahamed y Vermette (2008), el coste de la enzima puede suponer alrededor del 40% de los costes totales del proceso de obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Según Humbird et al. (2011), el coste de enzima para la obtención de bioetanol se situaría alrededor de 5 céntimos americanos por galón de etanol producido partiendo de grano de maíz, y en 34 céntimos americanos por galón de etanol partiendo de materiales lignocelulósicos.

Durante la hidrólisis enzimática de la celulosa, el rendimiento en D-glucosa depende de múltiples factores, tales como temperatura, pH, grado de agitación en el reactor, tipo de preparación enzimática y características estructurales del sustrato a hidrolizar. Optimizar el sistema enzimático implica conocer dos cuestiones: la composición de la mezcla de enzimas y la carga enzimática a usar, es decir, la relación enzima/sustrato (E/S). Con relación al primer punto, en la mayoría de las investigaciones actuales se están usando preparaciones comerciales de celulasas (mezcla de endo- y exoglucanasas) complementadas con β -glucosidasas, con lo que se reduce la posibilidad de inhibición por celobiosa. En este sentido, los cócteles enzimáticos de

la empresa Novo Nordisk Bioindustrial, tales como Celluclast 1.5 y Novozym 188 han sido ampliamente utilizados (Lozano et al., 2014; Pierre et al., 2011; Choi et al., 2013).

La relación entre las cantidades de catalizador y sustrato también juega un papel vital durante las hidrólisis enzimáticas. Si se quieren elevadas conversiones de celulosa a D-glucosa son necesarias altas cargas de enzimas (Gregg y Saddler, 1996), aunque al superar un valor máximo se alcanzarían conversiones constantes; es decir, los máximos rendimientos en la hexosa se logran para concentraciones totales de enzima por debajo de un punto que evita la saturación de sitios activos en el sustrato. Gregg y Saddler informaron que, aunque las cargas de proteínas que se suelen usar son del orden de 10 UPF/g celulosa, lo ideal sería trabajar con cargas inferiores, para disminuir los costes finales del producto. Para Sun y Cheng (2002), las concentraciones oscilan, dependiendo del tipo de sustrato, entre 7 y 33 UPF/g sustrato. Tengborg et al. (2001a), sin embargo, llegan a utilizar cargas enzimáticas de 220 UPF/g celulosa para hidrolizar maderas de abeto impregnadas con SO₂ que fueron sometidas a un proceso de explosión con vapor (*'steam explosión'*) para alcanzar un 78% de conversión de celulosa a D-glucosa. En la Tabla 2.6 se muestran algunos datos de hidrólisis enzimáticas llevadas a cabo con distintas cargas de biocatalizador.

Tabla 2.6 Condiciones de hidrólisis enzimáticas llevadas a cabo con distintas cargas de biocatalizador (exclusivamente 'Celluclast 1.5')

Sustrato	Pretrat.	Carga enzimática	% conversión celulosa	Referencia
TM	AD	10,7 UPF/g celulosa	80	Hodge et al., 2009
TM	AD	22 UPF/g celulosa	73	Hodge et al., 2008
TM	EV	20 UPF/g sólido	75	Lu et al., 2010
TM	EV	30 UPF/g celulosa	60	Yang et al., 2011
BM	AD	20 UPF/g sólido	65	Ma et al., 2011
BSD	TH	30 UPF/g celulosa	60	Wang et al., 2012
CA	--	48 UPF/g celulosa	80	Pierre et al., 2011
		96 UPF/g celulosa	88	

Sustrato: TM, tallo de maíz; BM, bagazo de mandioca; BSD, bagazo de sorgo dulce; CA, celulosa 'Avicel'.

Pretratamiento: AD, ácido diluido; EV, explosión con vapor; TH, tratamiento hidrotérmico.

La forma en la que se encuentre el sustrato, durante la hidrólisis enzimática de la celulosa, es la variable de mayor importancia a la hora de interpretar altas o bajas conversiones a monosacárido. En este sentido, el mejor medio es aquel en el que se conjugan tres factores: el sustrato sólido no tiene ninguna barrera física que disminuya su superficie de reacción, el

sustrato es completamente amorfo (sin regiones cristalinas) no existiendo, además, inhibidores enzimáticos en la fase líquida o en el sólido.

La reducción de tamaño es un tratamiento sencillo pero que puede incrementar la superficie reactiva de la celulosa. El efecto del tamaño de partícula, en la hidrólisis de residuos vegetales, se ha investigado generando resultados dispares. Ballesteros et al. (2002) obtienen mejores rendimientos de sacarificación trabajando con la fracción de mayor tamaño (8-12 mm) al aplicar, sobre *Brassica carinata*, una explosión con vapor seguida de hidrólisis con celulasas. Monavari et al. (2009) informaron que la reducción del tamaño de astilla en maderas blandas pretratadas mediante impregnación con SO₂ seguida de una explosión con vapor no producía incrementos importantes en la digestibilidad enzimática de la celulosa. Sin embargo, Mooney et al. (1999), observaron el efecto contrario usando pastas de abeto. También Zhu et al. (2009) y Schütt et al. (2012) informaron sobre mejoras significativas del rendimiento de hidrólisis enzimática por reducción del tamaño de partícula. Según Gan et al. (2003), el tamaño del sustrato sólo tiene influencia para tiempos de reacción inferiores a 10 h. Generalmente, la aplicación exclusiva de una etapa de reducción de tamaño no garantiza un desarrollo adecuado de las hidrólisis enzimáticas (Tabla 2.7), por lo que será necesario completar el pretratamiento con algunos de los procesos planteados en la Figura 2.7.

Tabla 2.7 Condiciones de hidrólisis enzimáticas llevadas a cabo con distintas cargas de biocatalizador (exclusivamente 'Celluclast 1.5')

Sustrato	Pretratamiento	Tamaño de sólidos, mm	% Rto. glucosa	Referencia
PL	AD	0,5-4,0	16*	Zhu et al., 2010
	TH	0,75-3,0	16-9*	
MB	SO ₂ +EV	1-2	55**	Monavari et al., 2009
		5-6	50**	

Sustrato: PL, pino 'lodgepole'; MB, maderas blandas.

Pretratamiento: AD, ácido diluido; TH, tratamiento hidrotérmico; EV, explosión con vapor.

* referido a peso de material pretratado; ** referido a D-glucosa contenida en la materia prima.

Cada tipo de pretratamiento provoca cambios específicos en el material original, lo que condiciona el diseño de la posterior etapa de hidrólisis enzimática. Así, tras la explosión con amoníaco, al no eliminarse completamente ninguna de las fracciones mayoritarias de la biomasa vegetal, será necesaria una mezcla enzimática en la que existan celulasas y hemicelulasas (Teymouri et al., 2005). En los pretratamientos de explosión con vapor se han observado aumentos significativos y continuados de la digestibilidad enzimática de los sólidos resultantes a medida que se incrementa la severidad de tratamiento, todo como consecuencia de la solubilización de las hemicelulosas y la abertura de canales por los que los biocatalizadores

pueden acceder a la celulosa. En estos pretratamientos deben buscarse equilibrios en los que se hagan compatibles altas digestibilidades enzimáticas y bajas degradaciones de azúcares hemicelulósicos en la etapa de pretratamiento (Boussaid et al., 2000). Por otro lado, el uso de ácidos diluidos, o de agua caliente a presión, bajo condiciones suficientemente severas, llevaría a la solubilización de la fracción hemicelulósica, por lo que las hemicelulasas no serían precisas en el posterior ataque enzimático del sólido. Evidentemente, un mismo pretratamiento puede generar resultados dispares, en la etapa enzimática, ante distintos residuos. Así, Montero (1997) al aplicar autohidrólisis e hidrólisis enzimática sobre cáscaras de almendra y desechos de conífera, comprueba altos rendimientos en D-glucosa para el primer medio (97,5%), pero muy bajos para el segundo.

Durante la hidrólisis enzimática de la celulosa, pueden tener lugar distintos fenómenos de inhibición del biocatalizador. La actuación de las enzimas puede quedar inhibida debido a su interacción con compuestos existentes tanto en el sólido pretratado como en la fase líquida.

a. *Sólido pretratado.*

En el sólido pretratado, la adsorción del biocatalizador se dará sobre los polisacáridos o sobre la lignina. Respecto a los mecanismos de adsorción-desorción de la proteína sobre los carbohidratos, las teorías publicadas son extensas, habiéndose descrito tanto esquemas de operación completamente reversibles como irreversibles. Boussaid y Saddler (1999) creen que sólo la hidrólisis total de la cadena de celulosa posibilitará la recuperación del enzima. Para Ramos et al. (1993) esto nunca será posible, estando condicionado el avance del catalizador al contenido de lignina del residuo. En la Tabla 2.8 se incorporan algunos datos de bibliografía que muestran como el incremento del contenido de lignina del material a hidrolizar conduce a reducciones en la digestibilidad enzimática de la celulosa.

La lignina ha sido estudiada por su alta capacidad para formar enlaces con proteínas (Lu et al., 2002; Berlin et al., 2005), lo que se traducen en disminuciones de la velocidad de hidrólisis de la celulosa (Ju et al., 2013). Sewalt et al. (1997) observaron incrementos significativos de inhibición enzimática al adicionar la resina polifenólica sobre un sistema de celulasas. En este sentido, no todas las ligninas tienen la misma capacidad inhibidora; Saddler et al. (1993) afirmaron que las maderas blandas son más difíciles de hidrolizar que las duras, al presentar mayor proporción de grupos guayacilo. Por su parte, Berlin et al. (2006) informaron que las ligninas inhiben más a las celulasas que a las xilanasas, mientras que las β -glucosidasas son las proteínas menos alteradas en su forma de actuación. Para reducir estas adsorciones se ha planteado adicionar al sistema

de reacción compuestos nitrogenados con grupos similares a enlaces peptídicos (PVP, poliamidas, albúminas...) o tensioactivos no iónicos (Ooshima et al., 1986; Park et al., 2002; Kristensen et al., 2006).

Tabla 2.8 Influencia de la lignina en la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos

% Lignina	Carga enzimática	% Rto. Glucosa	Referencia
4,4	60 UPF/g celulosa	90	Mooney et al., 1998
8,2	60 UPF/g celulosa	100	
27,3	60 UPF/g celulosa	20	
30,9	60 UPF/g celulosa	50	
9,4	10 UPF/g sólido	92	Siqueira et al., 2013
14,7	10 UPF/g sólido	70	
22,2	10 UPF/g sólido	25	
10,9	5 UPF/g celulosa	>90	Kumar et al., 2012
29,7	5 UPF/g celulosa	55	
42,8	5 UPF/g celulosa	<20	

b. *Fase líquida.*

Los compuestos presentes en la fase líquida también pueden actuar como inhibidores enzimáticos, por lo que la tendencia, hasta ahora, ha sido evitar el trabajo con los extractos líquidos generados en los pretratamientos. Tengborg et al. (2001b), concluyen que la hidrólisis enzimática de maderas de abeto queda muy inhibida al trabajar con la suspensión que resulta de la etapa de explosión con vapor, ya que las conversiones de celulosa (<20%) son menores a aquellas obtenidas si se trabaja con los sólidos lavados (>30%). Se demuestra que ni el furfural ni el 5-hidroximetilfurfural ejercen gran influencia sobre el biocatalizador. Este mismo grupo de investigación obtuvo, trabajando de la misma forma y con cargas de enzima muy altas (120 UPF/g celulosa), conversiones de celulosa inferiores al 46% (Tengborg et al., 2001a).

Durante las hidrólisis enzimáticas también pueden ocurrir inhibiciones por producto. Así, Castellanos et al. (1995) informaron que D-glucosa inhibió a la celobiasa y la celobiosa a las endoglucanasas y celobiohidrolasas; sin embargo, las exoglucosidasas no son inhibidas por producto. Estos investigadores establecieron, por tanto, que la presencia de D-glucosa, durante el desarrollo de la hidrólisis, disminuye la extensión y la velocidad del bioproceso.

2.4 Acondicionamiento de hidrolizados

Los hidrolizados obtenidos en etapas de hidrólisis ácida generalmente contienen cantidades significativas de ciertos compuestos químicos que bloquean, o retardan, la acción de los microorganismos. Son los denominados “inhibidores fermentativos”. En ese caso, es necesario proceder al acondicionamiento del medio líquido como paso previo a la fermentación (Huang et al., 2008; Musatto y Roberto, 2004). En la Figura 2.8 se muestran, indicando su procedencia, algunos compuestos con capacidad toxicológica microbiana. La formación de furfural y 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) se verifica partiendo, respectivamente, de pentosas y hexosas. El 5-HMF podría transformarse en ácido levulínico y fórmico, y el furfural en ácido fórmico, si las temperaturas son suficientemente altas. También se puede liberar al medio ácido acético como consecuencia de la hidrólisis hemicelulósica y compuestos aromáticos a partir de la fracción hidrosoluble de la lignina (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a).

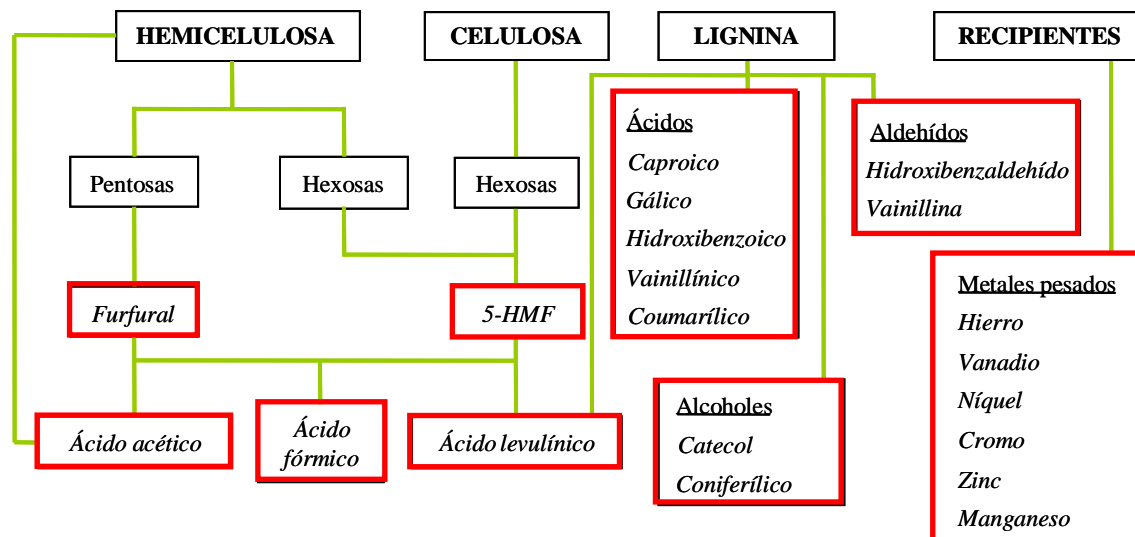


Figura 2.8 Inhibidores microbianos (recuadros rojos) derivados de la biomasa lignocelulósica y de equipos de proceso

En numerosos artículos se recalca el poder inhibitor del ácido acético. Larsson et al. (1999) indican que a bajas concentraciones de ácido acético ($< 6 \text{ kg/m}^3$), ácido fórmico y ácido levulínico la producción de etanol se ve favorecida; sin embargo, por encima de un valor crítico (sobre todo del primer compuesto) las inhibiciones pueden ser considerables, por lo que la densidad de grupos acetilo en las hemicelulosas condiciona la fermentabilidad de sus hidrolizados. El ácido acético atraviesa la membrana celular bajo su forma no disociada. Una vez en el citoplasma, al disociarse, modifica el pH intracelular. Las células consumen energía para sacar el exceso de protones, y esto afecta a su metabolismo. El carácter tóxico del ácido

será más pronunciado cuanto más bajo sea el pH del fermentador, al desplazarse el equilibrio hacia la forma molecular no disociada (Helle et al., 2003).

Parece que el furfural y el 5-HMF no son inhibidores microbianos críticos, al presentarse en concentraciones relativamente bajas, o al poderse contrarrestar sus efectos elevando la cantidad de inóculo (Boyer et al., 1992). Con respecto a los derivados fenólicos de la lignina, los más tóxicos son los ácidos menos sustituidos ya que su carácter lipofílico favorece su transporte hacia el interior celular provocándose, posteriormente, la liberación de protones.

Las técnicas para el acondicionamiento de los hidrolizados son diversas, pudiéndose destacar las siguientes:

a. Químicas

Basadas en la adición de productos químicos al hidrolizado que transforman los tóxicos en especies no problemáticas o en compuestos fácilmente eliminables de la fase líquida.

a.1 Neutralización

Las hidrólisis ácidas generan hidrolizados con pH muy reducidos, inviables para una fermentación con levaduras si se atiende al hecho de que estos microorganismos suelen ser cultivados a pH comprendidos entre 4 y 6 (Winkelhausen y Kuzmanova, 1998). Por tanto, la neutralización de los licores ácidos mediante el empleo de bases (NaOH, KOH...) tendrá carácter obligatorio. Esta técnica logra, en ocasiones, buenos resultados con costes reducidos (Mussatto y Roberto, 2004).

a.2 Desintoxicación alcalina

Consiste en la adición de bases (NaOH, KOH, CaO, Ca(OH)₂...) al medio azucarado hasta alcanzar pH suficientemente altos, alrededor de 10, para lograr la precipitación, o descomposición, de los inhibidores fermentativos. Una vez separados éstos (por filtración o centrifugación), se volvería a ajustar el pH del hidrolizado, esta vez empleando ácidos (Larsson et al., 1999). Parece que combinando la acción de distintas bases, como NaOH y Ca(OH)₂, se lograrían mejores resultados que los observados actuando individualmente.

La desintoxicación alcalina con Ca(OH)₂ se denomina 'overliming'. Mohagheghi et al. (2006) estudiaron cómo afectaba el pH final del 'overliming' a la fermentabilidad de hidrolizados hemicelulósicos de tallos de maíz. Se informó que el incremento de pH siempre fue positivo, excepto al operar por encima de 10, momento en el que se producía gran degradación de azúcares.

b. Físicas

Los inhibidores se retiran del hidrolizado por procedimientos físicos, sin la participación de agentes químicos externos.

b.1 Adsorción

El uso de sólidos de elevada superficie específica, como el carbón activo, permite que algunos inhibidores queden retenidos en ellos por adsorción. El principal inconveniente de esta técnica reside en su baja selectividad, que conduce a pérdidas sensibles de azúcares.

b.2 Extracción con disolventes

Los disolventes orgánicos, tales como el cloroformo, acetato de etilo, tricloetileno, éter dietílico o hexano, tienen la capacidad de extraer algunos compuestos del hidrolizado tales como fenoles de bajo peso molecular (Parajó et al., 1997), furfural, 5-hidroximetilfurfural, etc.

b.3 Evaporación

Ayuda a la eliminación de compuestos volátiles tóxicos, sobre todo ácido acético y furfural, aunque, al mismo tiempo, se estaría elevando la concentración de los no volátiles (Palmqvist et al., 1996). En muchas ocasiones, la evaporación se realiza a presión reducida, en rotavapor, con lo que se disminuye la temperatura de trabajo y la degradación de azúcares. Quarta y Anese (2012), al investigar la separación de furfural y 5-HMF de partículas hidratadas de café tostado, concluyeron que calentando el medio a 60°C durante 10 minutos y a 2,7 kPa se eliminaba el 100% del primer compuesto y el 20% del segundo.

b.4 Intercambio iónico

Se basa en la retención de los inhibidores sobre una resina de intercambio iónico (amberlitas). Según Villarreal et al. (2006), las resinas de intercambio iónico disminuyen especialmente la concentración de ácido acético y compuestos fenólicos.

b.5 Separación con membranas

En los últimos años se han llevado a cabo algunas investigaciones relativas al empleo de la ultrafiltración para la separación de furfural en hidrolizados azucarados (Han et al., 2006; Weng et al., 2009).

c. Biológicas

Mediante desintoxicación enzimática o microbiana pueden eliminarse, selectivamente, algunos inhibidores del hidrolizado. Así, la enzima lacasa cataliza la oxidación de fenoles de bajo peso molecular y ácidos fenólicos mientras la furfural reductasa transforma el furfural a alcohol furfurílico (Gutierrez et al., 2006).

En bibliografía pueden encontrarse referencias donde se utilizan varias técnicas de detoxificación para el acondicionamiento de un mismo medio. Así, Nigam (2001) en el acondicionamiento de un hidrolizado ácido de paja de trigo, utilizó la siguiente secuencia de tratamientos: extracción con éter dietílico, calentamiento a 100°C durante 15 minutos, adición de Ca(OH)₂ hasta pH = 10, filtración, acidificación hasta pH 6,5, nueva filtración y, para finalizar, concentración en rotavapor. Por otro lado, Converti et al. (1999) sólo logró la fermentación, mediante levaduras no tradicionales, de hidrolizados ácidos de maderas duras cuando los líquidos fueron sometidos a complejas secuencias de detoxificación: ‘overliming’, adsorción con carbón activo y evaporación. El acondicionamiento de hidrolizados supone un evidente incremento de los costes productivos. Por ese motivo, debería ser evitado o, en todo caso, debe minimizarse el número de etapas involucradas.

2.5 Fermentación

El aprovechamiento integral de los residuos lignocelulósicos, mediante rutas bioquímicas, necesita microorganismos que consuman tanto hexosas como pentosas. Las levaduras tradicionales, como *Saccharomyces cerevisiae*, metabolizan con rapidez D-glucosa produciendo etanol. A partir de la década de 1980 comienzan a describirse levaduras que también consumen pentosas para generar el mismo producto. Se habla de “levaduras no tradicionales”, como *Pachysolen tannophilus*, *Candida tropicalis*, *Candida shehatae*, *Candida parapsilosis*, *Pichia stipitis*, *Candida guilliermondii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Debaryomyces hansenii*, etc. Estos microorganismos también pueden dar lugar a bioproductos de interés alimentario, como xilitol, arabitol, etc.

La producción de xilitol, por fermentación, es una alternativa cada vez más atractiva frente a la ruta química, y está basada en el hecho de que muchas levaduras y hongos expresan actividad xilosa-reductasa (EC 1.1.1.21), capaz de reducir D-xilosa a xilitol como primera etapa en el metabolismo de transformación de D-xilosa a etanol (Chian y Knight, 1960).

Durante el desarrollo de la fermentación etanólica hay que controlar un gran número de variables que condicionan la forma de trabajo del microorganismo. En primer lugar, habrá que seleccionar la levadura teniendo en cuenta que aunque las especies no tradicionales asimilan pentosas, algunas lo hacen para dar fundamentalmente etanol mientras otras sintetizan xilitol o mezclas de ambos productos. Así, Toivola et al. (1984) suministraron D-xilosa a 200 levaduras del banco celular CBS y descubrieron que entre las únicas seis especies capaces de generar etanol con rendimientos superiores al 5% se encontraban *C. shehatae*, *P. stipitis* y *P. tannophilus*. Sin embargo, mientras los dos primeros organismos alcanzaron concentraciones finales de etanol entre 5,9 y 6,6 kg/m³ (partiendo de 20 kg/m³ de D-xilosa), la tercera sólo produjo 2,1 kg/m³, lo que suponía un rendimiento del 10%. El hecho de que *P. stipitis* y *C. shehatae* sean las levaduras más apropiadas para la transformación de D-xilosa a etanol también es puesto de relieve por Roberto et al. (1991). Estos autores analizaron la actuación de cuatro microorganismos (*P. stipitis*, *P. tannophilus*, *C. utilis*, *C. tropicalis*) sobre hidrolizados lignocelulósicos con 20 kg/m³ de D-xilosa (bagazo de caña de azúcar sometido a pretratamiento con H₂SO₄ diluido más explosión con vapor a 190°C-5 minutos) y mientras *P. tannophilus* NRRL 2460 logró concentraciones de etanol inferiores a 3 kg/m³, *P. stipitis* CBS 5773 alcanzó los 9 kg/m³. Para Yablochkova et al. (2003), la cepa *P. tannophilus* Y-1532 podría tener ciertas limitaciones partiendo de D-xilosa sintética, ya que puede metabolizar cantidades comparables de etanol y xilitol frente a otros organismos que pueden favorecer la producción selectiva de xilitol (*C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *P. guilliermondii*,...) o etanol (*P. stipitis*, *C. shehatae*,...).

Algunos datos bibliográficos que ponen de manifiesto la baja producción de etanol por *P. tannophilus*, partiendo de D-xilosa, se muestran en la Tabla 2.9.

Tabla 2.9 Rendimientos de xilitol ($Y_{Xi/s}$) y etanol ($Y_{E/s}$) por consumo de D-xilosa con *P. tannophilus*

Cepa de levadura	$Y_{Xi/s}$ kg kg ⁻¹	$Y_{E/s}$ kg kg ⁻¹	Referencia
<i>P. tannophilus</i> Y-1532	0,24-0,26	0,25-0,28	Yablochkova et al. (2003)
<i>P. tannophilus</i> DSM 70352	0,34	0,11	Kruse y Schügerl (1996)
<i>P. tannophilus</i> NRRL Y2460	--	0,16	Lee et al. (1986)

Algunas variables con gran peso en el proceso fermentativo son:

a. Concentración inicial de células

El incremento de la concentración inicial de biomasa es siempre positivo para lograr la transformación de los sustratos a bioproductos, sobre todo trabajando con medios muy concentrados en azúcares o con una alta tasa de inhibidores microbianos. En el laboratorio es posible obtener inóculos tan grandes como se desee mediante sucesivas secuencias de cultivo y separación de biomasa. Así, Parajó et al. (1997) obtuvieron 41 kg/m³ de xilitol partiendo de 78 kg/m³ de D-xilosa (procedente de *Eucaliptus globulus*) empleando concentraciones celulares de *D. hansenii* NRRL Y-7426 entre 50-80 kg/m³. Por otro lado, Converti et al. (1999) utilizaron inóculos de 20 kg/m³, para concentraciones de sustrato de 70-80 kg/m³. No obstante, hay que considerar que, en la práctica industrial, el trabajo con esas concentraciones de inóculo es complejo y caro.

b. Temperatura y pH del medio

Las levaduras productoras de xilitol pueden operar, generalmente, entre 20 y 45°C. Sin embargo, el rango óptimo de trabajo se estrecha, para la mayoría de los microorganismos, entre 28 y 35°C. Respecto a la acidez del medio, el valor óptimo de pH oscila entre 4 y 8. Saha y Bothast (1999b), al utilizar *Candida peltata* para conseguir xilitol a partir de D-xilosa en medio sintético, trabajaron a pH = 6,0 y temperaturas de 28°C para lograr rendimientos de 0,56 kg de bioproducto por kg de sustrato. Sampaio et al. (2006), maximizaron la formación de xilitol con *D. hansenii* UFV-170 a 30-35°C y un pH entre 4 y 8.

c. Oxigenación del medio

Esta variable es clave para el control de las rutas metabólicas en las levaduras no tradicionales y, específicamente, en *P. tannophilus*. La producción de xilitol, etanol o tejido celular puede regularse teniendo en cuenta los caudales aportados de O₂ y los consumos debidos a la formación de biomasa. Yablochkova et al. (2004) cultivaron *P. tannophilus* con tres suministros de oxígeno (0, 5 y 140 mmol/L/h) y determinaron que los mejores rendimientos y productividades en xilitol (0,16 kg/kg y 0,08 kg/m³/h, respectivamente) se alcanzaron con el nivel de oxigenación intermedio, mientras el superior afectó positivamente a la formación de biomasa (0,53 kg/m³/h) y el inferior suprimió todo desarrollo microbiano. Para Kruse y Schügerl (1996) las mejores condiciones de operación fueron, nuevamente, las microaeróbicas. Finalmente, De Faveri et al. (2004) optimizaron la producción de xilitol a partir de 71 kg/m³ de D-xilosa usando *D. hansenii* NRRL Y-7426 y un caudal de oxígeno de 4,1 mg/s. En esas condiciones, la productividad de xilitol fue de 0,53 kg/m³/h y el rendimiento de 0,71 kg/kg_{xilosa}.

En algunos trabajos realizados en condiciones microaeróbicas se parte de altas concentraciones de biomasa. De esta manera no es necesario promover, durante el experimento, etapas aeróbicas para la estimulación del crecimiento celular.

d. Composición del medio

El medio de fermentación debe ser rico en D-xilosa, aun sabiendo que el incremento en la concentración del azúcar origina un descenso en la velocidad específica de crecimiento de biomasa para un grado de oxigenación constante. Sampaio et al. (2006) optimizan la producción de xilitol, en medio sintético de D-xilosa y con *D. hansenii* UFV-170, para una concentración del monosacárido igual a 165 kg/m³; mientras que con hidrolizados lignocelulósicos se ha llegado a trabajar por encima de 50 kg/m³ (Converti et al., 1999; Kim et al., 1999) o incluso de 100 kg/m³ (Chen y Gong, 1985).

En estos casos, hay que prestar especial atención a la concentración de inhibidores generados en las etapas de hidrólisis (Mussatto et al., 2005). En este sentido, como muestra, cabe destacar dos trabajos:

- La fermentación, con *C. guilliermondii*, de hidrolizados obtenidos con bagazo de caña de azúcar produce 18,4 kg/m³ de xilitol a partir de 29,5 kg/m³ de D-xilosa y con productividades de 0,38 kg/m³/h, inferiores a las observadas para medios sintéticos (0,66 kg/m³/h) al existir compuestos tóxicos para la levadura (Pfeifer et al., 1996).

- Saha y Bothast (1999a), al utilizar *C. peltata* para producir xilitol a partir de D-xilosa (50 kg/m^3), llegan a rendimientos de 0,56 kg por kg de sustrato y comprueban la existencia de inhibición microbiana debida a D-glucosa (10 kg/m^3), etanol ($7,5 \text{ kg/m}^3$) y ácido acético (5 kg/m^3). La L-arabinosa no afectó a la obtención del bioproducto incluso a altas concentraciones (10 kg/m^3).

Por tanto, la levadura *Pachysolen tannophilus* debe ser empleada sobre D-xilosa pensando que no será una buena productora de etanol pero sí de xilitol, teniendo además una buena tolerancia a algunos inhibidores fermentativos tales como el ácido acético o algunos fenoles.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Tesis de doctorado
*Tratamientos a presión e hidrólisis del hueso de aceituna.
Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen tannophilus**

3.1 Materiales

En relación con los materiales, se ha diferenciado entre materia prima, enzimas, microorganismo utilizado y reactivos químicos.

3.1.1 Materia prima

La materia prima de la investigación ha sido hueso de aceituna en fragmentos, obtenida de la deshuesadora existente en la almazara “San Juan”. Dicha instalación agroalimentaria se encuentra ubicada en el Polígono Industrial “Los Olivares”, dentro del término municipal de Jaén. El hueso de aceituna es un sub-producto del proceso de obtención del aceite de oliva. Los endocarpios del fruto del olivo son separados del orujo graso que procede del decánter de dos salidas utilizando un separador de pulpa y hueso, modelo SEP/R-50, de la firma JAR (Mancha Real, Jaén).

3.1.2 Enzimas

Las enzimas que se utilizan en el trabajo son las siguientes:

✚ Celulasa de *Trichoderma reesei*.

Nombre comercial: ‘Celluclast 1.5’.

Fabricante: Novo Nordisk Bioindustrial (Madrid, España).

✚ β -glucosidasa de *Aspergillus niger*.

Nombre comercial: ‘Novozym 188’.

Fabricante: Novo Nordisk Bioindustrial (Madrid, España)

3.1.3 Levadura

Los experimentos de fermentación han sido realizados con la levadura *Pachysolen tannophilus* (32691), suministrada por la ‘American Type Culture Collection’ (ATCC).

3.1.4 Reactivos químicos y ‘kits’ de análisis

Los reactivos utilizados, y sus características, se indican a continuación:

1. Acetato de sodio 3-hidrato, $\text{NaCH}_3\text{COO}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, PRS., Panreac.
2. Acetona, CH_3COCH_3 , QP., Panreac.
3. Ácido 3,5-dinitrosalicílico, $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_7$, puro, Sigma.
4. Ácido etilendiaminotetracético sal disódica 2-hidrato, $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99%, PA, Panreac.
5. Ácido nítrico, PA, (HNO_3), Panreac.
6. Ácido sulfúrico, H_2SO_4 , 96%, PA, Panreac.

7. Agar, PRS-Codex, Panreac.
8. Agua ultrapura, resistividad 18,2 M Ω -cm.
9. D (+)-glucosa anhidra, C₆H₁₂O₆, PRS, Panreac.
10. D (+)-xilosa anhidra, C₅H₁₀O₅, PRS, Panreac.
11. Decahidronaftaleno (cis-trans), C₁₀H₁₈, puro, Fluka.
12. Disolución tampón pH = 4,01, Crison, cat. nº 23-110-02.
13. Disolución tampón pH = 7,00, Crison, cat. nº 23-111-02.
14. Electrolito (KCl 3 M + AgCl), Crison, cat. nº 95-01.
15. Etilenglicol, C₂H₆O₂, PA, Panreac.
16. Extracto de levadura, BD, Ref. 212750.
17. Extracto de malta, Merck, Ref. 1.05391.0500.
18. Fenol, (C₆H₅OH), PA, Carlo Erba.
19. Fosfato diácido de potasio, KH₂PO₄, PA, Panreac.
20. Fosfato sódico monoácido 12-hidrato, Na₂HPO₄·12H₂O, PA, Merck.
21. Lana de vidrio lavada, pura, Panreac.
22. Lauril sulfato sódico, C₁₂H₂₅ SO₄Na, 95%, Sigma.
23. N-Cetil-N, N, N-trimetil amonio bromuro, C₁₉H₄₂NBr, PA, Panreac.
24. Peptona de caseína, riqueza del 80%, Merck, Ref. 7216.
25. Silicona pasta A, QP, Panreac.
26. Silicona pasta B, QP, Panreac.
27. Sodio fosfato monoácido dodecahidratado, (Na₂HPO₄·12H₂O), PA, Merck.
28. Sodio hidróxido, NaOH, PA, Panreac.
29. Sulfato amónico, (NH₄)₂SO₄, QP, Probus.
30. Sulfato de magnesio 7-hidrato, MgSO₄·7H₂O, 99,5%, PA, Carlo Erba.
31. Sulfito sódico 7-hidrato, Na₂SO₃·7H₂O, PA, Panreac.
32. Sulfito sódico 7-hidrato, Na₂SO₃·7H₂O, RPE, Carlo Erba.
33. Sulfito sódico anhidro, Na₂SO₃, Panreac.
34. Tartrato sódico-potásico, COOK (CHOH)₂COONa·H₂O, PA, Carlo Erba.
35. Tetraborato sódico 10-hidrato, Na₂B₄O₇·10 H₂O, PRS, Panreac.

También fueron empleados los siguientes 'kits' de análisis:

1. Reactivo enzimático para la determinación de ácido acético.
Böehringer Mannheim, nº catálogo 148261.
2. Reactivo enzimático para la determinación de D-glucosa.
Spinreact, Cod. 1001190.
3. Reactivo enzimático para la determinación de D-sorbitol/xilitol.

Böehringer Mannheim, nº catálogo 670057.

4 Reactivo enzimático para determinación de etanol.

Böehringer Mannheim, nº catálogo 176290.

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Caracterización de los residuos sólidos

La fracción de hueso inicial, así como los residuos sólidos que quedan después de las hidrólisis, se han caracterizado en los siguientes parámetros: humedad y materia volátil, celulosa, hemicelulosa, lignina, cenizas y extractos. Los extractos se determinan por diferencia entre 100 y los porcentajes correspondientes a celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas.

3.2.1.1 Humedad y materia volátil

Se determina a partir de la pérdida de peso que experimenta una muestra de residuo cuando se somete a una temperatura de $105\pm 1^\circ\text{C}$ durante el tiempo suficiente para que se alcance pesada constante, norma TAPPI T 11 m-59. El procedimiento operatorio se especifica a continuación.

En una cápsula Petri, previamente tarada, se pesa aproximadamente 1 g de residuo, y éste se introduce en una estufa a 105°C para su secado. Antes de realizar cada pesada, el pesa-sustancias se lleva a un desecador para alcanzar la temperatura ambiente y evitar simultáneamente la incorporación de humedad. El proceso de secado-pesado se repite hasta obtener pesada constante.

El contenido en humedad y materia volátil (%*HMV*) se determina por diferencia entre el peso de la muestra inicial y del material secado en estufa, y queda referido, en %, a la muestra original.

$$\% \text{ HMV} = \frac{P_{mh} - P_{ms}}{P_{mh}} \cdot 100 \quad \text{Ec. [3.1]}$$

Siendo,

p_{mh} = peso de la muestra húmeda, g.

p_{ms} = peso de la muestra seca, g.

3.2.1.2 Fibra Neutro Detergente (FND)

La FND es el resto insoluble, correspondiente a lignina, celulosa y hemicelulosa, que se obtiene tras someter una muestra de biomasa a ebullición lenta con disolución neutro detergente. La disolución neutro detergente se prepara como sigue: se disuelven 37,2 g de $\text{Na}_2(\text{EDTA})$ y 13,6 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ en agua ultra-pura calentando suavemente. Se añaden 60 g de lauril sulfato

sódico y 20 cm³ de etilenglicol. Aparte se disuelven 9,12 g de fosfato monoácido de sodio que se unen a la primera disolución, enrasándose a 2 litros con agua ultra-pura.

El procedimiento operatorio es el establecido por Van Soest y Wine (1967):

Se pesa 1 g de muestra de biomasa, se le añaden 100 cm³ de disolución neutro detergente, 5 gotas de decalina (que actúan como anti-espumante) y, aproximadamente, 0,5 g de sulfito sodio. La mezcla se somete a ebullición durante una hora. A continuación, la suspensión se filtra a vacío a través de una placa porosa, previamente tarada. El sólido retenido se lava varias veces con agua caliente y después con acetona, secando en estufa a 105±1°C hasta pesada constante.

$$\% FND = \frac{p_1}{w_1} \cdot 100 \quad \text{Ec. [3.2]}$$

Siendo,

%FND = contenido en FND de la muestra, %.

p₁ = peso de la fracción insoluble, g.

w₁ = peso de la muestra seca, g.

3.2.1.3 Fibra Ácido Detergente (FAD)

Esta fracción corresponde al residuo formado por lignina y celulosa que se obtiene tras someter una muestra a ebullición con disolución ácido detergente. La disolución ácido detergente se prepara como sigue: se disuelven 20 g de bromuro de N-cetil-N,N,N,-trimetilamonio en ácido sulfúrico (1 N) enrasado a 1 litro.

El procedimiento operatorio viene descrito por Van Soest y Wine (1967): se pesa 1 g de muestra de biomasa, se le 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, el sistema se filtra a vacío a través de una placa porosa, previamente tarada, y el residuo sólido recuperado se lava varias veces con agua caliente, y después con acetona, secando finalmente en estufa a 105±1°C hasta pesada constante.

$$\% FAD = \frac{p_2}{w_2} \cdot 100 \quad \text{Ec. [3.3]}$$

Siendo,

%FAD = contenido en FAD de la muestra, %.

p₂ = peso de la fracción insoluble, g.

w₂ = peso de la muestra seca, g.

3. Parte experimental

La determinación de FAD es importante, pues permite calcular la hemicelulosa presente en el material por diferencia con la FND, y la fracción celulósica, por diferencia con la lignina.

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \% \text{ FND} - \% \text{ FAD} \quad \text{Ec. [3.4]}$$

$$\% \text{ Celulosa} = \% \text{ FAD} - \% \text{ Lignina} \quad \text{Ec. [3.5]}$$

3.2.1.4 Lignina

La lignina representa el llamado “material de incrustación”, que forma parte de la pared celular. Según el método aplicado, la lignina se define como el constituyente de la madera insoluble en ácido sulfúrico del 72%. Para su determinación se ha aplicado la norma TAPPI T 222 os-74.

El procedimiento operatorio es el siguiente: se pesa una muestra de aproximadamente 1 g de hueso, se lleva a un vaso de precipitado de 50 cm³ de capacidad y se adicionan 15 cm³ de H₂SO₄ al 72%. Durante la dispersión del material se mantiene el vaso cubierto por un vidrio de reloj a 20°C, durante 2 horas, removiendo frecuentemente. Transcurrido este tiempo el contenido del vaso se vierte en un matraz donde se lleva a 575 cm³ con agua destilada. A continuación, se hierve la disolución durante 4 horas manteniendo constante el volumen mediante un condensador de reflujo. Se deja que el material insoluble deposite y se filtra a vacío mediante una placa porosa provista de una mata de lana de vidrio, puesto que la lignina suele formar dispersiones coloidales que obstruyen los poros de la placa, lavándola posteriormente con agua caliente. Por último, se seca la lignina, junto con la placa, en estufa a una temperatura de 105±1°C hasta pesada constante.

$$\% \text{ Lignina} = \frac{p_3}{w_3} \cdot 100 \quad \text{Ec. [3.6]}$$

Siendo,

$\% \text{ Lignina}$ = contenido en lignina de la muestra, %.

p_3 = peso de la fracción insoluble, g.

w_3 = peso de muestra seca, g.

3.2.1.5 Cenizas

Es el residuo que queda tras someter una muestra de residuo a una alta temperatura el tiempo necesario para incinerarla, TAPPI T 15 os-58. El procedimiento operatorio es el siguiente: en crisoles de porcelana, previamente tarados, se pesa entre 0,5 g y 1,0 g de hueso que se lleva a un horno de mufla (Thermolyne, tipo 1300) para su calcinación a una temperatura de 575±1°C

durante 5 horas. Posteriormente, el residuo se deja enfriar. El tanto por ciento de cenizas se determina respecto al peso de muestra seca inicial.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P_c}{P_{ms}} \cdot 100 \quad \text{Ec. [3.7]}$$

Siendo,

$\% \text{ Cenizas}$ = contenido en materia mineral de la muestra, %.

p_c = peso de las cenizas, g.

p_{ms} = peso seco de la muestra original, g.

3.2.2 Caracterización de los hidrolizados líquidos

3.2.2.1 Medida de pH

Para la medida de pH se ha utilizado un medidor de la marca comercial Crison (mod. 2001), con un electrodo combinado, sensible a los hidrogeniones, formado por un indicador de vidrio (varilla de plata recubierta de cloruro de plata) y otro de referencia, ambos montados en un solo cuerpo.

3.2.2.2 Método de Miller para la determinación de azúcares reductores totales

El método de Miller está basado en la reacción entre el grupo reductor aldehído de los azúcares y el reactivo dinitrosalicílico (DNS) que origina un compuesto coloreado (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico) en una relación 1:1 cuya concentración y, por tanto, la de los reductores presentes, puede determinarse aplicando un método fotolorimétrico, Miller (1959).

La composición del reactivo DNS, para un volumen final de 1 dm³, es la siguiente: ácido 3,5-dinitrosalicílico (10 g), fenol (2 g), tartrato sódico-potásico (200 g), sulfito sódico (0,5 g) y disolución de NaOH, al 2% (500 cm³). El volumen se completa utilizando agua ultra-pura como disolvente.

El procedimiento para la determinación de azúcares reductores totales consta de las siguientes etapas:

1. Se introducen 2 cm³ de muestra (2 cm³ de agua ultra-pura en el caso del blanco) en un tubo de ensayo.
2. Se adicionan 3 cm³ de reactivo DNS y el sistema resultante se calienta en un baño de agua a 80-85°C durante 10 minutos.
3. Se deja enfriar la muestra en un baño de agua fría durante 10 minutos.

4. Se mide la absorbancia, frente al blanco, a una longitud de onda de 640 nm.

La concentración de azúcares reductores totales se calcula a partir de una recta `patrón´ realizada con disoluciones de concentración conocida, la cual se prepara en paralelo con las muestras cada vez que se realizan las medidas. Los patrones utilizados han sido de 50, 80, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/dm³ de disolución de D-xilosa y D-glucosa puros en igual proporción.

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 las diluciones correspondientes.

3.2.2.3 Método enzimático para la determinación de D-glucosa

El método usado ha sido el de Trinder (1969). El procedimiento analítico se basa en las siguientes reacciones:

GOD



La D-glucosa es oxidada hasta gluconato por el enzima glucosa-oxidasa (GOD), con la formación simultánea de peróxido de hidrógeno.

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, de D-glucosa, se determina a través de la absorbancia a una longitud de onda de 505 nm.

El protocolo experimental consta de las siguientes etapas:

1. Se prepara la disolución de reactivo (“Spinreact”) disolviendo los contenidos de dos disoluciones de partida para la determinación de D-glucosa. Una contiene fenol y tampón TRIS (pH = 7,5) y otra los enzimas GOD y POD, y 4-AF.

2. Se introducen 10 µL de muestra en una cubeta de 1 cm de paso de luz, mientras que en otra cubeta se disponen 10 µL de una disolución estándar de D-glucosa de concentración 1 g/dm³.

3. Se añade 1 cm³ de la disolución de reactivo.

4. Se deja completar la reacción durante 30 minutos, tras los cuales se mide la absorbancia a 505 nm frente a un blanco que contiene sólo 1 cm³ de reactivo.

El método es lineal hasta concentraciones de 5 g/dm³ de D-glucosa. Para valores superiores se realiza la dilución correspondiente con agua ultrapura. La concentración de D-glucosa se calcula mediante la ecuación,

$$C_G = \frac{A_m}{A_s} \cdot C_s \quad \text{Ec. [3.10]}$$

donde:

C_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

3.2.2.4 Detección amperométrica de carbohidratos e hidroximetilfurfural (HMF)

La identificación y determinación cuantitativa de azúcares e hidroximetilfurfural se realiza mediante la técnica de cromatografía iónica acoplada a un detector de pulsos amperométricos (HPLIC). El equipo utilizado (Dionex ICS 3000, Sunnyvale, CA, USA) permite trabajar en un amplio rango de pH, utilizando como eluyente NaOH, 2mM. Los carbohidratos, al ser ácidos débiles, se ionizan parcial o totalmente, y pueden ser, por tanto, separados e identificados mediante un detector amperométrico. En los cromatogramas realizados se han detectado picos relativos a L-arabinosa, D-galactosa, D-xilosa y D-glucosa. La calibración del equipo se llevó a cabo con disoluciones puras de estos carbohidratos. También se detectó, y utilizó en los análisis, un pico cromatográfico característico del furano 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). Las condiciones de análisis han sido las siguientes:

Caudal de disolución de NaOH	1 cm ³ /min
Volumen inyectado	20 mm ³
Temperatura del detector	30 °C

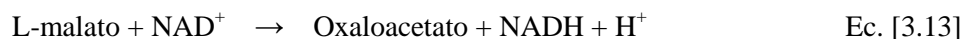
La separación de especies a analizar se efectúa en un módulo cromatográfico equipado con una columna CARBOPAD PA20 (3 x 150 mm) y una pre-columna CARBOPAD PA20 (3 x 30 mm).

3.2.2.5 Método para la determinación de ácido acético

El procedimiento seguido se basa en el método enzimático descrito por Bergmeyer y Möllering (1974), que consta de las siguientes reacciones:



L-MDH



El ácido acético (acetato) es convertido a acetil-CoA en presencia del enzima acetil-CoA sintetasa (ACS), adenosín 5-trifosfato (ATP) y coenzima A (CoA), Ec. [3.11]. En esta reacción, el ATP pasa a adenosín-monofosfato (AMP). El acetil-CoA reacciona con oxalacetato y agua para dar lugar a citrato y coenzima A (CoA), Ec. [3.12]. En un último paso, se obtiene NADH de la reacción entre L-malato y dinucleótido nicotinamida-adenina (NAD) en presencia del enzima L-malato deshidrogenasa (L-MDH). La determinación de ácido acético está basada en la medida de la absorbancia del NADH producido a 340 nm.

El procedimiento operatorio consta de las siguientes etapas:

1. En una cubeta de 1 cm de paso de luz se introducen 0,5 cm³ de tampón trietanolamina (pH = 8,4) y 0,1 cm³ de la disolución que contiene ATP, CoA y NAD.
2. Se añaden 50 µL de muestra.
3. Se añaden 0,95 cm³ de agua ultrapura (1 cm³ para el blanco).
4. Se mide la absorbancia a 340 nm (A₀).
5. Se añaden 5 µL de la suspensión que contiene L-MDH y CS (citrato cintasa).
6. Se agita y, tras esperar 3 minutos, se mide la absorbancia a 340 nm (A₁).
7. Se añaden 10 µL del liofilizado de ACS.
8. Se deja completar la reacción durante 15 minutos y se mide la absorbancia a 340 nm (A₂).

La concentración de ácido acético no es directamente proporcional a la del NADH producido. Para determinarla hay que utilizar la expresión,

$$A_C = \frac{V_{Ac} PM_{Ac}}{\epsilon_{Ac} d v_{Ac} 1000} \cdot \Delta A \quad \text{Ec. [3.14]}$$

donde:

Ac = concentración de ácido acético, g/dm³

V_{Ac} = volumen final, cm³

PM_{Ac} = peso molecular del ácido acético, g/mol

$$\Delta A = \left[(A_2 - A_0)_{\text{muestra}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{muestra}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{muestra}}} \right] - \left[(A_2 - A_0)_{\text{blanco}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{blanco}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{blanco}}} \right] \quad \text{Ec. [3.15]}$$

ϵ_{Ac} = coeficiente de extinción del NADH a 340 nm, igual a $6,3 \text{ dm}^3/(\text{mM}\cdot\text{cm})$

d = paso de luz, cm

v_{Ac} = volumen de muestra, cm^3

Sustituyendo los valores de cada uno de los parámetros en la ecuación [3.14] resulta:

$$Ac = 0,3079 \cdot \Delta A \quad \text{Ec. [3.16]}$$

3.2.2.6 Contenido de oligosacáridos

El procedimiento seguido se basa en el desarrollo de los siguientes pasos:

1. La muestra de hidrolizado, a la que se le quiere determinar los oligosacáridos, es centrifugada durante 20 minutos. Tras esta etapa, se utiliza sólo el sobrenadante.

2. Se preparan seis tubos de vidrio, limpios y secos, con tapón roscado. En ellos se introducen 10 cm^3 de hidrolizado y ácido sulfúrico de forma que se obtenga una concentración final, en H_2SO_4 , igual al 4 % en peso.

3. Tras agitar los tubos, estos se llevan a autoclave donde son calentados, a 115°C , durante 60 minutos.

4. Tras el tratamiento ácido los tubos se enfrían, y su contenido se analiza en azúcares reductores totales, mediante el método de Miller (apartado 3.2.2.2), o en carbohidratos simples, mediante detección amperométrica (apartado 3.2.2.4).

5. El incremento en la concentración de azúcares reductores totales, causados por la post-hidrólisis, es una medida de la concentración de oligómeros del hidrolizado inicial (Garrote et al., 2002).

3.2.3 Caracterización en el transcurso de la fermentación

3.2.3.1 Biomasa

La concentración celular se calcula a partir de una recta de calibrado que, obtenida previamente (Bravo et al., 1995), relaciona el peso seco de biomasa con la absorbancia de la suspensión celular. La ecuación de calibrado experimental, para la levadura *P. tannophilus*, es la siguiente:

$$x = 0,2095 \cdot (A_{620}) + 2,04 \cdot 10^{-4} \quad r^2 = 0,991 \quad \text{Ec. [3.17]}$$

donde,

x = concentración de biomasa, g/dm³

A_{620} = absorbancia a 620 nm

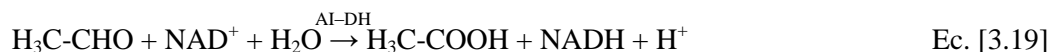
Las medidas de absorbancia se han realizado utilizando un espectrofotómetro UNICAM (mod. UV2). Cuando la absorbancia esperada se encuentra por encima del rango de linealidad se realiza la dilución correspondiente con medio de cultivo (Lindegren et al., 1958).

3.2.3.2 Sustratos

Los sustratos que consume la levadura durante los experimentos de fermentación son determinados mediante los métodos descritos en los apartados anteriores (3.2.2.3, 3.2.2.4 y 3.2.2.5).

3.2.3.3 Etanol

El método enzimático empleado es el propuesto por Beutler y Michal (1977) y por Beutler (1984), y está basado en las siguientes reacciones:



El etanol es oxidado a acetaldehído por el NAD^+ (dinucleótido nicotinamida-adenina) mediante la enzima alcohol-deshidrogenasa (ADH), Ec. [3.18]. El equilibrio de esta reacción se desplaza hacia la derecha al trabajar en condiciones alcalinas, y si se retira del medio de reacción el acetaldehído formado.

El acetaldehído se oxida cuantitativamente a ácido acético en presencia de la enzima aldehído deshidrogenasa (AI-DH), Ec. [3.19]. El NADH se determina por medida 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 introducen 1,5 cm³ de la disolución tampón de difosfato potásico (pH= 9,0) que contiene NAD y AI-DH.
2. Se añaden 0,05 cm³ de muestra.
3. Se mide la absorbancia a 340 nm, A_{E1} .

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_{E2}.

El método es aplicable para concentraciones por debajo de 0,06 g/dm³. Para valores superiores se realiza la correspondiente dilución de muestra. La concentración de etanol se calcula aplicando la expresión,

$$E = \frac{V_E \cdot PM_E}{\epsilon_E \cdot d \cdot v_E \cdot 2000} \cdot \Delta A_E \cdot F \quad \text{Ec. [3.20]}$$

Siendo:

E = concentración de etanol, g/dm³

V_E = volumen final, cm³

PM_E = peso molecular del etanol, g/mol

ΔA_E = (A_{E2} - A_{E1})_{muestra} - (A_{E2} - A_{E1})_{blanco}

F = factor de dilución

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

d = paso de luz, cm

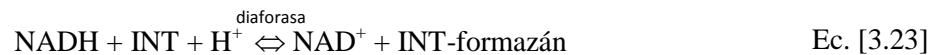
v_E = volumen de muestra, cm³

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

$$E = 0,113 \cdot \Delta A_E \cdot F \quad \text{Ec. [3.21]}$$

3.2.3.4 Xilitol

El método enzimático empleado es el propuesto por Beutler y Becker (1977), el cual se basa en el desarrollo de las reacciones químicas [3.22] y [3.23],



El xilitol es oxidado a D-xilulosa por el NAD⁺ (dinucleótido nicotiamida-adenina) mediante el enzima sorbitol-deshidrogenasa (SDH), Ec. [3.22], 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.

3. Parte experimental

El NADH reduce cuantitativamente el cloruro de iodotetrazolio (INT, $C_{19}H_{13}IClN_5O_2$) hasta INT-formazán ($C_{19}H_{14}IN_5O_2$) en presencia del enzima diaforasa, Ec. [3.23]. El INT-formazán se determina por medidas de absorbancia a 492 nm.

El procedimiento operatorio consta de las siguientes etapas:

1. En una cubeta de 1 cm de paso de luz se introducen una disolución-reactivo formada por $0,5 \text{ cm}^3$ de un tampón de fosfato potásico/trietanolamina (pH = 8,6), $0,2 \text{ cm}^3$ de una disolución de diaforasa y $0,2 \text{ cm}^3$ de una disolución de INT.

2. Se añaden $0,1 \text{ cm}^3$ de muestra y $1,90 \text{ cm}^3$ de agua ultrapura.

3. Se mide la absorbancia, A_1 .

4. Se añaden $0,05 \text{ cm}^3$ 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 $0,10 \text{ g/dm}^3$, por lo que para valores superiores se realiza la dilución correspondiente. La concentración de xilitol se calcula con la expresión,

$$X_i = \frac{V_{X_i} \text{ PM}_{X_i}}{\varepsilon_{X_i} d v_{X_i} 1000} \cdot \Delta A_{X_i} \cdot F \quad \text{Ec. [3.24]}$$

donde:

X_i = concentración de xilitol, g/dm^3

V_{X_i} = volumen final, cm^3

PM_{X_i} = peso molecular del xilitol, g/mol

$\Delta A_{X_i} = (A_2 - A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco}}$

F = factor de dilución

ε_{X_i} = coeficiente de extinción del INT-formazán a 492 nm, $19,9 \text{ dm}^3/(\text{mM} \cdot \text{cm})$

d = paso de luz, cm

v_{X_i} = volumen de muestra, cm^3

Sustituyendo los valores de cada uno de los parámetros en la Ec. [3.24], resulta:

$$X_i = 0,2332 \cdot \Delta A_{X_i} \cdot F \quad \text{Ec. [3.25]}$$

3.3 Instalaciones experimentales

Todo el trabajo experimental se ha llevado a cabo en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén. Los principales equipos empleados se describen a continuación.

3.3.1 Trituración y tamizado de sólidos

Tanto los huesos fragmentados de aceituna, recibidos de la almazara, como los residuos sólidos generados tras la aplicación de distintos tratamientos a las muestras originales, fueron secados dentro del laboratorio a temperatura ambiente. El tiempo de secado fue lo suficientemente prolongado como para garantizar que los sólidos adquirieron la humedad de equilibrio. Posteriormente, los materiales secos sufrieron una etapa de molturación. El molino utilizado fue de cuchillas, Retsch (mod. SM1). Una vez concluida la trituración, el material se clasificó por tamaño de partícula mediante una tamizadora Retsch (mod. Vibro). El objeto de esta operación estriba en la necesidad de obtener sólidos con un tamaño adecuado para aplicar los métodos de caracterización descritos en el apartado 3.2.1. De esta forma, el ataque químico de los reactivos, necesario para la determinación de celulosa, hemicelulosa y lignina, se lleva a cabo de manera uniforme en toda la extensión de sólido, lográndose una reacción completa en toda la masa de muestra. En concreto, los métodos analíticos antes referenciados deben ser aplicados sobre partículas de diámetro comprendido entre 0,425 y 0,600 mm (40 y 30 mallas ASTM, respectivamente).

3.3.2 Reactor a presión para hidrólisis a alta temperatura

Los experimentos de hidrólisis no enzimática se han realizado en un reactor a presión de la casa comercial Parr (modelo 4522). El equipo es un depósito de acero inoxidable AISI-316 de geometría cilíndrica y 2.000 cm³ de capacidad máxima aunque, por seguridad, el volumen de carga no ha de superar los 1.043 cm³. El reactor opera en discontinuo y dispone de un agitador con dos turbinas tipo Rushton. El equipo permite trabajar a una presión máxima de 1.900 psi, aunque ésta está limitada por un disco de ruptura que se abre a 1.400 psi (equivalentes a 300°C en medio acuoso).

Anexo al reactor, se dispone de un controlador digital que permite programar la temperatura máxima de trabajo, la potencia calefactora y la velocidad de agitación. El controlador dispone de tres ventanas digitales a través de las cuales se visualiza, en tiempo real, la temperatura, la presión y el grado de agitación dentro del reactor.

A continuación se incorpora una fotografía del reactor a presión.



Figura 3.1 Reactor discontinuo a presión

3.3.3 Equipo para la post-hidrólisis

Los equipos necesarios para caracterizar oligosacáridos mediante post-hidrólisis ácida, de acuerdo con el apartado 3.2.2.6, son:

- Centrífuga vertical Selecta (mod. Mixtasel), operando a 3.000 rpm.
- Tubos de vidrio Pyrex, con tapón de rosca (50 cm³ de volumen).
- Autoclave Raype (mod. AE-110).
- Espectrofotómetro Unicam (mod. UV2).

3.3.4 Acondicionamiento del hidrolizado

Previamente a la fermentación, los hidrolizados deben ser sometidos a un acondicionamiento para que la levadura actúe de manera apropiada. Se pretende, por un lado, eliminar sólidos existentes en el seno de la fase líquida, así como inhibidores microbianos que resultan de la descomposición térmica de los carbohidratos. Además, el acondicionamiento puede aumentar, por evaporación de agua, la concentración de azúcares para situarla en el nivel apropiado al comienzo de cada bioproceso. Los equipos necesarios para lograr estos propósitos son:

- a) Centrífuga vertical Selecta (mod. Mixtasel). Se emplea a su máxima potencia.
- b) Rotavapor Büchi (mod. R-114 y B-480). Se controla la temperatura para que no supere 45°C; de esta manera, se minimiza la posible caramelización de los azúcares. La utilización del rotavapor se realizará sólo sobre aquellos hidrolizados en los que se obtenga una baja concentración de azúcares ya que su empleo, incluso a bajas temperaturas, puede provocar alteraciones en el hidrolizado más allá de la simple concentración de especies.

3.4 Procedimiento experimental

3.4.1 Tratamiento a presión

Los experimentos diseñados pretenden poner de manifiesto la influencia que tienen ciertas variables cuando el pretratamiento se aplica sobre huesos de aceituna. Las variables estudiadas han sido:

- ❖ *Medio hidrolítico*: agua, disolución de ácido sulfúrico y disolución de ácido nítrico.
Tras el análisis de resultados, se seleccionó el ácido sulfúrico como agente de hidrólisis más adecuado, y se continuó con el estudio de variables.
- ❖ *Temperatura máxima de tratamiento*: intervalo 180-220°C.
- ❖ *Tiempo de tratamiento a la máxima temperatura*: intervalo 0-8 minutos.
- ❖ *Concentración de ácido*: 0,010 y 0,025 M.
- ❖ *Relación sólido/líquido*: intervalo 1/2-1/6 (p/v).

Una vez cargado el reactor con la cantidad oportuna de huesos fragmentados, y con 300 cm³ de medio hidrolítico, se procede a su cierre y a la puesta en marcha del sistema de agitación (250 rpm). Posteriormente, y de forma simultánea, se conectan las resistencias eléctricas, necesarias para calentar la suspensión de endocarpios, y un cronómetro que permitirá cuantificar las velocidades de calentamiento y enfriamiento durante los tratamientos. Una vez alcanzada y mantenida, durante el tiempo apropiado, la temperatura final de cada ensayo, se procede al enfriamiento del reactor. Para ello, en primer lugar, se hace circular agua de la red a través de un serpentín interior hasta que la temperatura desciende por debajo de 100°C. Posteriormente, el vaso del reactor es introducido en un baño de hielo hasta que su interior alcanza temperatura ambiente. Por último, el reactor se abre procediéndose a separar, mediante filtración, el residuo sólido y el hidrolizado líquido. En esta fase, el sólido es sometido a un lavado con abundante agua a fin de recuperar los azúcares, y otros compuestos, que hayan quedado retenidos sobre su superficie. Finalmente, el residuo se extiende sobre una superficie plana y, una vez seco, se pesa y caracteriza. El hidrolizado líquido se almacena en congelador a -24°C, en espera de su análisis.

3.4.2 Severidades de tratamiento

El empleo de factores encargados de evaluar la severidad de los tratamientos hidrotérmicos proporciona un camino simple para comparar experimentos realizados bajo distintas condiciones de operación. En este sentido, uno de los parámetros más ampliamente utilizados ha sido el factor R_0 , propuesto por Overend y Chornet (1987) para tener en cuenta, al fraccionar la biomasa con vapor de agua, el efecto combinado de las variables “tiempo” y “temperatura” en

el proceso de degradación de polisacáridos. Posteriormente, el uso de R_0 se ha extendido al estudio de tratamientos con agua caliente a presión, e incluso a tratamientos con ácidos inorgánicos diluidos.

Si se supone que un polisacárido (reactivo P) se hidroliza en un medio acuoso a alta temperatura de forma irreversible de acuerdo con una ecuación de orden n, y la constante de velocidad responde, en cuanto a su comportamiento con la temperatura, a una expresión de tipo Arrhenius. Se podría expresar de la forma,

$$-\frac{dC_P}{dt} = k_0 \cdot \exp\left[-\frac{E_a}{R \cdot T}\right] \cdot C_P^n \quad \text{Ec. [3.26]}$$

donde:

C_P = concentración del polisacárido

t = tiempo de reacción

k_0 = factor preexponencial

E_a = energía de activación

R = constante de los gases

T = temperatura absoluta

n = orden de reacción

Si se reordenan términos,

$$-\frac{1}{C_P^n} \frac{dC_P}{dt} = k_0 \cdot \exp\left[-\frac{E_a}{R \cdot T}\right] \quad \text{Ec. [3.27]}$$

y se aplica un desarrollo de Taylor para $T = T_r$,

$$\ln\left[-\frac{1}{C_P^n} \frac{dC_P}{dt}\right] \cong \ln k_0 - \frac{E_a}{R \cdot T_r} + \left[\frac{E_a}{R \cdot T_r^2} \cdot (T - T_r)\right] \quad \text{Ec. [3.28]}$$

$$-\frac{1}{C_P^n} \frac{dC_P}{dt} = k_0 \cdot \exp\left[-\frac{E_a}{R \cdot T_r}\right] \cdot \exp\left[\frac{(T - T_r)}{W}\right] \quad \text{Ec. [3.29]}$$

donde,

$$W = (R \cdot T_r^2)/E_a$$

T_r = temperatura de referencia al aplicar la serie de Taylor

separando variables e integrando se obtendría,

$$-\int_{C_{P0}}^{C_{Pf}} \frac{dC_P}{C_P^n} = k_r \cdot R_0 \quad \text{Ec. [3.30]}$$

en la que R_0 y k_r se evalúan de acuerdo con las expresiones [3.31] y [3.32].

$$R_0 = \int_0^t \exp \left[\frac{T - T_r}{W} \right] dt \quad \text{Ec. [3.31]}$$

y

$$k_r = k_0 \cdot \exp \left[-\frac{E_a}{R \cdot T_r} \right] \quad \text{Ec. [3.32]}$$

Para un gran número de sistemas lignocelulósicos, entre ellos el hueso de aceituna (Fernández-Bolaños et al., 2001), se ha trabajado con un valor de 'w' igual a 14,75. Estrictamente hablando, en un proceso de autohidrólisis cada residuo y sus fracciones constitutivas tendrán distintos valores de 'w'. Suponer un valor de 14,75 implica asumir una energía de activación aparente de 78,4 kJ/mol.

T_r no tiene un peso importante en la determinación de R_0 , siempre que no existan transformaciones severas del material por debajo de la temperatura elegida (Garrote et al., 2002). De esta manera, si se adopta un valor igual a 100°C (considerando que por debajo de esta temperatura no se producen alteraciones significativas en la estructura de los polisacáridos, Tortosa et al., 1995), R_0 se calcularía aplicando la Ec. [3.33],

$$R_0 = \int_0^t \exp \left[\frac{T(t) - 100}{14,75} \right] dt \quad \text{Ec. [3.33]}$$

donde:

$T(t)$ = Función que liga la temperatura del sistema de reacción con el tiempo de tratamiento

t = tiempo de tratamiento, min

Los tratamientos a alta temperatura aplicados sobre el hueso de aceituna, en el presente trabajo experimental, se han llevado a cabo, en algunos casos, manteniendo la temperatura máxima durante un tiempo determinado y, en otros, procediendo a enfriar la carga del reactor justo al alcanzarse dicha temperatura. En cualquier caso, debido a que es inevitable (por las limitaciones técnicas del equipo) la existencia de periodos de calentamiento y enfriamiento de duración significativa, en el cálculo del factor de severidad se emplea la siguiente expresión,

$$(R_0)_{\text{total}} = (R_0)_{\text{calentamiento}} + (R_0)_{\text{mantenimiento}} + (R_0)_{\text{enfriamiento}} \quad \text{Ec. [3.34]}$$

Es decir, el factor de severidad global se determina como suma de los factores de severidad individuales de cada etapa.

Para la región de calentamiento se ajustan los valores de temperatura a una función lineal ($T = a + b t$). De esta forma la ecuación [3.34] se transforma en la [3.35].

$$(R_0)_{\text{calentamiento}} = \frac{14,75}{b} \cdot \left[\exp \left[\frac{a - 100 + (b \cdot t_1)}{14,75} \right] - \exp \left[\frac{a - 100}{14,75} \right] \right] \quad \text{Ec. [3.35]}$$

Donde a y b son dos constantes empíricas y t_1 representa el tiempo en el que se alcanza la máxima temperatura del tratamiento.

El tratamiento llevado a cabo a temperatura constante (región de mantenimiento) tiene un factor de severidad calculado mediante la ecuación [3.36].

$$(R_0)_{\text{mantenimiento}} = (t_2 - t_1) \cdot \exp \left[\frac{T_{\text{max}} - 100}{14,75} \right] \quad \text{Ec. [3.36]}$$

donde t_1 representa el tiempo donde se alcanza la máxima temperatura de operación (T_{max}) y t_2 es el tiempo donde comienza el enfriamiento del reactor.

Para la zona en la que se produce el enfriamiento del reactor la función $T(t)$ que se ha usado para el ajuste de los datos experimentales es una ecuación polinómica de tercer grado ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$). Debido a la dificultad para resolver, analíticamente, la integral se opta por aplicar un método numérico de integración (método de los trapecios).

$$(R_0)_{\text{enfriamiento}} = \int_{t_2}^{t_3} \exp \left[\frac{[(d \cdot t^3) + (c \cdot t^2) + (b \cdot t) + a] \cdot 100}{14,75} \right] dt \quad \text{Ec. [3.37]}$$

donde t_2 y t_3 corresponden a los tiempos de comienzo y finalización de la etapa de enfriamiento, respectivamente. El intervalo (t_2-t_3) se divide en 20 sub-intervalos de igual longitud.

Los datos de temperatura y tiempo, para todos los tratamientos a alta temperatura, se encuentran tabulados en el Anexo I. En ese apartado también se pueden encontrar los valores calculados de R_0 , así como las gráficas T vs t para las temperaturas de operación superiores a 100°C .

3.4.3 Metodología de superficies de respuesta

Un diseño factorial de experimentos (Montgomery, 2001) ha sido empleado para el estudio de la hidrólisis ácida, a alta temperatura, del hueso de aceituna. El análisis estadístico de los tratamientos ácidos, así como el análisis de regresión de los resultados obtenidos y la construcción de las correspondientes gráficas de superficies de respuesta se realizó usando el programa Modde 7.0 (Umetri AB, Umeå, Suecia). El ajuste de resultados se llevó a cabo mediante un modelo polinomial de segundo orden,

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^2 b_i \cdot X_i + \sum_{i=1, j=1}^2 b_{ij} \cdot X_i \cdot X_j + \sum_{i=1}^2 b_{ii} \cdot X_i^2 \quad (i < j) \quad \text{Ec. [3.38]}$$

donde Y es cada una de las respuestas estudiadas, b son coeficientes de regresión, y X_i y X_j son las variables (o factores) con sus valores codificados.

La validación estadística se basó en el método ANOVA, con un intervalo de confianza del 95%. El diseño factorial fue del tipo 2^2 ; es decir, se estudió cómo se modifican simultáneamente dos variables entre dos niveles. Este diseño tiene la particularidad de incorporar tres réplicas del punto central y cuatro puntos “estrella” distribuidos a una distancia de $N^{1/2}$ (siendo N el número de variables, en este caso 2) del punto central.

Se llevaron a cabo tres diseños, representados mediante los diagramas indicados en Figura 3.2.

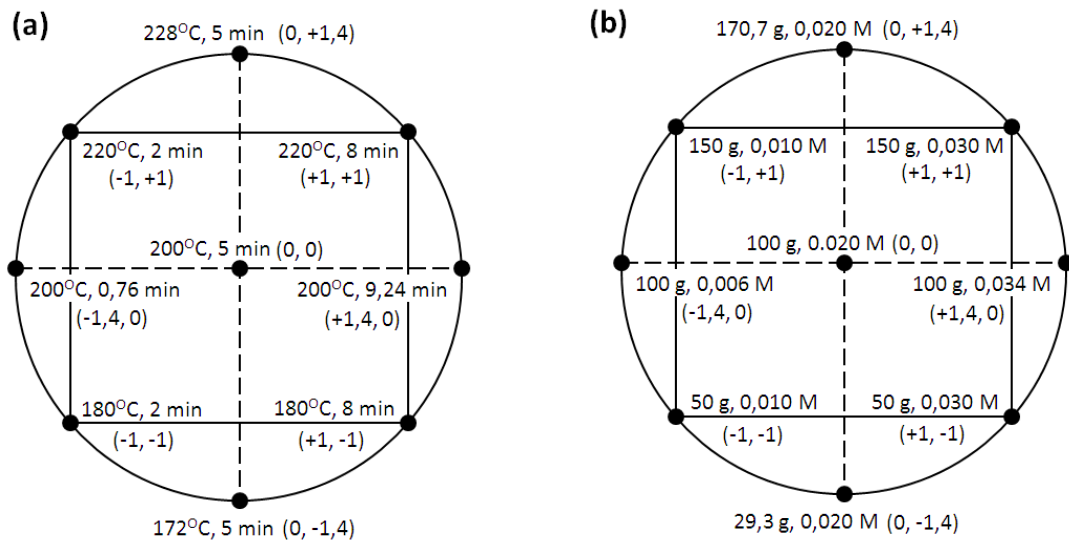


Figura 3.2 Superficies de respuesta para el estudio de la hidrólisis ácida de huesos de aceituna

El diseño representado en la Figura 3.2 (a) se aplicó para estudiar el efecto de la temperatura y del tiempo de hidrólisis cuando los endocarpios de aceituna fueron tratados con ácido sulfúrico diluido. Para analizar el posible efecto del cambio de concentración de ácido, el diseño fue implementado dos veces, correspondientes a dos niveles de concentración: 0,010 y 0,025 M.

La Figura 3.2 (b) muestra las condiciones experimentales utilizadas para analizar el efecto que, sobre la hidrólisis de nuestra biomasa, tienen la concentración de ácido sulfúrico y la carga de hueso.

3.4.4 Hidrólisis enzimática

El residuo sólido seco, generado tras los tratamientos a alta temperatura, fue hidrolizado enzimáticamente. En todas las hidrólisis enzimáticas se mantuvo constante la velocidad de agitación (150 rpm), la temperatura (50°C), el pH del medio (4,8) y la relación sólido/líquido (1/10, p/v). Las variables cuya influencia se pretende estudiar con los procesos de hidrólisis enzimática son:

- ❖ *Carga de enzima*: 10, 20, 40 y 60 UPF/g sólido.
- ❖ *Tamaño de sustrato*.

El residuo sólido seco, generado tras los tratamientos a alta temperatura, fue utilizado, en algunos experimentos de hidrólisis enzimática, con su tamaño original y, en otros, con tamaños resultantes de someter el sustrato original a procesos de molienda y tamizado: < 0,125 mm, 0,125-0,300 mm, 0,425-0,600 mm y > 1,6 mm.

- ❖ *Temperatura máxima del tratamiento a presión*: 190, 195, 200, 205, 210 y 215°C.

Los ensayos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 cm³. En ellos se introdujeron 3 g, en base seca, de sólido pretratado y 30 cm³ de una disolución tampón de citrato, 0,05 M. Los experimentos se prolongaron durante 72 h en un agitador orbital (Ovan, mod. Clear IC10-CE).

Los bioprocesos se llevaron a cabo con preparaciones comerciales de celulasas, de *Trichoderma reesei*, y β-glucosidasas, de *Aspergillus niger*, proporcionadas por Novo Nordisk Bioindustrial (Madrid, España). Dichas preparaciones se comercializan como “Celluclast 1.5L” y “Novozym 188”, respectivamente. La actividad enzimática de “Celluclast 1.5L” fue de 56 UPF/mL, determinada mediante el procedimiento indicado por la comisión de biotecnología de la IUPAC (Ghose, 1987).

A distintos tiempos (4, 10, 24, 48 y 72 h) se recogieron volúmenes de muestra (1 cm³), se procedió a la desnaturalización de la enzima por calentamiento (100°C durante 10 minutos) y posteriormente la concentración de D-glucosa fue analizada mediante el método de Trinder (apartado 3.2.2.3) o mediante detección amperométrica (apartado 3.2.2.4).

El rendimiento de hidrólisis enzimática (Y_{HE} , %) fue calculado mediante la siguiente ecuación,

$$Y_{HE} = \frac{C_G \cdot 0,9 \cdot V}{W_{CEL}} \cdot 100 \quad \text{Ec. [3.39]}$$

donde:

C_G = concentración de D-glucosa, g/dm³

V = volumen de la fase líquida, dm³

W_{CEL} = peso inicial de celulosa en cada reactor, g

Finalizada la hidrólisis, se separó el residuo y el hidrolizado líquido mediante filtración a vacío. El residuo sólido recogido por el filtro se lavó para arrastrar el hidrolizado que pudiera quedar atrapado en él; a continuación, el sólido se extendió sobre una superficie plana para su secado a temperatura ambiente y, una vez seco, se pesó.

3.4.5 Fermentación

La fermentación de los hidrolizados líquidos se llevó a cabo con la levadura no tradicional *Pachysolen tannophilus*. Todos los experimentos de fermentación se realizaron a 30°C y pH 4,5, por ser estos valores óptimos en el crecimiento de este microorganismo (Bravo et al., 1993).

3.4.5.1 Precultivo en medio sólido

Las células de levadura se mantienen en tubos de ensayo de 100 cm³ de capacidad sobre un medio sólido con la composición que se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Composición del medio sólido de cultivo

Compuesto	Concentración, g/dm ³
Extracto de levadura	3
Extracto de malta	3
Peptona	5
D-xilosa	10
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 la disolución a cada tubo de ensayo, se tapa con algodón graso y se esteriliza 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, Telstar (mod. Micro-V), empleando un asa de platino (o de una aleación Ni-Co) y en condiciones estériles. Los tubos inoculados se conservan en estufa de cultivo, Memmert (mod. BE 400), a una temperatura próxima a 20°C. Con una periodicidad de unos 15 días, la levadura se transfiere a un medio sólido fresco.

3.4.5.2 Inóculo líquido

Antes del comienzo de la fermentación (96 h) se procede a la inoculación de la levadura sobre los tubos de ensayo con medio sólido. Los tubos con el inóculo se mantienen durante 60 h en estufa a 30°C con el objeto de conseguir células en un mismo estado de crecimiento. Transcurrido el tiempo señalado, en los tubos debe de existir una cantidad apreciable de biomasa. Posteriormente, se añaden unos 25 cm³ de medio líquido a los tubos y, tras agitar, se consigue una suspensión concentrada de levadura que es transferida a un matraz Erlenmeyer estéril, de 250 cm³, que contiene 100 cm³ de medio líquido rico en D-xilosa. La composición del medio es la que se describe en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Composición del medio líquido de cultivo

Compuesto	Concentración, g/dm ³
Extracto de levadura	4,00
Peptona	3,60
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,00
MgSO ₄ 7 H ₂ O	2,05
KH ₂ PO ₄	2,00
D-xilosa	25,0

Para propagar el inóculo, se procede a cultivar la levadura en agitador orbital durante 24 h a 30°C y 150 rpm. Finalizado este tiempo, las células son recolectadas mediante centrifugación a 7.000 rpm, durante 10 min, mediante una centrífuga Jouan (mod. MR 1822). Las células fueron lavadas repetidamente con disolución de cloruro sódico para eliminar los restos de azúcares que pudieran existir en el medio líquido.

3.4.5.3 Medio de cultivo

Los hidrolizados obtenidos de las hidrólisis enzimáticas necesitan un aporte externo de componentes para garantizar un buen crecimiento de las levaduras. El medio de cultivo utilizado en este estudio es el propuesto por Lindegren et al. (1958) pero diluido a la mitad, Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Composición del medio de cultivo usado en la fermentación de los hidrolizados

Compuesto	Concentración, g/dm ³
Extracto de levadura	2,00
Peptona	1,80
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,50
MgSO ₄ 7 H ₂ O	1,025
KH ₂ PO ₄	1,00

3.4.5.4 Preparación y comienzo del bioproceso

Los matraces Erlenmeyer, portafiltros y restante material se esterilizan en autoclave durante 20 minutos a una temperatura de unos 121°C.

Se prepara el medio de cultivo disolviendo los componentes del mismo (apartado 3.4.5.3) en los hidrolizados hasta un volumen de 500 cm³ y se ajusta el pH. El hidrolizado se filtra para separar sólidos que se forman durante esta última operación. Con la ayuda de una bomba peristáltica, y a través de filtros esterilizados, se transfiere el medio hacia los matraces

Erlenmeyer. A ellos, además, se adicionará el volumen apropiado de inóculo en función de la densidad de células que se requiera en cada experimento. Finalmente, los matraces son pesados y llevados al agitador orbital para el comienzo de la fermentación. La puesta en marcha de la agitación (150 rpm) marca el inicio del cómputo del tiempo de fermentación.

3.4.5.5 Desarrollo y finalización del bioproceso

En el transcurso del trabajo experimental, haciendo uso de micropipeta con punta estéril, se van tomando muestras de 1 cm³ del interior de los matraces. Inmediatamente se centrifuga la muestra (5.000 rpm, 10 minutos) y se recogen 0,75 cm³ de sobrenadante que son congelados (a -24°C) como paso previo a su análisis. La biomasa separada por centrifugación se lava con medio fresco y, tras una segunda centrifugación, se resuspende para determinar la concentración celular. Cada vez que se recoge muestra se procede a pesar los Erlenmeyer para calcular el volumen de agua evaporada y reponerla mediante micropipeta con punta estéril.

La fermentación finaliza tras 168 h de cultivo, tiempo suficiente para que los sustratos del medio sean consumidos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tesis de doctorado
*Tratamientos a presión e hidrólisis del hueso de aceituna.
Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen tannophilus**

4.1 Caracterización del hueso de aceituna

El hueso de aceituna, una vez secado en laboratorio hasta alcanzar la humedad de equilibrio, fue tamizado para determinar la distribución del tamaño de partícula. En la Tabla 4.1 se muestran las fracciones obtenidas, así como el porcentaje en peso que cada una respecto al total.

Tabla 4.1 Fracciones obtenidas tras el tamizado de los huesos de aceituna procedentes de almazara

Diámetro, mm	Porcentaje en peso, %
2,0 – 7,0	80,0
1,6 – 2,0	9,9
1,2 – 1,6	7,4
< 1,2	2,7

Empleando huesos de diámetro comprendido entre 0,425 y 0,600 mm, se procedió a la caracterización química del material. Los parámetros calculados fueron: humedad y materia volátil (HMV), hemicelulosa (HEM), celulosa (CEL), lignina ácido insoluble (LAI), cenizas o materia mineral (CEN) y extractos (EXT), Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Caracterización del hueso de aceituna

Parámetro	Composición, %
Humedad y materia volátil (HMV)	8,9
Hemicelulosa (HEM)	29,0
Celulosa (CEL)	25,9
Lignina ácido insoluble (LAI)	33,3
Cenizas o materia mineral (CEN)	0,71
Extractos (EXT)*	11,1

*Calculados por diferencia hasta 100.

Tal y como se observa, la lignina fue el principal componente encontrado en los endocarpios del fruto del olivo. Esto puede representar un inconveniente para el aprovechamiento de los carbohidratos existentes en la materia prima. Los porcentajes de hemicelulosa y celulosa, siendo considerables, sobre todo en la primera fibra, fueron inferiores al 30%. El porcentaje de xilanos, determinado mediante una modificación del método de Puls et al. (1985), fue del 20,6%. Por último, hay que resaltar el bajo porcentaje de materia mineral en el hueso de aceituna (0,71%), lo que explica la poca generación de cenizas cuando este sólido se emplea en cámaras de combustión para biomasa.

Los datos de composición del hueso son similares a los determinados por Cuevas et al. (2009), HEM-33,9%, CEL-25,3%, LAI-33,5%, CEN-0,75%. Los valores de celulosa y

hemicelulosa de este estudio también son próximos a los determinados por Hodaifa et al. (2013), 27,2 y 32,2%, respectivamente.

4.2 Pretratamientos (PT)

En este apartado se desarrollan 5 series experimentales en las que se analiza el pretratamiento a alta temperatura del hueso de aceituna. La relación de series, y los aspectos estudiados en ellas, se resumen a continuación.

- PT1:** Estudios previos de hidrólisis a presión con agua y ácidos sulfúrico y nítrico.
- PT2:** Optimización de la hidrólisis con ácido sulfúrico (0,010 M): influencia de la temperatura y el tiempo de hidrólisis.
- PT3:** Optimización de la hidrólisis con ácido sulfúrico (0,025 M): efecto de la temperatura y el tiempo de hidrólisis.
- PT4:** Optimización de la hidrólisis con ácido sulfúrico: influencia de la concentración de ácido y la carga de hueso.
- PT5:** Hidrólisis ácidas con altas cargas de sólido (relación Sólido/Líquido igual a 1/3): efecto de la temperatura de hidrólisis.

4.2.1 Estudios previos de hidrólisis a presión con agua y ácidos sulfúrico y nítrico (PT1)

Se han llevado a cabo estudios de hidrólisis a alta temperatura del hueso de aceituna. El reactor operó en discontinuo y se emplearon tres medios hidrolíticos:

- a. Agua pura
- b. Disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M)
- c. Disolución diluida de ácido nítrico (0,025 M)

El principal objetivo de esta serie experimental fue determinar el medio con mayor capacidad para la hidrólisis de las hemicelulosas presentes en la materia prima. Además, las hidrólisis deben conseguir hidrolizados con altas concentraciones de D-xilosa, y sólidos pretratados en los que quede preservada la celulosa.

En esta serie experimental se operó con una relación Sólido/Líquido igual a 1/6 (50 g de hueso seco por cada 300 mL de líquido) y con una velocidad de agitación igual a 250 rpm.

Los pretratamientos se desarrollaron calentando la suspensión 'hueso-medio hidrolítico' hasta llegar a una temperatura de trabajo determinada para, después, enfriar el interior del reactor mediante un serpentín por el que circulaba agua fría. Se intentó minimizar la duración de las etapas de calentamiento y enfriamiento. En cualquier caso, durante los tratamientos, se anotaron las temperaturas a distintos tiempos; de esa forma, se pudo calcular un factor de severidad (R_0) para cada tratamiento, factor que cuantifica la intensidad del ataque sufrido por el

sólido dentro del reactor. En la Tabla 4.3 se muestran, para todos los ensayos de la serie PT1, las velocidades de la fase de calentamiento, así como el valor de R_0 tanto para la región de calentamiento como de enfriamiento.

Tabla 4.3 Pretratamientos PT1. Velocidad de calentamiento ($v_{\text{calent.}}$) y valores de R_0

Experimentos						
Medio hidrolítico	T , °C	$v_{\text{calent.}}$, °C/min	r^2	$(R_0)_{\text{calent.}}$	$(R_0)_{\text{enfriam.}}$	
H ₂ O	200	5,36	1,00	2510	330	
	205	5,63	1,00	3837	507	
	210	5,30	1,00	5061	610	
	220	5,23	1,00	11868	776	
H ₂ SO ₄	200	5,21	1,00	2392	509	
	205	5,16	1,00	3904	312	
	210	5,08	1,00	5285	555	
	220	5,26	1,00	9355	1552	
HNO ₃	200	5,03	1,00	3337	54	
	205	5,27	1,00	3641	427	
	210	5,19	1,00	5392	382	
	220	5,42	1,00	8891	1255	

4.2.1.1 Caracterización del residuo sólido para la serie PT1

El residuo sólido, generado tras los tratamientos a alta temperatura, se lavó repetidamente con agua para el arrastre de los azúcares y otros compuestos que pudieran quedar adheridos a él. Posteriormente, se procedió a su secado a temperatura ambiente, y a su trituración y tamizado con el objeto de obtener sólidos con tamaños de partícula comprendidos entre 0,425 y 0,600 mm. Esa fracción fue empleada para aplicar los procedimientos de caracterización descritos en el Apartado 3.2.1. Antes de la molienda del sólido, éste se pesó para determinar el porcentaje de sólido recuperado durante el tratamiento (RS).

Los pretratamientos llevados a cabo con agua caliente solubilizaron la fracción hemicelulósica del hueso de aceituna a 220°C, lo que provocó una importante pérdida de residuo (39,4%) a esa temperatura (Tabla 4.4). Estos datos están en consonancia con los presentados por Cuevas (2007) en un trabajo en el que se constató la eliminación total de la fracción hemicelulósica del hueso de la aceituna cuando agua caliente actuó sobre el material con factores de severidad ($\log R_0$) iguales o superiores a 4,0. Los porcentajes de lignina en los residuos sólidos se incrementaron con el aumento de temperatura, posiblemente como consecuencia de la baja solubilización de la resina durante los pretratamientos. Este comportamiento condujo, tras el pretratamiento a 220°C, a residuos sólidos con porcentaje de lignina ácido insoluble superior al 40%.

Tabla 4.4 Caracterización del residuo sólido. Pretratamientos con agua

$T, ^\circ\text{C}$	$\log R_o$	RS, %	HMV, %	HEM, %	CEL, %	LAI, %	CEN, %	EXT, %
200	3,45	73,0	5,8	7,1	38,0	33,2	0,00	21,7
205	3,64	69,8	5,6	4,1	37,6	36,4	0,31	21,6
210	3,75	65,5	5,0	1,5	37,0	37,9	0,29	23,3
220	4,10	60,6	4,8	0,0	35,3	41,0	0,29	23,4

A partir de los datos de la Tabla 4.4 pudieron calcularse las conversiones fraccionales de hemicelulosa, celulosa y lignina tras los pretratamientos con agua (Tabla 4.5). La lignina se solubilizó en una extensión parecida tras los ensayos efectuados desde 200°C hasta 220°C, y sus conversiones fraccionales oscilaron entre 23,7 y 27,2%. En el caso de la celulosa, la máxima conversión (17,4%) se logró a 220°C. Esto demuestra la poca capacidad del agua caliente para hidrolizar la estructura celulósica por debajo de 220°C.

Tabla 4.5 Pretratamientos con agua. Conversión fraccional de hemicelulosa, celulosa y lignina.

$T, ^\circ\text{C}$	$\log R_o$	$X_{\text{HEM}}, \%$	$X_{\text{CEL}}, \%$	$X_{\text{LAI}}, \%$
200	3,45	82,1	0,0	27,2
205	3,64	90,1	0,0	23,7
210	3,75	96,6	6,4	25,5
220	4,10	100,0	17,4	25,4

En el caso de operar con disoluciones diluidas de ácido sulfúrico o nítrico (ambas de concentración igual a 0,025 M), el ataque sobre el sólido se incrementó significativamente respecto a la alternativa que utiliza agua. Este comportamiento condujo a pérdidas máximas de sólido del 47,2%, usando ácido sulfúrico, y del 59,0% con ácido nítrico, Tabla 4.6. Se pone de relieve la intensa destrucción que las disoluciones ácidas ejercieron sobre la fracción hemicelulósica incluso a bajas temperaturas relativas. De esta forma, el ácido sulfúrico a 205°C, y el nítrico a 200°C, condujeron a la completa eliminación del heteropolímero (Tabla 4.6).

Tabla 4.6 Caracterización del residuo sólido Pretratamientos con ácidos sulfúrico y nítrico

Medio	$T, ^\circ\text{C}$	$\log R_o$	RS, %	HMV, %	HEM, %	CEL, %	LAI, %	CEN, %	EXT, %
H_2SO_4	200	3,46	63,5	6,2	2,2	37,1	38,1	0,00	22,6
	205	3,62	60,7	4,9	0,0	37,2	40,5	0,00	22,3
	210	3,77	56,6	4,5	0,0	32,2	45,1	0,09	22,6
	220	4,04	52,8	4,7	0,0	31,5	45,0	0,15	23,4
HNO_3	200	3,53	53,1	5,0	0,0	32,7	46,7	0,00	20,6
	205	3,61	51,9	4,8	0,0	33,0	47,1	0,03	19,9
	210	3,76	50,1	5,0	0,0	23,6	51,1	0,29	25,0
	220	4,01	41,0	5,3	0,0	19,9	41,9	0,28	37,9

Con relación a la celulosa y la lignina, el ácido nítrico produjo en esas fracciones alteraciones más intensas que el ácido sulfúrico. Como se observa en la Tabla 4.7, el porcentaje de eliminación de celulosa fue mucho mayor con ácido nítrico que con sulfúrico para cualquiera de las temperaturas ensayadas. Así, por ejemplo, a 200°C la conversión fraccional de celulosa alcanzó el 33,0% con HNO₃ frente al 9,0% con H₂SO₄, mientras que a 220°C el parámetro osciló entre el 68,5 y el 35,8% para nítrico y sulfúrico, respectivamente. En el caso de la lignina, las pérdidas máximas de la resina aromática se lograron a 220°C (X_{LAI} del 28,6% para ácido sulfúrico y del 48,4% para ácido nítrico). Es importante resaltar que la conversión fraccional de lignina no sufrió grandes variaciones cuando se utilizó ácido sulfúrico en todo el intervalo de temperaturas ensayadas, o cuando el ácido nítrico operó desde 200°C hasta 210°C. Sin embargo, este último ácido sí provocó una pérdida de lignina significativa a 220°C.

Tabla 4.7 Pretratamientos con ácidos sulfúrico y nítrico. Conversión fraccional de hemicelulosa, celulosa y lignina

Medio	T, °C	log R _o	X _{HEM} , %	X _{CEL} , %	X _{LAI} , %
H ₂ SO ₄	200	3,46	95,2	9,0	27,3
	205	3,62	100	12,8	26,2
	210	3,77	100	29,6	23,3
	220	4,04	100	35,8	28,6
HNO ₃	200	3,53	100	33,0	25,5
	205	3,61	100	33,9	26,6
	210	3,76	100	54,3	23,1
	220	4,01	100	68,5	48,4

La mayor resistencia de la lignina, frente a la celulosa, para los tres medios ensayados (agua ultrapura, y ácidos sulfúrico y nítrico diluidos) queda reflejada en la Figura 4.1, donde se observa cómo, mientras la eliminación de celulosa se incrementó constantemente con la severidad del tratamiento, la capacidad de deslignificación se mantuvo constante alrededor del 25%. Tan sólo el ácido nítrico actuando a la temperatura más alta (220°C) produjo un incremento significativo en la eliminación de lignina (48,4%).

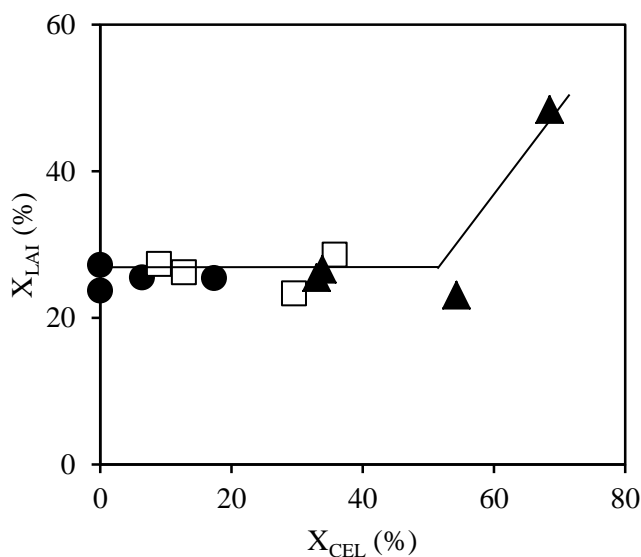


Figura 4.1 Eliminación de celulosa y lignina en los tratamientos con agua (●), y con disoluciones diluidas de ácido sulfúrico (□) y nítrico (▲)

4.2.1.2 Caracterización del hidrolizado líquido para la serie PT1

Tras los tratamientos a alta temperatura, los hidrolizados líquidos se separaron de los sólidos por filtración en dos etapas. En la primera, el líquido directo que salió del filtro se almacenó tras la medida de pH y volumen; en este líquido quedaron contenidos la mayor parte de los carbohidratos generados durante el proceso hidrolítico. En la segunda etapa de filtración, el sólido se lavó repetidamente con agua ultrapura hasta generar un volumen de 1 L. Las aguas de lavado arrastran los productos que pudieran quedar adheridos al sólido. Las muestras líquidas se congelaron y, posteriormente, fueron caracterizadas.

En las Tablas 4.8 a 4.13 quedan recogidos los datos relativos a la caracterización de los hidrolizados líquidos, incorporándose tanto valores de concentración como de rendimiento en azúcares reductores totales, en monosacáridos y 5-hidroximetilfurfural (5-HMF).

4.2.1.2.1 Hidrolizado líquido obtenido con agua ultrapura

En el apartado 4.2.1.1 de esta Memoria se estudió el efecto que el agua caliente provoca al actuar sobre el residuo sólido. Allí se determinó como este agente hidrolítico sólo altera, significativamente, la fracción de hemicelulosas. Al analizar la composición del líquido directo, y de las aguas de lavado (Tablas 4.8 y 4.9) se comprobó cómo el tratamiento con agua caliente condujo a bajas concentraciones de azúcares simples (D-glucosa, D-xilosa y D-galactosa) y 5-hidroximetilfurfural. El pH del líquido directo se mantuvo en valores bajos (entre 3,03 y 3,32)

como consecuencia de la liberación al medio de compuestos de carácter ácido (por ejemplo, ácido acético).

Tabla 4.8 Caracterización del líquido directo obtenido tras pretratamiento con agua ultrapura

T, °C	log R _o	pH	V, mL	Concentración, g/L			
				D-glucosa	D-xilosa	D-galactosa	5-HMF
200	3,45	3,20	265	0,30	1,03	0,13	0,23
205	3,64	3,32	265	0,02	0,50	0,05	0,06
210	3,75	3,08	255	0,08	4,53	0,26	0,19
220	4,10	3,03	270	0,17	10,85	0,44	0,34

V: volumen.

Tabla 4.9 Caracterización (azúcares reductores totales) de los hidrolizados obtenidos tras pretratamiento con agua ultrapura

T, °C	Concentración, g/L			
	Líquido directo (LD)	Aguas de lavado (AL)	LD + AL	Post-hidrólisis ácida
200	16,09	2,56	18,65	26,73
205	8,84	5,92	14,76	9,94
210	31,67	0,60	32,27	33,29
220	55,99	2,70	58,69	49,21

En relación a los rendimientos en azúcares y 5-hidroximetilfurfural, se observó (Tabla 4.10) que:

- a. Para D-glucosa, los valores fueron muy bajos. Los tratamientos a temperaturas extremas condujeron a los mayores rendimientos en la hexosa: 0,16% a 200°C, como consecuencia del desprendimiento del monosacárido desde la estructura amorfa de la celulosa, que en esas condiciones sufre poca degradación térmica, y 0,09% a 220°C porque comienza a ser significativa la despolimerización de la celulosa (aunque, muy probablemente, el proceso conduzca más a estructuras de oligómeros que a monómeros).
- b. Para D-xilosa, D-galactosa y 5-HMF, la tendencia general observada fue el incremento de rendimiento con el ascenso de temperatura. Esto ya ha sido observado en investigaciones previas que usaron la misma materia prima (Cuevas et al., 2009). Así, para D-xilosa y D-galactosa se alcanzaron, a 220°C, unos rendimientos máximos del 5,8 y 0,23%, respectivamente. La reducción de rendimiento en azúcares a 205°C (respecto a 200°C) puede deberse a que en el experimento llevado a cabo a 205°C gran parte de los azúcares no se recuperaron en el líquido directo, sino en las aguas de lavado (Tabla 4.9).

- c. Para los oligosacáridos (OLI) se observó un rendimiento máximo del 5,6% a 200°C. A temperaturas mayores los rendimientos descendieron al hidrolizarse las cadenas de carbohidratos, lo que provocó la desaparición de estos productos a 220°C (Tabla 4.10).

Tabla 4.10 Caracterización del líquido directo obtenido tras pretratamiento con agua ultrapura. Rendimientos

T, °C	Rendimiento, %				
	D-glucosa	D-xilosa	D-galactosa	5-HMF	OLI
200	0,16	0,54	0,07	0,12	5,6
205	0,01	0,28	0,03	0,03	0,6
210	0,04	2,31	0,13	0,10	0,8
220	0,09	5,80	0,23	0,18	0,0

OLI: oligosacáridos.

Es interesante señalar la alta capacidad que el agua ultrapura tiene, al actual sobre huesos de aceituna, para generar D-xilosa con muy baja producción de D-glucosa. Esto es debido, posiblemente, a la particular composición de las hemicelulosas presentes en la materia prima (mucho más rica en D-xilosa que en D-glucosa) y en la dificultad que tiene la celulosa para hidrolizarse hasta D-glucosa. En la Figura 4.2 se muestra el cromatograma del hidrolizado obtenido sometiendo a post-hidrólisis ácida el líquido directo derivado del tratamiento con agua a 200°C. En dicho cromatograma se pueden observar, entre otros, los picos relativos a L-arabinosa, D-galactosa, D-glucosa y D-xilosa.

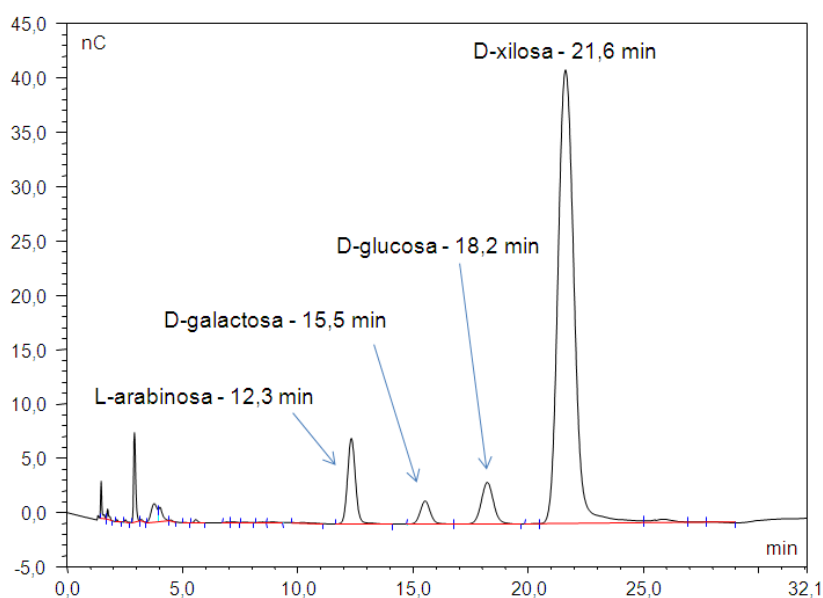


Figura 4.2 Cromatograma del hidrolizado obtenido tras someter a post-hidrólisis ácida el líquido directo del tratamiento con agua ultrapura a 200°C

4.2.1.2.2 Hidrolizado líquido obtenido con disoluciones diluidas de ácidos sulfúrico y nítrico

En este conjunto de experimentos, el pH de los hidrolizados sufrió poca variación con el cambio de temperatura (pH 1,62–1,66 con H₂SO₄ y 1,58–1,68 con HNO₃), posiblemente como consecuencia de que este parámetro fue fijado fundamentalmente por la incorporación al medio de protones procedentes del propio ácido, y en menor medida, por la formación, durante las hidrólisis de estructuras biomásicas, de compuestos químicos de carácter ácido, como el ácido acético. A pesar de las bajas concentraciones, los experimentos con ácidos sulfúrico y nítrico diluidos (ambos 0,025 M) produjeron cambios sustanciales en la composición de los hidrolizados (Tablas 4.11 y 4.12), si los resultados se comparan con los obtenidos en los experimentos realizados con agua ultrapura. Así, las concentraciones y los rendimientos en D-glucosa se incrementaron considerablemente, debido al mayor ataque sufrido por la fracción celulósica del hueso, algo ya anunciado anteriormente por la Tabla 4.7. De esta manera, con H₂SO₄ a 220°C se alcanzó un rendimiento de D-glucosa cercano al 3,6%, equivalente a una concentración de 6,5 g/L, mientras que con HNO₃ los resultados a la misma temperatura fueron de 8,6 y 16,4 g/L (Tablas 4.11 y 4.13). La intensificación del proceso hidrolítico sobre la celulosa también se tradujo en un aumento de la concentración y el rendimiento del inhibidor fermentativo 5-HMF (hasta valores de 1,7 g/L y 0,95%, para H₂SO₄, y de 2,5 g/L y 1,3% para HNO₃). No hay que olvidar que este furano surge como consecuencia de la degradación térmica de la D-glucosa (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000b). El valor de 2,5 g/L de 5-HMF con HNO₃ a 220°C puede traer consigo inhibición microbiana si el hidrolizado se fermenta directamente. Con relación a los monómeros hemicelulósicos (D-xilosa y D-galactosa), ambos tuvieron un comportamiento similar al modificarse la temperatura, tanto en los experimentos con H₂SO₄ como con HNO₃. Así, para bajas temperaturas, los incrementos térmicos condujeron a aumentos en la producción de estos monosacáridos. Para severidades de pretratamiento intermedias se maximizaron los rendimientos y, finalmente, para altas temperaturas, la tendencia fue de descenso en los azúcares al incrementarse la temperatura. Esto último, sería consecuencia de los procesos de degradación térmica de carbohidratos. En la Tabla 4.12 se observa el mismo comportamiento para azúcares reductores totales. Las cantidades máximas de D-xilosa y D-galactosa se alcanzaron a 210°C trabajando con ácido sulfúrico (33,6 g/L ó 18,1%, para el primer producto, y 0,95 g/L ó 0,51%, para el segundo) y a 205°C operando con ácido nítrico (18,9 g/L ó 10,3%, para el primer producto, y 0,7 g/L ó 0,38%, para el segundo). Independientemente del tipo de ácido usado, el rendimiento en oligosacáridos fue nulo en todo el intervalo de temperaturas ensayado (Tabla 4.13).

Tabla 4.11 Caracterización del líquido directo obtenido tras pretratamientos con ácidos sulfúrico y nítrico. Concentraciones de monosacáridos y 5-hidroximetilfurfural

Medio	T, °C	log R _o	pH	V, mL	Concentración, g/L			
					D-glucosa	D-xilosa	D-galactosa	5-HMF
H ₂ SO ₄	200	3,46	1,66	265	0,80	21,66	0,67	0,80
	205	3,62	1,63	275	1,94	27,67	0,84	0,96
	210	3,77	1,62	270	3,49	33,59	0,95	1,46
	220	4,04	1,63	275	6,50	18,60	0,68	1,73
HNO ₃	200	3,53	1,68	270	4,03	15,82	0,53	1,11
	205	3,61	1,63	275	7,00	18,87	0,70	1,74
	210	3,76	1,64	270	8,81	13,49	0,58	1,76
	220	4,01	1,58	265	16,42	6,54	0,46	2,52

V: volumen.

Tabla 4.12 Caracterización (azúcares reductores totales) de los hidrolizados obtenidos tras los pretratamientos con ácidos sulfúrico y nítrico

Medio	T, °C	Concentración, g/L			
		Líquido directo (LD)	Aguas de lavado (AL)	LD+AL	Post-hidrólisis ácida
H ₂ SO ₄	200	44,44	1,23	45,66	36,30
	205	46,26	1,91	48,17	38,16
	210	48,18	1,07	49,25	41,08
	220	37,53	1,83	39,36	33,29
HNO ₃	200	28,01	8,23	36,24	27,12
	205	37,15	8,48	45,63	38,16
	210	41,55	9,74	51,29	36,67
	220	38,65	9,73	48,38	35,93

Tabla 4.13 Caracterización del líquido directo obtenido tras pretratamientos con ácidos sulfúrico y nítrico. Rendimientos en monosacáridos, 5-HMF y oligosacáridos (OLI)

Medio	T, °C	Rendimiento, %				
		D-glucosa	D-xilosa	D-galactosa	5-HMF	OLI
H ₂ SO ₄	200	0,42	11,45	0,36	0,42	0,0
	205	1,06	15,13	0,46	0,53	0,0
	210	1,88	18,12	0,51	0,79	0,0
	220	3,55	10,17	0,37	0,95	0,0
HNO ₃	200	2,18	8,54	0,29	0,60	0,0
	205	3,83	10,32	0,38	0,95	0,0
	210	4,73	7,24	0,31	0,94	0,0
	220	8,60	3,42	0,24	1,32	0,0

En la Figura 4.3 se muestran los rendimientos en distintos productos en los hidrolizados líquidos. Hay que señalar que el pretratamiento con agua caliente a presión sólo tiene interés si se utiliza para mejorar una posterior etapa hidrolítica, ya que los rendimientos de monosacáridos derivados de él son bajos. Sin embargo, los otros dos medios hidrolíticos ensayados (H₂SO₄ y HNO₃) son capaces de ofrecer hidrolizados lo bastante enriquecidos en azúcares simples como

para plantear una etapa de tipo fermentativo, obviando pasos intermedios de hidrólisis y contemplando, en todo caso, una detoxificación para eliminar 5-HMF u otros inhibidores fermentativos como el furfural o el ácido acético.

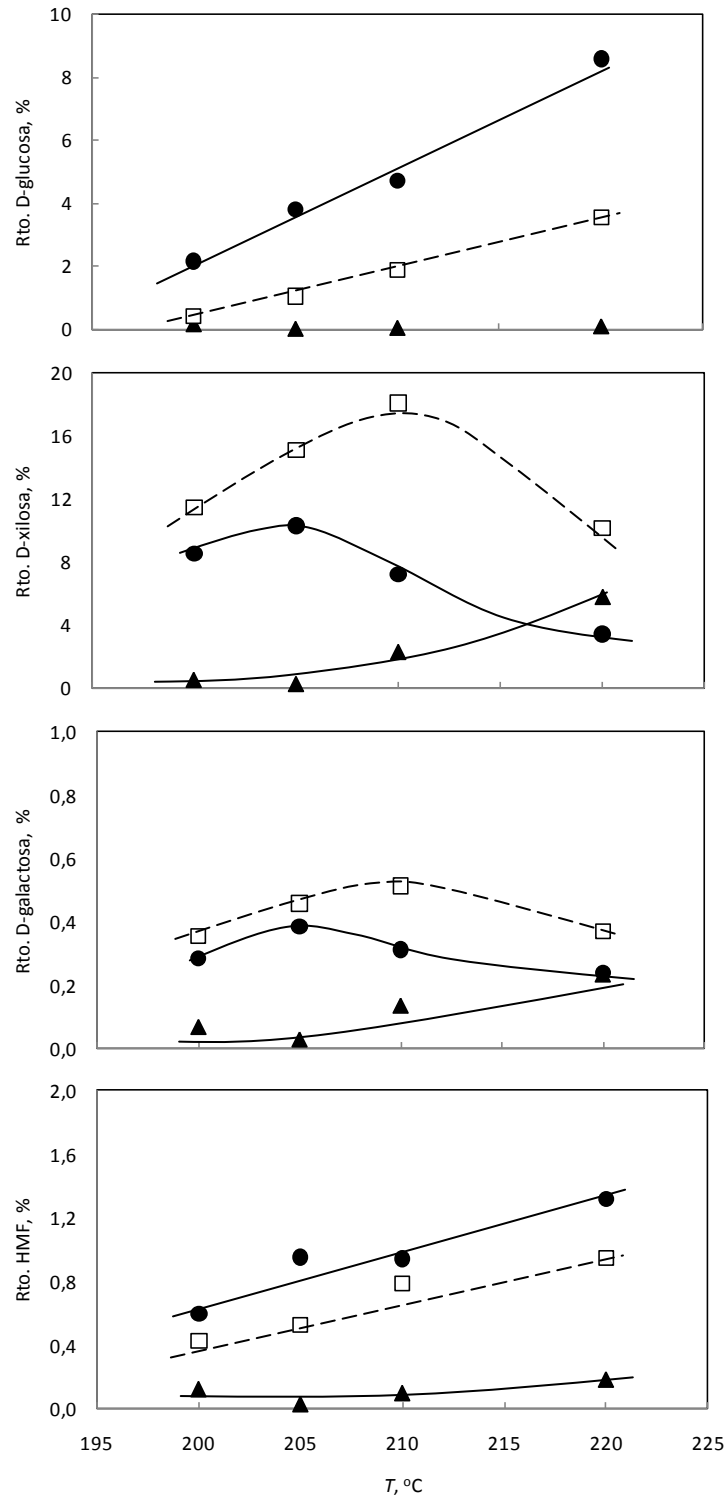


Figura 4.3 Evolución de los rendimientos en productos del hidrolizado con la temperatura de proceso (▲, agua; □, ácido sulfúrico; ●, ácido nítrico)

4.2.2 Optimización de la hidrólisis con ácido sulfúrico. Influencia de la temperatura y el tiempo de hidrólisis

Con los experimentos recogidos en estas series experimentales (PT2 y PT3) se pretendió analizar la capacidad del ácido sulfúrico (0,010 y 0,025 M) para hidrolizar la fracción hemicelulósica del hueso de aceituna, de forma que pudieran generarse hidrolizados ricos en D-xilosa. Se sabe que algunas de las variables más importantes que intervienen en la hidrólisis ácida de materiales lignocelulósicos son la temperatura y el tiempo de reacción, la concentración de ácido y la relación entre la carga de sólido y el volumen de líquido en el reactor (relación sólido/líquido). Las tres primeras variables fueron estudiadas en este apartado. La velocidad de agitación en el reactor y el volumen de líquido en su interior se mantuvieron constantes en valores de 250 rpm y 300 mL, respectivamente. Se plantearon dos diseños experimentales (PT2 y PT3) basados en el desarrollo de un diseño ortogonal del tipo 2^2 ; es decir, en el que dos factores (o variables) se modificaron simultáneamente a dos niveles. Los dos diseños fueron idénticos (tal y como se observa en la Tabla 4.14 y la Figura 4.4) en cuanto a las coordenadas “temperatura–tiempo”, pero cada diseño incorporó una concentración diferente de ácido sulfúrico: 0,010 M en PT2 y 0,025 M en PT3.

Tabla 4.14 Diseño experimental en las series PT2 y PT3

Valores codificados		Valores reales	
$X_1: T$	$X_2: t$	$T, ^\circ\text{C}$	t, min
0	-1,4	172	5
-1	-1	180	2
1	-1	180	8
-1,4	0	200	0,76
0	0	200	5
1,4	0	200	9,24
-1	1	220	2
1	1	220	8
0	1,4	228	5

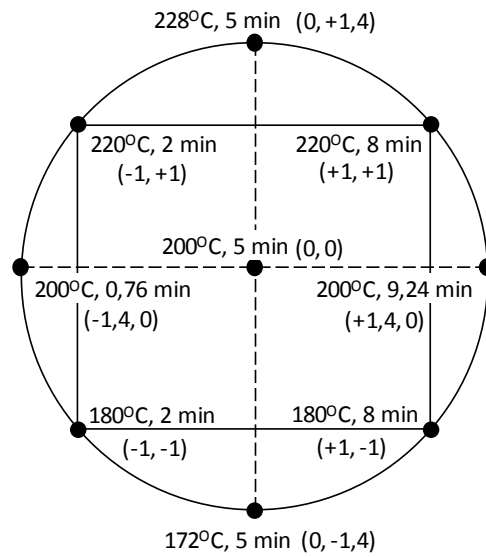


Figura 4.4 Diseño factorial, series PT2 y PT3

4.2.2.1 Caracterización del residuo sólido para la serie PT2

Tras llevar a cabo los ensayos del diseño experimental PT2 (H_2SO_4 0,010 M), el residuo sólido se caracterizó y los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4.15. El porcentaje de recuperación de sólido, tras los pretratamientos (RS), estuvo fuertemente influenciado por la temperatura y los tiempos de reacción. Como es lógico, el parámetro descendió a medida que aumentaron las severidades de tratamiento. Para un mismo tiempo de operación, RS descendió al elevarse T (86,5, 62,8 y 56,5% en los experimentos 1, 5, 6, 7 y 11). Para una misma temperatura de hidrólisis, RS descendió al aumentar t (67,6, 62,8 y 60,5% en los experimentos 4, 5, 6, 7 y 8). De este modo, RS alcanzó el valor máximo (86,5%) y mínimo (56,5%) en los experimentos 1 (172°C, 5 min) y 11 (228°C, 5 min) respectivamente.

Tabla 4.15 Porcentaje de recuperación y composición de los sólidos obtenidos en la serie PT2

Experimento	T , °C	t , min	RS, %	HEM, %	CEL, %	LAI, %
1	172	5	86,5	23,1	32,0	30,0
2	180	2	83,0	16,7	33,4	32,9
3	180	8	73,6	7,1	37,9	35,4
4	200	0,76	67,6	2,3	32,8	40,9
5, 6, 7	200	5	62,8±0,7	0,0±0,0	34,1±1,2	42,3±3,8
8	200	9,24	60,5	0,0	38,6	42,1
9	220	2	58,5	0,0	34,4	43,3
10	220	8	56,8	0,0	33,0	45,0
11	228	5	56,5	0,0	25,1	48,6

Con relación a la fracción hemicelulósica, la hidrólisis ácida provocó una fuerte despolimerización, completada a partir del experimento 5 (Tabla 4.15). El contenido de celulosa, en un primer momento, se incrementó con el aumento de temperatura, hasta alcanzar un valor máximo del 38,6% (200°C-9,24 min), para después iniciar un descenso desde el citado valor hasta un 25,1% (ensayo realizado a 228°C durante 5 minutos).

La lignina ácido insoluble se incrementó constantemente (desde el 30 al 48,6%) al analizar los experimentos desde el 1 al 11. Esto fue consecuencia del carácter insoluble de esta fracción en medio ácido. Una consecuencia de lo anterior es que los experimentos realizados a mayor temperatura generaron residuos sólidos con porcentajes de lignina muy elevados.

A los datos contenidos en la Tabla 4.15 se les aplicó un análisis estadístico basado en el método ANOVA. Para ello, fue empleado el programa MODDE 6.0, y así pudieron obtenerse ecuaciones polinomiales de ajuste de los porcentajes de recuperación de sólido (RS), celulosa (CEL) y lignina ácido insoluble (LAI) en función de la temperatura y el tiempo de operación (Tabla 4.16). La significación estadística de cada término que participó en la configuración de los modelos matemáticos cumplió con la condición ' p -value < 0,05', y se muestra en la Tabla 4.16. En el caso de RS, la temperatura (X_T) tuvo el mayor efecto sobre la recuperación de sólido, seguida por el tiempo de reacción (X_t). El coeficiente de determinación del modelo matemático para RS ($R^2 = 0,999$) vino a indicar que el modelo es capaz de explicar el 99,9% de la variación de resultados. El valor de R^2_{ajustado} fue del 99,6%. Para el porcentaje de celulosa (CEL), el modelo de ajuste propuesto se construyó con tres términos (X_T , X_t y X_T^2), ya que los restantes ($X_t \cdot X_T$ y X_t^2) no fueron estadísticamente significativos. Los valores de R^2 y R^2_{ajustado} fueron de 0,908 y 0,862, respectivamente. Hay que indicar que este modelo se obtuvo sin tener en cuenta el dato de CEL asociado al ensayo número 9. Finalmente, el porcentaje de lignina ácido insoluble del residuo sólido (LAI) sólo fue función de la temperatura.

Tabla 4.16 Efecto estimado (EE), errores estándar (ES) y nivel de significación (p) para los modelos de ajuste de los porcentajes de recuperación de sólido (RS), de celulosa (CEL) y de lignina ácido insoluble (LAI) en los huesos pretratados de aceituna serie (PT2)

Respuesta	Términos modelo	EE	ES	p -valor (Prob > F)
RS, %	Constante	37,22	± 0,29	0,0000
	X_T	10,46	± 0,18	0,0000
	X_t	2,63	± 0,18	0,0000
	$X_T \cdot X_T$	-4,42	± 0,21	0,0000
	$X_t \cdot X_t$	-0,67	± 0,21	0,0253
	$X_T \cdot X_t$	-1,94	± 0,25	0,0006
	R^2	0,999		
	$R^2_{ajustado}$	0,996		
CEL, %	Constante	34,96	± 0,58	0,0000
	X_T	-2,61	± 0,53	0,0026
	X_t	2,31	± 0,53	0,0047
	$X_T \cdot X_T$	-2,83	± 0,56	0,0023
	R^2	0,908		
		$R^2_{ajustado}$	0,862	
LAI, %	Constante	40,46	± 0,69	0,0000
	X_T	5,79	± 0,81	0,0000
	R^2	0,851		
		$R^2_{ajustado}$	0,835	

X_T : temperatura (forma codificada), X_t : tiempo (forma codificada). El nivel de significación fue definido como $p < 0,05$.

En las Figuras 4.5 y 4.6 se incorporan las superficies de respuesta calculadas por MODDE 6.0 de acuerdo a los modelos de ajuste para los porcentajes de RS y CEL.

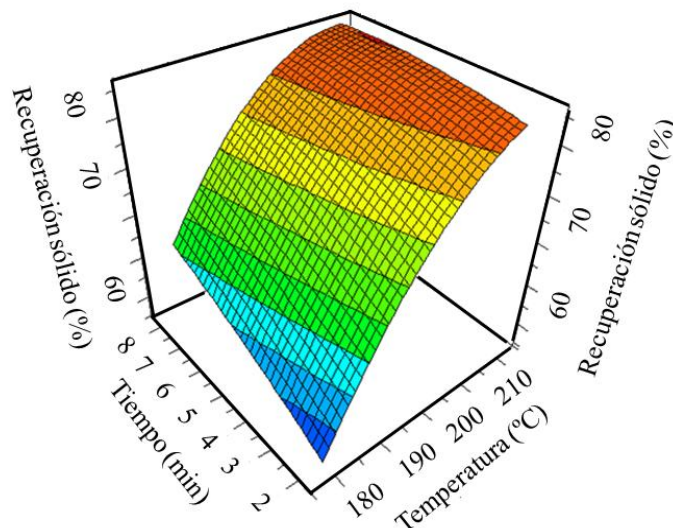


Figura 4.5 Superficie de respuesta para el porcentaje de recuperación de sólido en la serie PT2

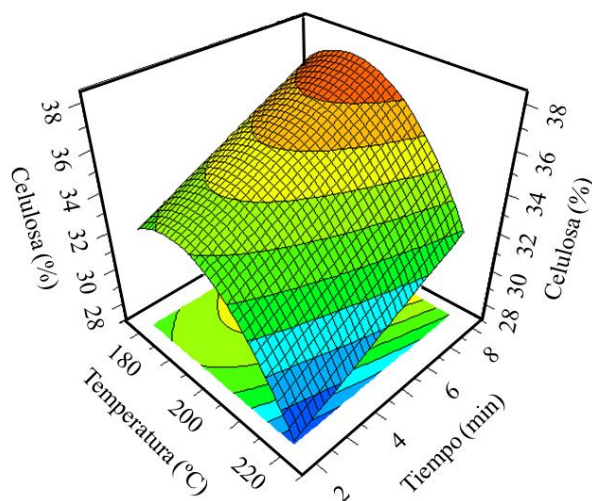


Figura 4.6 Superficie de respuesta para el porcentaje de celulosa en la serie PT2

4.2.2.2 Caracterización del hidrolizado líquido para la serie PT2

A partir del análisis de los datos de composición de los hidrolizados líquidos obtenidos en la serie PT2 usando H_2SO_4 0,010 M (Tabla 4.17) se dedujo, por un lado, que D-xilosa fue el monosacárido hemicelulósico más abundante en la fase líquida y, por otro, que el rendimiento de este carbohidrato estuvo fuertemente condicionado por las condiciones de operación. La mayor producción de D-xilosa (20,0 g/100 g materia prima) fue alcanzada con tratamientos efectuados a media temperatura (200°C-5 min), ya que a temperaturas superiores el rendimiento de la pentosa decreció como consecuencia de procesos de degradación térmica. Este mismo comportamiento fue observado para L-arabinosa y D-galactosa, aunque las producciones de estos compuestos fueron sensiblemente inferiores y alcanzaron sus máximos a distintas condiciones de temperatura y tiempo (1,0 g L-arabinosa/100 g hueso a 200°C-0,76 min y 0,54 g D-galactosa/100 g hueso a 200°C-5 min). La concentración de ácido acético en los hidrolizados se incrementó con el aumento de temperatura, de manera que los rendimientos en este producto ascendieron desde el 1,4 hasta el 5,8% cuando la temperatura se elevó desde 180°C hasta 220°C. Por otro lado, a partir de 220°C el rendimiento de D-glucosa aumentó continuamente con los incrementos de severidad de los pretratamientos. Así, hasta las condiciones 200°C-9,24 min no se detectó producción de D-glucosa. Sin embargo, a 220°C-8 min el rendimiento fue de 1,4 g/100 g hueso, y a 228°C-5 min se consiguieron 1,6 g de hexosa por cada 100 g de materia prima. En estas últimas condiciones también fue significativa la aparición del inhibidor fermentativo 5-HMF (1,1 g/100 g endocarpios de aceituna).

Tabla 4.17 Rendimiento de productos (g/100 g material prima) en los hidrolizados líquidos de la serie PT2

Experimento	1	2	3	4	5, 6, 7	8	9	10	11
T, °C	172	180	180	200	200	200	220	220	228
t, min	5	2	8	0,76	5	9,24	2	8	5
XIL	1,1	1,5	5,5	10,4	20,0 ± 1,6	13,9	8,2	4,6	2,8
ARA	0,92	0,81	0,77	1,0	0,90 ± 0,06	0,32	0,43	0,21	0,12
GAL	0,11	0,14	0,25	0,34	0,54 ± 0,07	0,42	0,24	0,23	0,17
GLU	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,24	1,4	1,6
ACE	2,5	1,4	2,7	3,4	3,5 ± 0,2	4,1	4,6	5,8	5,3
HMF	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,03	0,10	0,80	1,1

XIL: D-xilosa, ARA: L-arabinosa, GAL: D-galactosa, GLU: D-glucosa, ACE: ácido acético, HMF: 5-hidroxiacetilfurfural.

A partir de los datos contenidos en la Tabla 4.17, se determinaron sendas ecuaciones polinomiales para el ajuste de los rendimientos de D-xilosa (Y_{XIL} , %), L-arabinosa (Y_{ARA} , %), D-galactosa (Y_{GAL} , %) y ácido acético (Y_{ACE} , %). Los modelos matemáticos fueron validados mediante el test ANOVA usando el programa informático MODDE 6.0 (Tabla 4.18).

Tabla 4.18 Efecto estimado (EE), errores estándar (ES) y nivel de significación (p) para los modelos de ajuste de los rendimientos de D-xilosa (Y_{XIL} , %), L-arabinosa (Y_{ARA} , %) y ácido acético (Y_{ACE} , %) en los hidrolizados líquidos de la serie PT2

Respuesta	Términos modelo	EE	ES	p -valor (Prob > F)
Y_{XIL} , %	Constante	20,04	± 1,08	0,0000
	X_T	1,03	± 0,66	0,1820
	X_t	0,68	± 0,66	0,3509
	$X_T \cdot X_T$	-9,58	± 0,79	0,0000
	$X_t \cdot X_t$	-4,48	± 0,79	0,0024
	$X_T \cdot X_t$	-1,92	± 0,94	0,0960
	R^2	0,970		
	$R^2_{ajustado}$	0,939		
Y_{ARA} , %	Constante	0,78	± 0,07	0,0000
	X_T	-0,26	± 0,06	0,0024
	X_t	-0,15	± 0,06	0,0296
	$X_T \cdot X_T$	-0,16	± 0,06	0,0408
	R^2	0,833		
	$R^2_{ajustado}$	0,762		
Y_{ACE} , %	Constante	3,67	± 0,12	0,0000
	X_T	1,27	± 0,14	0,0000
	X_t	0,42	± 0,14	0,0134
	R^2	0,925		
	$R^2_{ajustado}$	0,906		

X_T : temperatura (forma codificada), X_t : tiempo (forma codificada). El nivel de significación fue definido como $p < 0,05$.

La Figura 4.7 muestra la superficie de respuesta calculada por el modelo matemático para el rendimiento en D-xilosa. Aplicando la condición de máximo de una función a [$Y_{XIL} = 20,0438 + (1,0277 \cdot X_T) + (0,6823 \cdot X_t) - (9,5813 \cdot X_T \cdot X_T) - (4,4798 \cdot X_t \cdot X_t) - (1,92 \cdot X_T \cdot X_t)$] se

determinarían los valores de temperatura y tiempo que maximizan Y_{XIL} . Los valores generados a partir del modelo fueron de 201°C y 5,2 minutos, con una producción de D-xilosa de $20,1 \pm 2,8$ g por cada 100 g de materia prima.

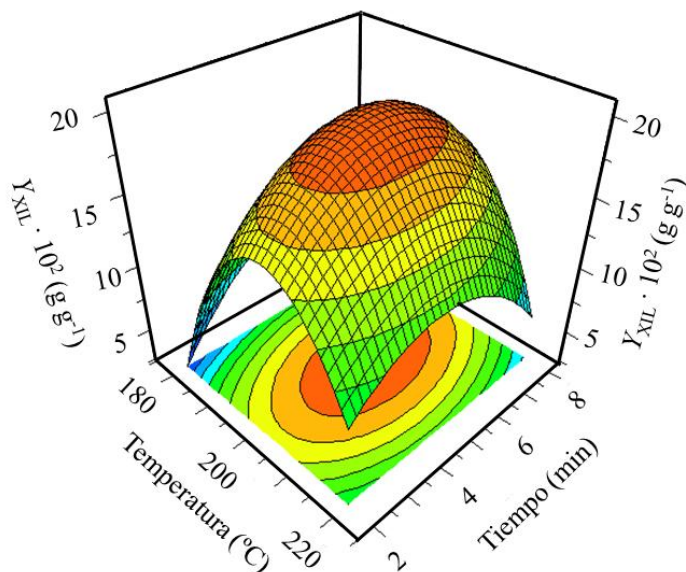


Figura 4.7 Superficie de respuesta para el rendimiento de D-xilosa en la serie PT2

Para confirmar la validez del modelo de Y_{XIL} se llevó a cabo un nuevo experimento a 201°C-5,2 min. El rendimiento experimental de pentosa fue del 17,8%, lo cual concuerda con los valores predichos matemáticamente con un nivel de confianza del 95%.

4.2.2.3 Caracterización del residuo sólido para la serie PT3

Tras llevar a cabo los pretratamientos con ácido sulfúrico 0,025 M (Figura 4.4), el contenido del reactor se filtró, lavándose el residuo sólido con abundante agua para garantizar su limpieza. Posteriormente, este sólido fue pesado, con objeto de calcular el porcentaje de recuperación de sólido (RS), y caracterizado en términos de hemicelulosa (HEM), celulosa (CEL) y lignina ácido insoluble (LAI), Tabla 4.19.

Tabla 4.19 Porcentaje de recuperación y composición de los sólidos obtenidos en la serie PT3

Experimento	T , °C	t , min	RS, %	HEM, %	CEL, %	LAI, %
1	172	5	76,9	14,7	33,8	34,7
2	180	2	75,2	11,1	32,5	38,0
3	180	8	66,1	1,4	41,6	38,4
4	200	0,76	61,9	0,5	33,4	43,4
5, 6, 7	200	5	$57,7 \pm 1,1$	$0,0 \pm 0,0$	$38,2 \pm 0,6$	$43,3 \pm 1,1$
8	200	9,24	55,1	0,0	38,5	43,2
9	220	2	48,3	0,0	20,1	55,5
10	220	8	44,7	0,0	17,4	56,8
11	228	5	41,0	0,0	2,2	66,4

El porcentaje de sólido recuperado tras las hidrólisis de la serie PT3 descendió, desde 76,9 hasta 41,0%, a medida que se incrementó la temperatura del pretratamiento, desde 172°C hasta 228°C. Para una misma temperatura, el incremento de los tiempos de reacción también ocasionó un descenso del parámetro estudiado. Así, por ejemplo, a 200°C el aumento del tiempo de hidrólisis (0,76, 5 y 9,24 min) provocó un descenso en RS (61,9, 57,7 y 55,1%, respectivamente). Si se comparan los valores de RS de las Tablas 4.15 y 4.19 se puede deducir que el aumento de la concentración de ácido sulfúrico (desde 0,010 a 0,025 M) provocó descenso en RS, ya que para cualquier pareja de valores temperatura-tiempo el porcentaje de sólido recuperado a 0,010 M (Tabla 4.15) fue superior al obtenido a 0,025 M (Tabla 4.19)

Las pérdidas de peso de sólido, durante los pretratamientos, se produjeron mayoritariamente como consecuencia de la intensa despolimerización de la fracción hemicelulósica, reacción que se incrementó con los aumentos de temperatura y tiempo de reacción. Así, los porcentajes de heteropolímero en el sólido, tras los pretratamientos, oscilaron entre el 14,7% para las condiciones de operación más suaves (172°C-5 min), y el 0% a partir de los experimentos realizados a 200°C-5 min.

Con relación a la fracción celulósica del hueso de aceituna, el porcentaje de polímero en los sólidos pretratados describió un comportamiento complejo al incrementarse las severidades de las hidrólisis. Así, en los experimentos del 1 al 3 la tendencia fue de incremento de CEL con el incremento de severidad (a 180°C-8 min se alcanzó el máximo porcentaje de celulosa, 41,6%). Esto podría ser explicado por la fuerte pérdida de hemicelulosa en esos ensayos, lo que debe provocar un incremento del porcentaje de toda fracción no transformada en esas condiciones. Posteriormente, en los experimentos del 3 al 8 se observó, en general, un mantenimiento del parámetro estudiado (CEL alrededor del 38%). Finalmente, en los ensayos del 8 al 11 (los realizados a más altas temperaturas) el porcentaje de celulosa descendió drásticamente (CEL = 2,2% para 228°C-5 min).

La alta solubilización de hemicelulosa, bajo todas las condiciones de pretratamiento ensayadas, y la significativa solubilización de celulosa en los experimentos llevados a cabo por encima de 200°C, dieron lugar a sólidos pretratados con altos porcentajes de lignina, en los cuales el valor de LAI llegó a superar el 55%, e incluso a alcanzar el 66,4% para el ensayo a 228°C-5 min. (Tabla 4.19). Si los valores finales de LAI se refieren al contenido inicial de lignina en el hueso (para ello se multiplicarían los datos de RS y LAI de la Tabla 4.19) podría comprobarse que los valores calculados (entre 25,0 y 28,6%) son inferiores al valor de LAI en la materia prima (33,3%).

Al comparar los resultados de las columnas “HEM” y “LAI”, de las Tablas 4.15 y 4.19, se comprobó cómo, en general, el incremento de la concentración de ácido sulfúrico (desde 0,010 hasta 0,025 M) se tradujo, a iguales condiciones temperatura-tiempo, en reducciones de los porcentaje de hemicelulosa e incrementos en los de lignina. En el caso de la celulosa, el incremento de ácido condujo a un porcentaje máximo algo más elevado (41,6 frente a 38,6%), y a procesos de hidrólisis del polímero más intensos a altas temperaturas.

A partir del análisis de los datos contenidos en la Tabla 4.20, pudieron obtenerse varias ecuaciones polinomiales para el ajuste de los porcentajes de recuperación de sólido (RS), de celulosa (CEL) y lignina ácido insoluble (LAI) en los materiales pretratados en función de las variables estudiadas: temperatura y tiempo de operación. El análisis fue validado mediante el método estadístico ANOVA aplicando el programa MODDE 6.0 (Tabla 4.20).

Tabla 4.20 Efecto estimado (EE), errores estándar (ES) y nivel de significación (p) para los modelos de ajuste de los porcentajes de recuperación de sólido (RS), de celulosa (CEL) y de lignina ácido insoluble (LAI) en los huesos pretratados de aceituna (Serie PT3)

Respuesta	Términos modelo	EE	ES	p -valor (Prob > F)
RS, %	Constante	58,38	$\pm 0,29$	0,0000
	X_T	-12,37	$\pm 0,35$	0,0000
	X_t	-2,80	$\pm 0,35$	0,0000
	$X_T \cdot X_t$	1,37	$\pm 0,49$	0,0266
	R^2	0,995		
	R^2_{ajustado}	0,993		
CEL, %	Constante	37,38	$\pm 0,67$	0,0000
	X_T	-10,16	$\pm 0,56$	0,0000
	X_t	1,70	$\pm 0,56$	0,0237
	$X_T \cdot X_T$	-9,63	$\pm 0,64$	0,0000
	$X_T \cdot X_t$	-2,96	$\pm 0,80$	0,0099
	R^2	0,990		
R^2_{ajustado}	0,983			
LAI, %	Constante	43,98	$\pm 0,69$	0,0000
	X_T	10,10	$\pm 0,58$	0,0000
	$X_T \cdot X_T$	3,24	$\pm 0,66$	0,0012
	R^2	0,976		
	R^2_{ajustado}	0,970		

X_T : temperatura (forma codificada), X_t : tiempo (forma codificada). El nivel de significación fue definido como $p < 0.05$.

Respecto al porcentaje de recuperación de sólido (RS), la significación estadística de cada término que participó en la configuración del modelo matemático (p -value < 0.05) se muestra en la Tabla 4.20. La temperatura (X_T) tuvo el mayor efecto sobre RS, seguido por el tiempo de reacción (X_t) y por el producto $X_T \cdot X_t$. El coeficiente de determinación del modelo matemático

para RS ($R^2 = 0,995$) vino a indicar que el modelo es capaz de explicar el 99,5% de la variación de resultados. El valor de R^2_{ajustado} fue del 99,3%.

Tal y como se muestra en la Figura 4.8, el valor de la respuesta para el modelo de ajuste de RS osciló, aproximadamente, entre el 45 y el 75%. Estos valores son del mismo orden de los publicados por Ballesteros et al. (2001) en un artículo donde determina valores de RS cercanos al 45% cuando huesos de aceituna fueron pretratados a 210°C-4 min con la técnica de explosión de vapor catalizada con ácido sulfúrico. En esta Tesis, el modelo matemático predice un porcentaje de recuperación de sólido del 52,9% usando las mismas condiciones de temperatura y tiempo.

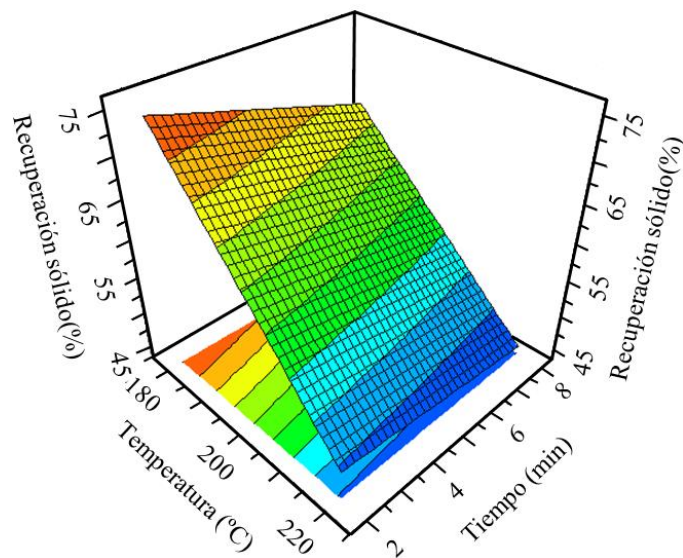


Figura 4.8 Superficie de respuesta para la recuperación de sólido en la serie PT3

El contenido de celulosa en los sólidos pretratados (CEL) pudo ser descrito, matemáticamente, en función de las variables tiempo y temperatura (Tabla 4.20); la superficie de respuesta derivada del modelo matemático se muestra en la Figura 4.9. El coeficiente de determinación del modelo matemático para CEL ($R^2 = 0,990$) indica que el modelo es capaz de explicar el 99,0% de la variación de resultados. El valor de R^2_{ajustado} fue del 98,3%. El porcentaje de celulosa pretratada, según el modelo matemático, alcanza su máximo valor (43,6%) trabajando a bajas temperaturas (186°C) durante tiempos prolongados (8 min). Los valores de EE (efecto estimado) de la Tabla 4.20 prueban que la temperatura tuvo una influencia mayor, sobre CEL, que el tiempo de operación. Finalmente, el porcentaje de lignina ácido insoluble pudo ser descrito como una función simple de la temperatura [$LAI = 43,9751 + (10,1018 \cdot X_T) + (3,2398 \cdot X_T^2)$].

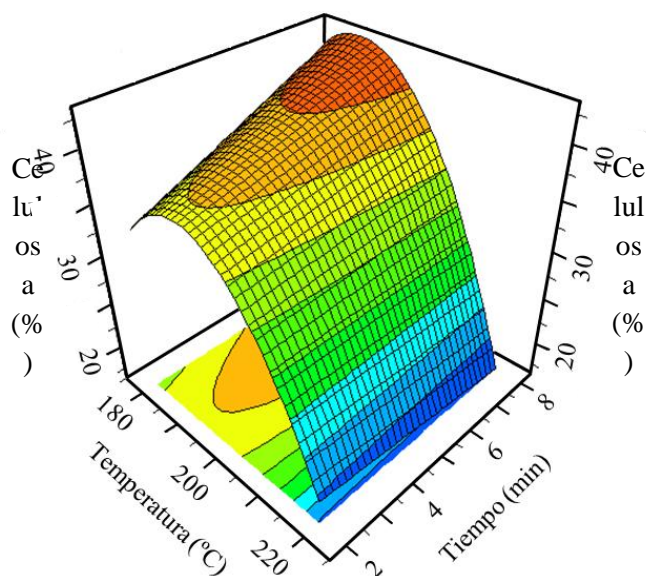


Figura 4.9 Superficie de respuesta para el porcentaje de celulosa en la serie PT3

4.2.2.4 Caracterización del hidrolizado líquido en la serie PT3

La mayor producción de D-xilosa en los experimentos realizados con H_2SO_4 0,025 M (20,5 g/100 g materia prima) fue alcanzada con tratamientos efectuados a media temperatura (200°C-5 min), ya que a temperaturas superiores el rendimiento de la pentosa decreció como consecuencia de procesos de degradación térmica (Tabla 4.21). Este mismo comportamiento, de los rendimientos frente a la temperatura, fue observado con L-arabinosa y D-galactosa, aunque para estos compuestos las producciones fueron sensiblemente inferiores y alcanzaron sus máximos a distintas condiciones de temperatura y tiempo (1,2 g L-arabinosa/100 g hueso a 180°C-2 min y 0,53 g D-galactosa/100 g hueso a 200°C-0,76 min). La concentración de ácido acético en los hidrolizados se incrementó continuamente con el aumento de temperatura, de manera que los rendimientos en este producto ascendieron desde el 0,8 hasta el 5,5% cuando la temperatura se elevó desde 172°C hasta 228°C. El último porcentaje implicó una pérdida total de los grupos acetilo existentes en la matriz de hemicelulosa sólida del hueso de aceituna. Por otro lado, el rendimiento de D-glucosa aumentó continuamente con los incrementos de severidad de los pretratamientos. Así, hasta las condiciones 180°C-2 min no se detectó producción de D-glucosa. Sin embargo, a 200°C-5 min el rendimiento fue de 1,19 g/100 g hueso, y a 228°C-5 min se consiguieron más de 11 g de hexosa por cada 100 g de materia prima. En estas últimas condiciones también fue significativa la aparición del inhibidor fermentativo 5-HMF (1,6 g/100 g endocarpios de aceituna).

Tabla 4.21 Rendimiento de productos (g/100 g material prima) en los hidrolizados líquidos de la serie PT3

Experimento	1	2	3	4	5, 6, 7	8	9	10	11
T, °C	172	180	180	200	200	200	220	220	228
t, min	5	2	8	0,76	5	9,24	2	8	5
XIL	10,4	11,8	16,1	16,9	20,5 ± 1,1	11,7	10,0	3,0	1,3
ARA	1,0	1,2	0,47	0,87	0,72 ± 0,03	0,19	0,21	0,18	0,03
GAL	0,41	0,52	0,40	0,53	0,52 ± 0,01	0,37	0,27	0,18	0,12
GLU	0,0	0,0	0,13	0,14	1,19 ± 0,11	1,8	6,8	8,3	11,1
ACE	0,81	0,86	2,1	2,4	3,22 ± 0,46	4,1	4,0	5,0	5,5
HMF	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,03	0,67	1,6	1,6

XIL: D-xilosa, ARA: L-arabinosa, GAL: D-galactosa, GLU: D-glucosa, ACE: ácido acético, HMF: 5-hidroximetilfurfural.

A partir de los datos contenidos en la Tabla 4.22, se determinaron las ecuaciones polinomiales para el ajuste de los rendimientos de D-xilosa (Y_{XIL} , %), L-arabinosa (Y_{ARA} , %), D-glucosa (Y_{GLU} , %) y ácido acético (Y_{ACE} , %). En el caso de D-galactosa no se ha considerado el tratamiento estadístico puesto que los rendimientos alcanzados fueron muy pequeños, inferiores a 0,55 g D-galactosa/100 g hueso. Los modelos matemáticos fueron validados mediante el test ANOVA usando el programa informático MODDE 6.0 (Tabla 4.22). Los cuatro modelos obtenidos fueron estadísticamente significativos.

Tabla 4.22 Efecto estimado (EE), errores estándar (ES) y nivel de significación (p) para los modelos de ajuste de los rendimientos de D-xilosa (Y_{XIL} , %), L-arabinosa (Y_{ARA} , %), D-glucosa (Y_{GLU} , %) y ácido acético (Y_{ACE} , %) en los hidrolizados líquidos de la serie PT3

Respuesta	Términos modelo	EE	ES	p -valor (Prob > F)
Y_{XIL} , %	Constante	20,5066	± 0,6183	0,0000
	X_T	-3,4770	± 0,3786	0,0003
	X_t	-1,2452	± 0,3786	0,0217
	$X_T \cdot X_T$	-7,2816	± 0,4507	0,0000
	$X_t \cdot X_t$	-3,0553	± 0,4507	0,0011
	$X_T \cdot X_t$	-2,8175	± 0,5354	0,0033
	R^2	0,987		
	$R^2_{ajustado}$	0,975		
Y_{ARA} , %	Constante	0,7227	± 0,0252	0,0000
	X_T	-0,3369	± 0,0154	0,0000
	X_t	-0,2172	± 0,0154	0,0000
	$X_T \cdot X_T$	-0,0984	± 0,0184	0,0030
	$X_t \cdot X_t$	-0,1006	± 0,0184	0,0028
	$X_T \cdot X_t$	0,1733	± 0,0218	0,0005
	R^2	0,994		
	$R^2_{ajustado}$	0,987		
Y_{GLU} , %	Constante	1,2147	± 0,1789	0,0003
	X_T	3,8375	± 0,1505	0,0000
	X_t	0,5038	± 0,1505	0,0123
	$X_T \cdot X_T$	2,3123	± 0,1713	0,0000
	R^2	0,992		
	$R^2_{ajustado}$	0,988		

Y _{ACE} , %				
Constante		3,1259	± 0,0854	0,0000
X _T		1,5778	± 0,1001	0,0000
X _t		0,5816	± 0,1001	0,0004
R ²	0,972			
R ² _{ajustado}	0,966			

X_T: temperatura (forma codificada), X_t: tiempo (forma codificada). El nivel de significación fue definido como $p < 0,05$.

Para el modelo de ajuste de Y_{XIL}, el valor de R² (bondad de ajuste) fue 0,987. Este coeficiente de determinación indicó que el modelo es capaz de explicar el 98,7% de la variación del rendimiento de D-xilosa dentro de la región de temperaturas y tiempos estudiada, mientras que el 1,3% restante sería explicado por los residuos. El valor del estadístico F (77,67) y del valor de p (<0,001) demostró que la regresión fue estadísticamente significativa.

Las ecuaciones para los rendimientos Y_{XIL} y Y_{ARA} incorporaron los términos lineales para las dos variables estudiadas (X_T y X_t), dos términos cuadráticos (X_T² y X_t²) y un término de interacción temperatura-tiempo (X_T · X_t). El modelo matemático que describió Y_{GLU} dentro de la región T-t analizada fue una función con dos términos lineales (para T y t) y un término cuadrático para la temperatura (X_T · X_T). Finalmente, Y_{ACE} fue función lineal de la temperatura y el tiempo (Tabla 4.19).

La Figura 4.7 muestra la superficie de respuesta predicha por el modelo matemático para el rendimiento de D-xilosa. Aplicando la condición de máximo de una función a [Y_{XIL} = 20,5066 – (3,4770 · X_T) – (1,2452 · X_t) – (7,2816 · X_T · X_T) – (3,0553 · X_t · X_t) – (2,8175 · X_T · X_t)] se determinarían los valores de temperatura y tiempo que maximizan Y_{XIL}. Los valores generados a partir del modelo fueron de 195°C y 5 minutos, con una producción de D-xilosa de 20,9±1,6 g por cada 100 g de materia prima, lo que equivale a una recuperación del 89,3% de la pentosa contenida en los endocarpios de la aceituna.

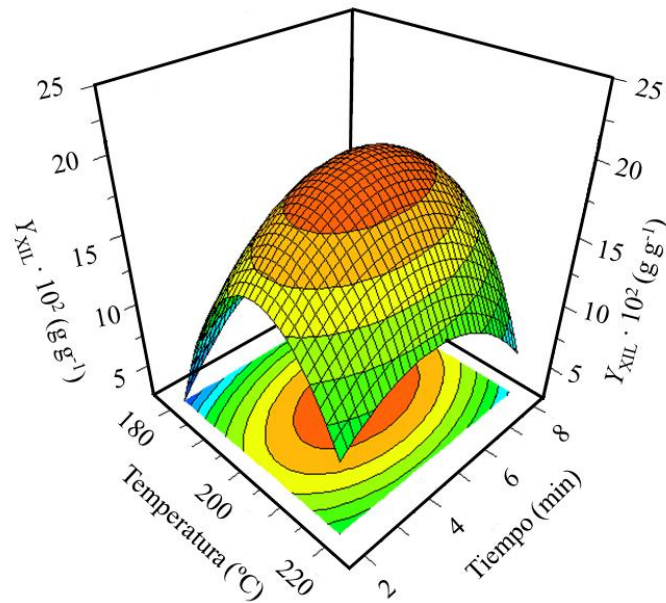


Figura 4.10 Superficie de respuesta para el rendimiento de D-xilosa en la serie PT3

Al analizar el modelo matemático asociado a Y_{ARA} se comprobó que el mayor rendimiento de L-arabinosa (1,3 g/100 g de materia prima) fue alcanzado con severidades de pretratamiento (180°C-2 min) inferiores a aquellas que maximizaron la producción de D-xilosa. Esto podría ser explicado teniendo en cuenta que las cadenas de hemicelulosa no se hidrolizan uniformemente; es decir, existen puntos dentro del polímero con diferentes reactividades frente al ácido sulfúrico, y los monómeros de arabinosa ocuparían posiciones más reactivas. Además, tal y como se ha mencionado en la literatura científica (Lenihan et al., 2010), L-arabinosa es más inestable, térmicamente, que D-xilosa. En relación al rendimiento de D-glucosa, la temperatura mostró el efecto positivo más fuerte, mientras que el tiempo de operación tuvo un efecto igualmente positivo, pero menos importante. Los mayores incrementos en Y_{GLU} fueron obtenidos con temperaturas superiores a 210°C, niveles térmicos que, tal y como se vio en la Figura 4.6, provocaron una fuerte despolimerización de la celulosa. Finalmente, los incrementos del rendimiento de ácido acético fueron obtenidos por aumento tanto de la temperatura como del tiempo de operación, de manera que el modelo predice máximos de 5,3 g de producto por cada 100 g de hueso a 220°C-8 min.

Los modelos matemáticos polinomiales para la serie PT3 mostraron que las condiciones de 195°C-5 minutos logran combinar altos rendimientos de D-xilosa con bajos de L-arabinosa (0,80 g/100 g hueso), D-glucosa (0,40 g/100 g hueso) y ácido acético (2,7 g/100 g hueso).

Para confirmar la validez del modelo de Y_{XIL} se llevó a cabo un nuevo experimento a 195°C-5 min. El rendimiento experimental de pentosa fue del 19,6%, lo cual concuerda con los valores predichos matemáticamente con un nivel de confianza del 95%.

Los resultados aquí obtenidos (89,3% de extracción de D-xilosa) están en consonancia con datos previamente publicados. Así, Torget et al. (1990) y Karimi et al. (2006) obtuvieron hidrolizados ricos en azúcares hemicelulósicos (92,0 y 80,8% de extracción de D-xilosa, respectivamente) cuando paja de arroz que fue tratada a 201°C durante 10 minutos con ácido sulfúrico de concentración 0,5%. Por otro lado, Sánchez et al. (2004) estudiaron la hidrólisis ácida (H_2SO_4 -0,025 M) de la hemicelulosa del cultivo herbáceo *Paja Brava*, y determinaron que la máxima recuperación de D-xilosa (alrededor del 80%) se logró trabajando a 190°C durante 5 minutos.

Finalmente, para comparar los datos de rendimiento de D-xilosa en las series PT2 y PT3 se incorporan las Figuras 4.11 y 4.12; es decir, gráficos de contorno que describen la producción de pentosa en función de la temperatura y el tiempo de hidrólisis. En ambos casos, se observa como la zona de óptimo corresponde a una región muy concreta de condiciones operativas, de tal forma que las temperaturas y los tiempos de reacción por encima y debajo de la zona de óptimo llevan a rápidas caídas de rendimientos. La modificación de temperatura ejerce un efecto más intenso sobre Y_{XIL} que el cambio de los tiempos de hidrólisis. En este tipo de gráficos es característica la inclinación que ofrecen las elipses de iso-rendimiento, lo que indica que, ante un descenso de tiempo, la producción de D-xilosa sólo se mantendría realizando un aumento de temperatura.

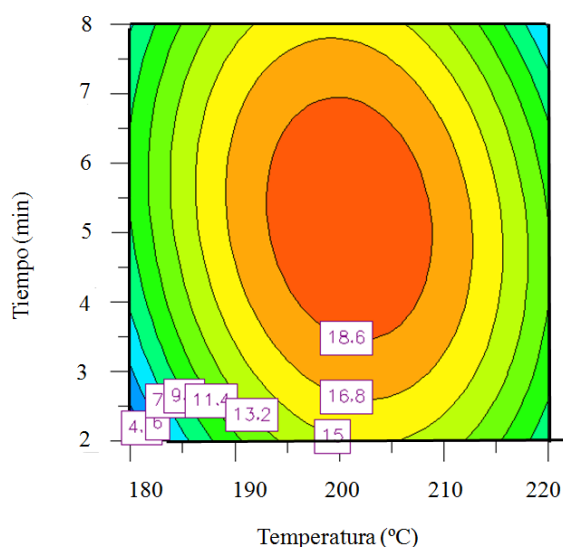


Figura 4.11 Gráfico de contorno. Influencia de T y t en el rendimiento de D-xilosa para la serie PT2

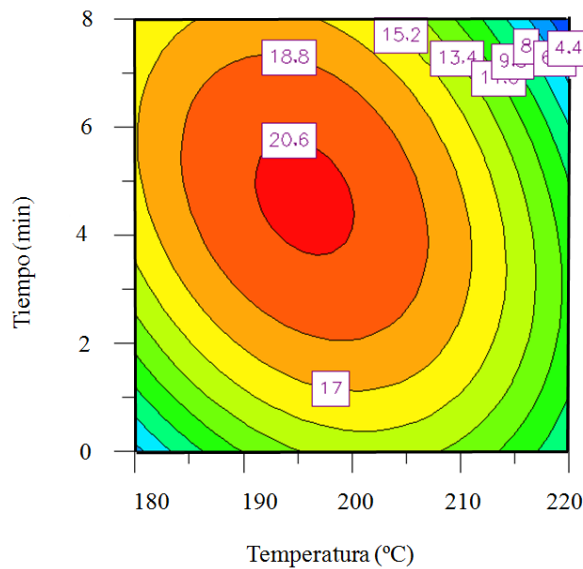


Figura 4.12 Gráfico de contorno. Influencia de T y t en el rendimiento de D-xilosa para la serie PT3

4.2.3 Optimización de la hidrólisis con ácido sulfúrico. Influencia de la concentración de ácido y la carga de hueso (PT4)

En el apartado 4.2.2 se han obtenido las condiciones que maximizan la producción de D-xilosa trabajando, a altas temperaturas, con endocarpios de aceituna y disoluciones diluidas de ácido sulfúrico. La relación Sólido/Líquido (S/L) empleada en dichos experimentos se mantuvo constante en un valor 1/6 (p/v); en concreto, se utilizaron 50 g de hueso seco y 300 mL de disolución. Es evidente que el aumento de la relación S/L puede ser interesante, siempre que se mantengan los rendimientos del producto deseado (en este caso, D-xilosa), ya que entonces se incrementaría su concentración en el hidrolizado. En este apartado se estudia cómo afecta la carga de hueso al proceso de pretratamiento ácido. Para ello, se planteó un diseño experimental (PT4) con 11 ensayos de hidrólisis en los que se modificaron, a dos niveles, tanto la carga de hueso alimentada al reactor (P_S , o X_1) como la concentración de ácido sulfúrico de la disolución (C_A , o X_2). En la Figura 4.13 aparece el diseño factorial. Entre paréntesis se indican los valores codificados (X_1 , X_2) de las dos variables a estudiar (por ejemplo, “0,0” para el punto central del diseño; es decir, la prueba se realiza, por triplicado, con carga de hueso igual a 100 g y con concentración de ácido sulfúrico 0,020 M). El punto de coordenadas (-1,-1) de esta serie coincide con las condiciones marcadas por el punto central (0,0) en la serie PT2. Por tanto, la temperatura máxima de reacción (T) y el tiempo al que se ésta se mantiene (t) se fijaron en 200°C y 5 minutos, que son condiciones prácticamente coincidentes con las que maximizan la D-xilosa en los tratamientos de la serie PT2 (201°C y 5,2 min, según el Apartado 4.2.2.2). El volumen de hidrolizado se mantuvo constante en 300 mL.

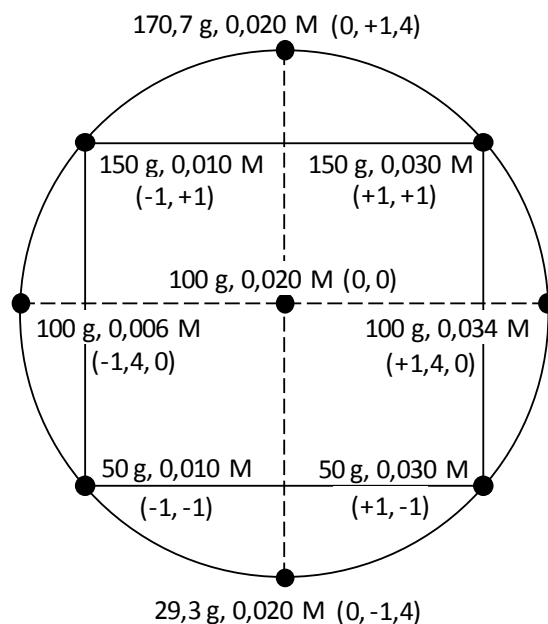


Figura 4.13 Diseño factorial para la serie PT4

4.2.3.1 Caracterización del residuo sólido

Los residuos sólidos generados en la serie PT4 fueron secados, pesados y caracterizados con el fin de determinar los porcentajes de recuperación de sólido, hemicelulosa, celulosa y lignina ácido insoluble (Tabla 4.23). El análisis estadístico mediante MODDE 6.0 sólo pudo ser aplicado sobre el porcentaje de recuperación de sólido (RS).

Tabla 4.23 Porcentaje de recuperación y composición de los sólidos obtenidos en la serie PT4

Experimento	P_s , g	C_A , M	RS, %	HEM, %	CEL, %	LAI, %
1	29,3	0,02	54,1	0,0	40,8	45,1
2	50	0,01	62,8	0,0	34,1	42,3
3	50	0,03	54,7	0,6	34,9	43,8
4	100	0,006	67,5	0,0	35,3	40,7
5, 6, 7	100	0,02	64,4±1,3	0,0±0,0	35,6±2,4	40,3±0,8
8	100	0,034	60,2	0,0	33,0	45,6
9	150	0,01	69,0	0,0	20,1	55,5
10	150	0,03	66,6	0,0	34,3	40,5
11	170,7	0,02	69,2	0,0	33,1	40,1

El porcentaje de sólido solubilizado durante los tratamientos ácidos dependió, tal y como se discutió en el Apartado 4.2.2, de la temperatura y el tiempo de reacción; pero igualmente importantes fueron otras variables para explicar las reducciones de peso de los sólidos durante las hidrólisis. Si se modifica la carga de sólido en el reactor (P_s) y la concentración de ácido (C_A), manteniendo fijas la temperatura y el tiempo de reacción, es lógico pensar que los

porcentajes de sólido transferidos a la fase líquida se incrementarán al disminuir P_s y aumentar C_A , ya que al bajar la ratio (peso sólido/peso ácido) quedará disponible mayor cantidad de catalizador, a mayor concentración, para hidrolizar sustrato. Esto es lo que observa en la Tabla 4.23 y en la Figura 5.10, donde se comprueba la tendencia a la disminución del porcentaje de sólido solubilizado con el incremento de la carga de endocarpios (45,9% para 29,3 g-0,020 M; 35,6% para 100 g-0,020 M; 30,8% para 170,7 g-0,020 M) y la del aumento del parámetro cuando, manteniendo la carga de sólido constante, se eleva la concentración de ácido (37,2% para 50 g-0,010 M y 45,3% para 50 g-0,030 M), Figura 4.14.

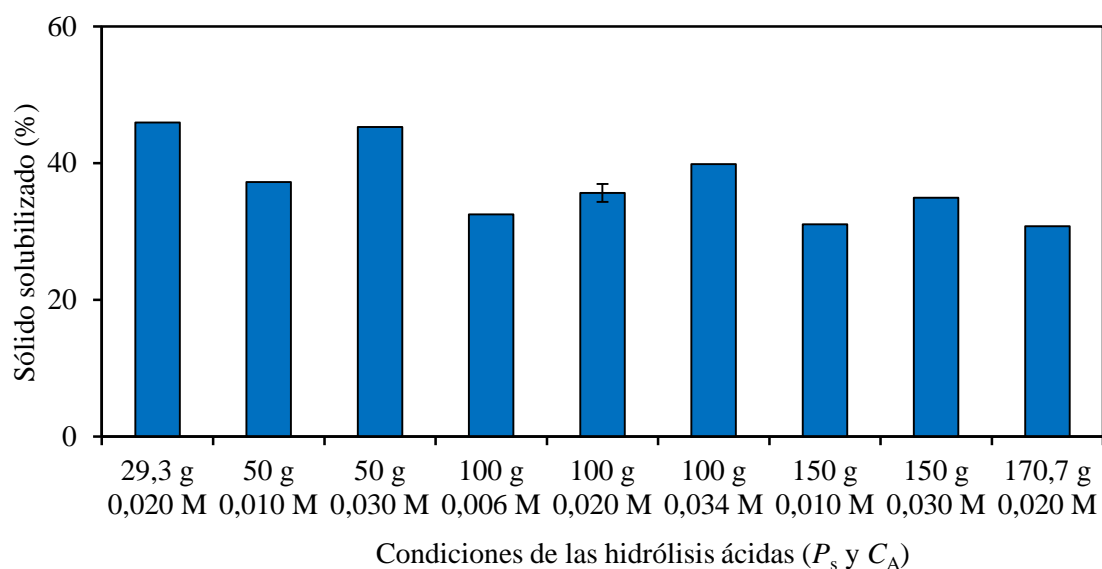


Figura 4.14 Porcentaje de sólido solubilizado, PT4

El análisis de varianza (ANOVA) que surgió al aplicar los datos de recuperación de sólido (RS) contenidos en la Tabla 4.23 al programa MODDE 6.0 permitió establecer el efecto de las variables P_s y C_A (X_{PS} y X_{CA} en forma codificada) sobre dicho parámetro. Así se obtuvieron los datos de la Tabla 4.24.

Tabla 4.24 Efecto estimado (EE), errores estándar (ES) y nivel de significación (p) para el modelo de ajuste del porcentaje de recuperación de sólido (RS) en los huesos pretratados de aceituna (PT4)

Respuesta	Términos modelo	EE	ES	p -valor (Prob > F)
RS, %	Constante	64,1524	$\pm 0,5329$	0,0000
	X_{PS}	4,7442	$\pm 0,4486$	0,0000
	X_{CA}	-2,7938	$\pm 0,4486$	0,0004
	$X_{PS} \cdot X_{PS}$	-1,2586	$\pm 0,5104$	0,0431
	R^2	0,957		
	$R^2_{ajustado}$	0,939		

X_{PS} : peso de sólido (forma codificada); X_{CA} : concentración de ácido (forma codificada). El nivel de significación fue definido como $p < 0.05$.

En la Figura 4.15 se muestran los valores reales (observados experimentalmente) y los estimados mediante el modelo de la Tabla 4.24, apreciándose una estrecha concordancia entre ambos.

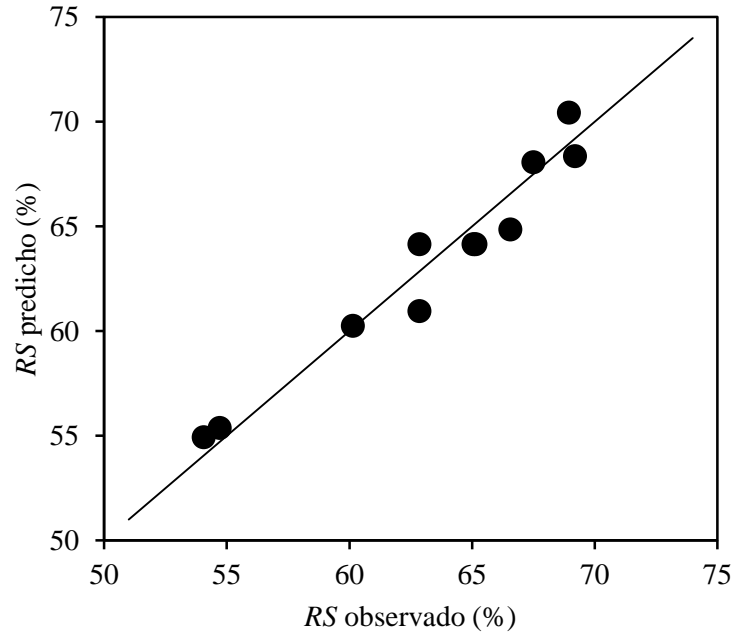


Figura 4.15 Porcentajes de recuperación de sólido (reales y predichos por el modelo matemático) para los experimentos de la serie PT4

4.2.3.2 Caracterización del hidrolizado líquido

Los datos de rendimiento de productos en los hidrolizados líquidos de la serie PT4 (Tabla 4.25) mostraron como la producción de D-glucosa fue baja para toda la región de condiciones operativas ensayadas, salvo cuando se combinaron bajas cargas de sólido y altas concentraciones de ácido (extremo inferior-derecha de la Figura 4.13). Por ejemplo, el experimento 3, codificado como (+1,-1) genera un rendimiento de D-glucosa igual a 2,5 g por cada 100 g de materia prima. Este comportamiento podría deberse al hecho de que un incremento de ácido podría intensificar la hidrólisis de las cadenas de oligosacáridos celulósicos presentes en medio líquido.

Tabla 4.25 Rendimiento de productos (g/100 g material prima) en los hidrolizados líquidos del PT4

Experimento	1	2	3	4	5, 6, 7	8	9	10	11
P_s , g	29,3	50	50	100	100	100	150	150	170,7
C_A , M	0,02	0,01	0,03	0,006	0,02	0,034	0,01	0,03	0,02
XIL	18,8	20,0	15,6	9,6	$19,1 \pm 0,5$	18,1	4,0	19,1	10,8
ARA	0,52	0,95	0,67	0,97	$1,1 \pm 0,02$	0,88	0,87	1,1	0,81
GAL	0,63	0,54	0,54	0,40	$0,55 \pm 0,01$	0,49	0,36	0,54	0,39
GLU	1,1	0,62	2,5	0,0	$0,0 \pm 0,0$	0,94	0,0	0,14	0,0
ACE	3,2	3,3	2,5	4,7	$6,3 \pm 1,2$	n.d.	4,6	6,4	3,2
HMF	0,01	0,0	0,27	0,0	$0,03 \pm 0,02$	0,01	0,0	0,12	0,11

Entre los cuatro carbohidratos analizados en los líquidos, D-xilosa fue el que apareció en mayor concentración. Un estudio de superficies de respuesta y gráficos de contorno aplicado sobre la pentosa muestra (Figuras 4.16 y 4.17) como su producción máxima se consiguió bajo las condiciones localizadas sobre la diagonal que determinan los puntos (-1,-1), (0,0) y (+1,+1) del diseño experimental. La región de condiciones por encima de la diagonal ven limitada la producción de D-xilosa por el déficit de catalizador, mientras que el área por debajo de la diagonal encierra condiciones en las que el exceso de ácido provoca degradación intensa de monosacáridos. Las áreas coloreadas en rojo y en naranja en las Figuras 4.16 y 4.17 delimitan regiones operativas en las que se obtienen rendimientos de D-xilosa iguales o superiores al 20 y al 19%, respectivamente.

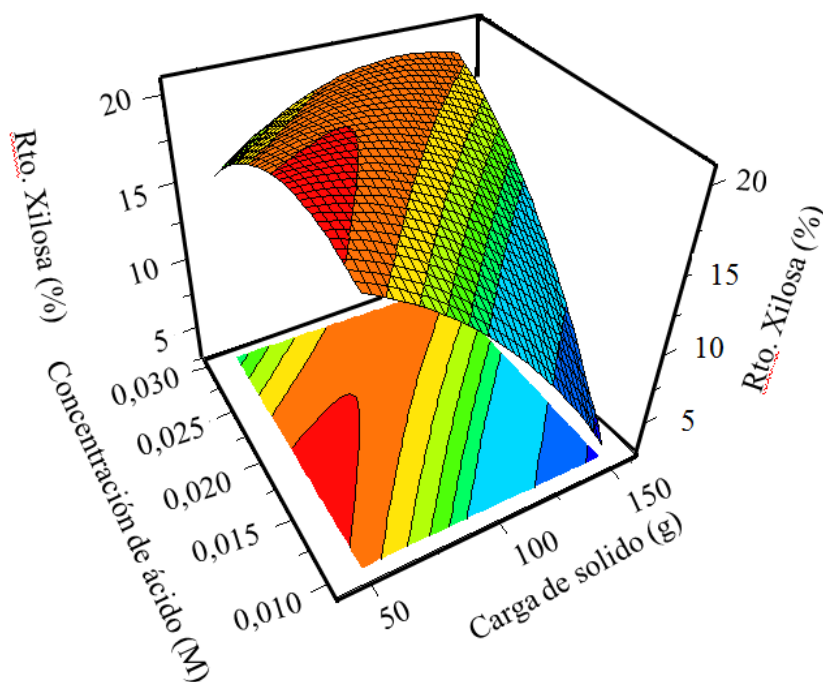


Figura 4.16 Superficie de respuesta para el rendimiento de D-xilosa en la serie PT4

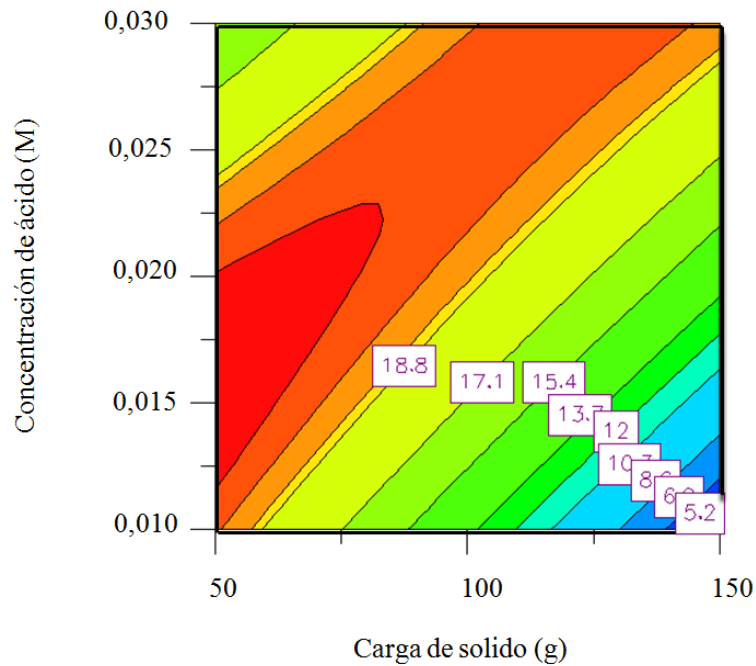


Figura 4.17 Gráfico de contorno: influencia de P_S y C_A en el rendimiento de D-xilosa para PT4

La ecuación de ajuste de los datos de Y_{XIL} en función de X_{PS} y X_{CA} (valores codificados de P_S y C_A , respectivamente) es mostrada en la Tabla 4.26. En ella también se incorporan los términos del modelo de ajuste para Y_{ARA} .

Tabla 4.26 Efecto estimado (EE), errores estándar (ES) y nivel de significación (p) para los modelos de ajuste de los rendimiento de D-xilosa (Y_{XIL} , %) y L-arabinosa (Y_{ARA} , %) en los hidrolizados líquidos del PT4

Respuesta	Términos modelo	EE	ES	p -valor (Prob > F)
Y_{XIL} , %	onstante	19,07	$\pm 0,29$	0,0000
	X_{PS}	-2,98	$\pm 0,18$	0,0000
	X_{CA}	2,83	$\pm 0,18$	0,0000
	$X_{PS} \cdot X_{PS}$	-2,05	$\pm 0,21$	0,0002
	$X_{CA} \cdot X_{CA}$	-2,53	$\pm 0,21$	0,0000
	$X_{PS} \cdot X_{CA}$	4,89	$\pm 0,25$	0,0000
	R^2	0,995		
Y_{ARA} , %	$R^2_{ajustado}$	0,991		
	Constante	1,01	$\pm 0,04$	0,0000
	X_{PS}	0,12	$\pm 0,03$	0,0086
	$X_{PS} \cdot X_{PS}$	-0,17	$\pm 0,04$	0,0017
	R^2	0,836		
	$R^2_{ajustado}$	0,789		

X_{PS} : peso de sólido (forma codificada); X_{CA} : concentración de ácido (forma codificada). El nivel de significación fue definido como $p < 0,05$.

La Figura 4.17 demuestra que es imposible obtener rendimientos de D-xilosa superiores al 20% (área roja) con cargas de hueso por encima de 80 g (relación S/L de 0,27). Sin embargo, es viable alcanzar la región de rendimientos del 19,5% (área naranja-intenso) con cargas de sólido de hasta 130 g, o incluso llegar a una relación S/L igual a la 1/2 admitiendo rendimiento cercanos al 19%. Hay que pensar que un rendimiento del 19% aplicado sobre 150 g de endocarpios secos, y referido a un volumen de líquido de 300 mL, genera un hidrolizado con concentraciones de D-xilosa cercanas a 100 g/L.

En relación a los inhibidores fermentativos, la Tabla 4.25 muestra cómo los máximos rendimientos de 5-hidroximetilfurfural (0,27 g por cada 100 g de materia prima) se consiguieron en las condiciones para las que empieza a ser significativa la producción de D-glucosa; es decir, aquellas con alta carga de ácido y baja de sólido (50 g y 0,030 M). Estas condiciones, tal y como se observa en la Figura 4.16, son lejanas a las que maximizan el rendimiento de D-xilosa. Así, el valor de Y_{HMF} para el experimento (+1,+1) fue relativamente bajo (0,12%), lo que equivale a una concentración aproximada de 0,6 g/L en los 300 mL de hidrolizado original. En cualquier caso, el inhibidor fermentativo que aparece en mayor cantidad en los hidrolizados (Tabla 4.25), sobre todo en los líquidos más concentrados en D-xilosa, es el ácido acético. Por ejemplo, el experimento de coordenadas (+1,+1) tiene un valor de Y_{ACE} del 6,4%, lo que equivale a una concentración de producto próxima a 32 g/L en el hidrolizado original. Este valor obligaría, si se quiere fermentar el hidrolizado, a someterlo a una detoxificación (por ejemplo por calentamiento en rotavapor).

4.2.4 Hidrólisis ácidas con relación sólido/líquido 1/3 (PT5)

En el Apartado 4.2.3 se estudió la influencia de la carga de biomasa en las hidrólisis ácidas, mostrándose cómo es posible operar con altas relaciones S/L sin que el rendimiento de D-xilosa sufra reducciones significativas. Para reforzar esta idea, se llevó a cabo una nueva serie experimental en la que se trabajó con 100 g de hueso seco de aceituna y 300 mL de disolución de H_2SO_4 de concentración 0,025 M. Las temperaturas máximas de hidrólisis fueron 190, 195, 200, 205, 210 y 215°C. La temperatura máxima se mantuvo durante 5 minutos.

4.2.4.1 Caracterización del residuo sólido

El incremento de la temperatura de hidrólisis (desde 190 hasta 215°C) trajo consigo un descenso en el porcentaje de recuperación de sólido (desde 68,7 hasta 58,4%), Tabla 4.27. Los valores aquí obtenidos son del mismo rango, pero algo superiores, a los encontrados cuando ácido sulfúrico 0,025 M hidrolizó endocarpios de aceituna con una relación S/L de 1/6

(Apartado 4.2.1.1). Así, a 200°C el valor de RS para relaciones 1/6 y 1/3 fue del 63,5 y 63,7%, respectivamente, mientras que a 205°C los datos fueron 60,7 y 62,5%.

Tabla 4.27 Caracterización (porcentajes y conversiones fraccionales) del residuo sólido en la serie PT5

Exp.	T, °C	t, min	RS, %	HEM, %	X _{HEM} , %	CEL, %	X _{CEL} , %	LAI, %	X _{LAI} , %
SE2 ₁	190	5	68,7	3,3	92,2	34,4	8,8	37,7	22,2
SE2 ₂	195	5	66,5	1,9	95,6	35,8	8,1	37,5	25,1
SE2 ₃	200	5	63,7	0,1	99,8	35,4	12,9	39,7	24,1
SE2 ₄	205	5	62,5	0,0	100	37,0	10,7	40,2	24,5
SE2 ₅	210	5	63,2	0,0	100	34,6	15,6	39,1	25,8
SE2 ₆	215	5	58,4	0,0	100	34,5	22,2	41,8	26,7

La fracción hemicelulósica desapareció del residuo sólido a 205°C ($X_{\text{HEM}} = 100\%$), mientras que a temperaturas en el rango 190–200°C el porcentaje de este material fue muy bajo (inferior al 5%). En relación a la celulosa y la lignina, sus comportamientos en esta serie experimental fueron análogos a los ya analizados en el Apartado 4.2.1.1 utilizando una relación S/L de 1/6. Para la fracción celulósica, en la serie PT5, el incremento de temperatura aumentó su porcentaje en el residuo sólido hasta alcanzar un valor máximo del 37,0% a 205°C. Con la relación 1/6 el máximo valor de CEL (37,2%) fue también alcanzado a 205°C. Temperaturas superiores a la señalada ocasionaron un ligero descenso en el parámetro operando tanto con altas como con bajas cargas de sólido. La máxima conversión fraccional de celulosa fue del 22,2% a 215°C. El porcentaje de lignina en la serie PT5 mantuvo una tendencia general al incremento con el aumento de la temperatura de hidrólisis. Así, se alcanzó un porcentaje máximo del 41,8% a 215°C. Tal y como se observa en la Tabla 4.27, la conversión fraccional de lignina no se modificó significativamente (22,2–26,7%) en el intervalo de temperaturas estudiado 190–215°C, a diferencia de lo que le ocurrió a la fracción de celulosa (8,8–22,2%).

4.2.4.2 Caracterización del hidrolizado líquido

Tras realizar las hidrólisis ácidas de la serie PT5 se caracterizaron los hidrolizados líquidos completándose las Tablas 4.28 (concentraciones) y 4.29 (rendimientos). En la Tabla 4.28 se incorpora el dato de volumen final de hidrolizado, ya que a los 300 mL de líquido que salieron del reactor en cada ensayo se le sumó un volumen variable de agua destinada al lavado de los residuos sólidos. La máxima concentración de D-xilosa fue de 36,0 g/L a 205°C-5 min. Para L-arabinosa y D-galactosa sus concentraciones disminuyeron con el incremento de temperatura. Para D-glucosa la tendencia fue opuesta; es decir, a bajas temperaturas no se detectó este monosacárido y a 215°C se logró la máxima concentración (0,72 g/L). La Tabla 4.28 muestra como D-xilosa es el carbohidrato más importante en fase líquida, suponiendo más del 90% del

peso total de monosacáridos. También es destacable la producción de ácido acético, compuesto que superó la concentración de 9 g/L en el experimento PT5₅.

Tabla 4.28 Caracterización del líquido directo en la serie PT5. Concentraciones de hexosas, pentosas y ácido acético

Exp.	T, °C	V, mL	Concentración, g/L				
			D-xilosa	L-arabinosa	D-galactosa	D-glucosa	ácido acético
PT5 ₁	190	500	31,4	1,6	0,84	0,0	6,5
PT5 ₂	195	500	31,8	1,7	0,95	0,0	6,7
PT5 ₃	200	502	35,4	1,4	0,90	0,0	7,8
PT5 ₄	205	500	36,0	1,4	0,94	0,44	8,9
PT5 ₅	210	517	26,5	0,93	0,75	0,47	9,2
PT5 ₆	215	566	17,1	0,50	0,61	0,72	8,7

^a temperatura mantenida durante 5 minutos. V: volumen.

A partir de los valores de la Tabla 4.28 se calcularon los rendimientos de productos en los hidrolizados. Así surge la Tabla 4.29. El máximo rendimiento de D-xilosa (17,6%) se obtuvo en las condiciones 200°C-5 min y 205°C-5 min. Este dato de producción de pentosa es ligeramente inferior al obtenido en la serie experimental PT3 (diseño factorial con H₂SO₄ 0,025 M y relación S/L de 1/6), lo que mostraría como el incremento de la carga de hueso, desde 50 g hasta 100 g, no repercutió, con intensidad, en la generación de D-xilosa. Las temperaturas superiores a 205°C condujeron a fuertes descensos en Y_{XIL} (13,4% a 210°C y 9,5% a 215°C) por degradación térmica del azúcar. Los máximos rendimientos de L-arabinosa (0,84%) y D-galactosa (0,47%) se alcanzaron a 195°C, mientras que D-glucosa se maximizó (0,40%) a 215°C. En relación al ácido acético, la tendencia mostrada en la Tabla 4.29 es clara, incremento de rendimiento al aumentar la temperatura.

Tabla 4.29 Caracterización del líquido directo en la serie PT5. Rendimientos en productos

Exp.	T, °C	V, mL	Rendimiento, %				
			D-xilosa	L-arabinosa	D-galactosa	D-glucosa	ácido acético
PT5 ₁	190	500	15,6	0,78	0,42	0,0	3,2
PT5 ₂	195	500	15,8	0,84	0,47	0,0	3,3
PT5 ₃	200	502	17,6	0,72	0,45	0,0	3,9
PT5 ₄	205	500	17,6	0,70	0,46	0,22	4,4
PT5 ₅	210	517	13,4	0,47	0,38	0,24	4,7
PT5 ₆	215	566	9,5	0,27	0,34	0,40	4,8

^a temperatura mantenida durante 5 minutos. V: volumen.

4.3 Hidrólisis enzimáticas

Este apartado está dedicado al estudio de la hidrólisis enzimática de la celulosa pretratada tras aplicar pretratamientos con ácido sulfúrico diluido. Se desarrollaron las siguientes 4 series experimentales.

- HE1:** Hidrólisis del sólido pretratado. Influencia de la carga de enzima.
- HE2:** Hidrólisis del sólido pretratado. Efecto de la temperatura de pretratamiento.
- HE3:** Hidrólisis del sólido pretratado. Influencia del tamaño de partícula.
- HE4:** Hidrólisis conjunta del sólido pretratado y el hidrolizado líquido.

4.3.1 Hidrólisis del sólido pretratado. Influencia de la carga de enzima (HE1)

En primer lugar, se estudió el efecto de la carga de enzima en la hidrólisis de sólidos pretratados con ácido sulfúrico. Para ello se emplearon dos sólidos diferentes, concretamente los generados al aplicar las condiciones que maximizan la producción de D-xilosa usando disoluciones de H₂SO₄ de concentración 0,010 y 0,025 M (series PT2 y PT3, respectivamente). Estos sólidos se nombraron “OPT-PT2” (201°C-5,2 min-0,010 M) y “OPT-PT3” (195°C-5 min-0,025 M).

Las hidrólisis enzimáticas se llevaron a cabo a 50°C y pH 4,8 en matraces Erlenmeyer y agitador orbital (150 rpm). Las cargas de enzima (Celluclast 1.5) ensayadas fueron de 10, 20, 40 y 60 UPF/g de sólido pretratado. También se llevaron a cabo hidrólisis sobre una muestra de sustrato control (papel de celulosa pura, Whatman n°1) y sobre los sólidos autoclavados en seco bajo las condiciones 121°C-20 min. Esta última prueba pretendió poner de manifiesto si una etapa de esterilización del sólido (fundamental si se desea llevar a cabo la hidrólisis enzimática sin posibilidad de contaminación microbiana) afecta a la capacidad de digestión de los sólidos.

La evolución de la concentración de D-glucosa, a lo largo de 120 horas de hidrólisis, se muestra en la Tabla 4.30, pudiéndose observar como la máxima concentración de producto se dio con sustrato control (47,2 g/L), mientras que el empleo de huesos pretratados condujo, como máximo, a 38,3 g/L (OPT-PT2) y 36,8 g/L (OPT-PT3) de D-glucosa.

Tabla 4.30 Hidrólisis enzimática HE1. Concentración de D-glucosa, g/L

Sólido	Carga enzima ^a , UPF/g	Tiempo, h						
		0	4	10	24	48	72	120
OPT-PT2	0	0	--	--	2,0	1,2	1,4	0,3
	10	0	0,8	2,8	5,0	7,4	9,5	16,6
	20	0	2,4	5,1	7,5	9,1	12,8	15,5
	20 ^b	0	11,3	--	27,8	26,4	36,8	47,2
	20 ^c	0	0,5	1,1	0,9	1,7	1,5	2,8
	40	0	1,4	5,3	12,0	15,6	20,5	38,3
	60	0	1,7	2,7	12,2	15,9	20,2	34,7
OPT-PT3	0	0	--	--	2,8	2,8	2,6	2,2
	10	0	1,1	4,3	7,0	8,8	11,2	19,2
	20	0	3,3	7,3	10,8	18,8	16,9	19,8
	20 ^b	0	11,3	--	27,8	26,4	36,8	47,2
	20 ^c	0	0,5	1,3	1,4	2,3	3,1	3,8
	40	0	1,6	6,4	10,3	18,9	21,9	36,8
	60	0	1,6	5,0	15,8	15,7	21,9	31,6

^aCelluclast 1.5. ^bControl realizado con papel Watman n°1 con carga de enzima 20 UPF/g. ^cSólido autoclavado.

El rendimiento de D-glucosa (Y_{GLU}) se calculó refiriendo el peso de hexosa producida durante el bioproceso al peso total de sólido seco usado como sustrato; así se determinaron los datos de la Tabla 4.31, expresados en tanto por ciento en peso.

Tabla 4.31 Hidrólisis enzimática HE1. Rendimiento en D-glucosa (Y_{GLU} , %)

Sólido	Carga enzima ^a , UPF/g	Tiempo, h						
		0	4	10	24	48	72	120
OPT-PT2	0	0	--	--	1,9	1,1	1,3	0,3
	10	0	0,8	3,0	5,2	7,6	9,6	16,4
	20	0	2,3	4,9	7,0	8,4	11,7	13,8
	20 ^b	0	11,7	--	28,0	26,1	36,1	45,1
	20 ^c	0	0,5	1,0	0,8	1,5	1,3	2,4
	40	0	1,5	5,5	12,4	15,7	20,4	36,8
	60	0	1,8	2,9	12,6	16,1	20,4	34,2
OPT-PT3	0	0	--	--	2,7	2,7	2,5	2,1
	10	0	1,1	4,5	7,3	9,0	11,3	18,9
	20	0	3,2	7,0	10,1	17,3	15,5	17,6
	20 ^b	0	11,7	--	28,0	26,1	36,1	45,1
	20 ^c	0	0,5	1,2	1,3	2,1	2,8	3,4
	40	0	1,7	6,7	10,6	19,3	22,2	36,5
	60	0	2,0	6,1	19,0	18,7	25,8	36,4

^aCelluclast 1.5. ^bControl realizado con papel Watman n°1 con carga de enzima 20 UPF/g. ^cSólido autoclavado.

Al analizar la Tabla 4.31 se pusieron de manifiesto las siguientes consideraciones:

1. La hidrólisis de celulosa pura (papel Whatman n°1) con carga de enzima de 20 UPF/g no logró la hidrólisis completa del sustrato, lo que pudo deberse a la existencia de un fenómeno de inhibición por producto. En ese caso, la concentración de 47,2 g/L de D-glucosa (Tabla 4.30) inhibiría significativamente la acción del biocatalizador en las condiciones ensayadas.
2. La producción de D-glucosa fue muy similar para los dos sólidos ensayados. Es decir, si se pretrata hueso de aceituna con ácido sulfúrico 0,010 o 0,025 M en condiciones que maximizan la recuperación de D-xilosa en el prehidrolizado, los sólidos pretratados resultantes poseen similares digestibilidades enzimáticas (Tabla 4.31). Así, para una carga de enzima de 40 UPF/g y 120 h de reacción, Y_{GLU} alcanzó valores de 36,8 y 36,5% para OPT-PT2 y OPT-PT3, respectivamente. La poca diferencia en los rendimientos de D-glucosa para los dos sólidos podría ser explicada considerando la poca diferencia de temperatura de los dos pretratamientos ácidos (sólo cinco grados Celsius).
3. Los sólidos autoclavados a 121°C durante 20 minutos, con objeto de eliminar microorganismos, mostraron una digestibilidad enzimática prácticamente nula. Así, al comparar Y_{GLU} de los experimentos llevados a cabo con 20 UPF/g con o sin esterilización, se obtuvieron los datos de 2,4 y 13,8% (para el sólido OPT-PT2) y 3,4 y 17,6% (para el sólido OPT-PT3). El comportamiento observado pudo estar causado por la reducción del tamaño de poro del sólido durante su calentamiento a 121°C. Esto obliga a evitar la esterilización térmica en seco de los sólidos destinados a hidrólisis enzimática.
4. Las cargas enzimáticas de 40 y 60 UPF/g condujeron a rendimientos finales de D-glucosa muy superiores a los obtenidos con cargas de 10 y 20 UPF/g (Tabla 4.31). Sin embargo, no existieron incrementos de la producción de hexosa cuando la carga de enzima pasó de 40 a 60 UPF/g; debido a que el biocatalizador es relativamente caro, para el desarrollo de las siguientes hidrólisis enzimáticas, se optó por usar una carga de celulasa igual a 40 UPF/g.

4.3.2 Hidrólisis del sólido pretratado. Efecto de la temperatura de pretratamiento (HE2)

La temperatura a la que se lleve a cabo la hidrólisis ácida de un material lignocelulósico es un factor determinante en el grado de despolimerización de sus fibras hemicelulósicas y celulósicas. Por tanto, esa temperatura también debe tener un efecto significativo en la digestibilidad enzimática de la celulosa pretratada del hueso de aceituna. En este apartado se

estudia dicho efecto. Para ello se utilizaron los sólidos pretratados analizados en el Apartado 4.2.4; es decir, aquellos que resultan de hidrolizar la materia prima con H₂SO₄ de concentración 0,025 M usando una relación S/L igual a 1/3 y temperaturas entre 190 y 215°C. Los datos de composición de los residuos sólidos se muestran en la Tabla 4.27. También se llevaron a cabo hidrólisis sobre muestras de hueso sin pretratar (experimento control). Las hidrólisis enzimáticas se llevaron a cabo a 50°C y pH 4,8 en matraces Erlenmeyer y agitador orbital (150 rpm). En esta ocasión, la mezcla de enzimas utilizada estuvo compuesta por celulasas (Celluclast 1.5) y β-glucosidasas (Novozyme188). La actividad enzimática “celulasa” fue de 40 UPF/g de sólido pretratado (Celluclast 1.5). La adición de Novozyme188 se realizó añadiendo la mitad del volumen de preparado enzimático correspondiente a Celluclast 1.5.

Durante los ensayos de esta serie experimental se observó cómo, en general, la concentración de D-glucosa se fue incrementando con el tiempo de hidrólisis. No obstante, en algunos experimentos (HE2₂ y HE2₅) se constató una suave caída del parámetro a 120 h (Tabla 4.32). Esto podría deberse al consumo de azúcar por parte de microorganismos, ya que, tal y como se explicó anteriormente, los sólidos no pudieron esterilizarse al comienzo del bioproceso. La concentración final de D-glucosa se fue incrementando con el aumento de la temperatura de pretratamiento hasta que alcanzó un máximo de 20,9 g/L en el ensayo HE2₆.

Tabla 4.32 Hidrólisis enzimática (HE2). Concentración de D-glucosa, g/L

Exp.	T, °C	Tiempo, h						
		0	4	10	24	48	72	120
Control	0	0	6,0	6,4	5,2	5,3	6,3	6,4
HE2 ₁	190	0	7,0	9,4	9,1	12,3	12,5	14,8
HE2 ₂	195	0	8,3	9,4	12,1	13,3	14,8	14,0
HE2 ₃	200	0	10,2	11,7	14,3	17,6	19,0	17,6
HE2 ₄	205	0	10,7	15,5	13,0	15,4	15,2	19,3
HE2 ₅	210	0	9,5	13,1	13,7	17,2	20,4	19,6
HE2 ₆	215	0	10,5	12,9	17,4	18,9	20,9	20,9

*Control: hueso no pretratado.

El rendimiento de D-glucosa, Y_{GLU}, se calculó refiriendo el peso de hexosa al peso total de sólido seco usado como sustrato (Tabla 4.33). Se comprobó, nuevamente, como es necesario pretratar el hueso por encima de 205°C para alcanzar la máxima producción de D-glucosa (23,6 g por cada 100 g de hueso pretratado a 210°C-5 min). Teniendo en cuenta que 100 g de sólido pretratado a 210°C-5 min poseen 34,6 g de celulosa (cantidad calculada al multiplicar RS por CEL), y que a partir de esta celulosa podrían generarse, como máximo, 38,5 g de D-glucosa (haciendo uso del factor 0,9 de transformación estequiométrica celulosa a D-glucosa) fue

posible evaluar un nuevo rendimiento de hidrólisis (Y_{HE}) que relaciona la D-glucosa generada con la D-glucosa potencial en el sólido pretratado. Los valores máximos de Y_{HE} fueron, para las temperaturas de 190, 195, 200, 205, 210 y 215°C, de 35,6, 44,0, 42,2, 39,4, 61,4 y 60,0%, respectivamente. Los resultados son el mismo orden que aquellos obtenidos por Fernández-Bolaños et al. (2001) al hidrolizar enzimáticamente (con una carga de celulasas de 70 UPF/g de celulosa) huesos de aceituna pretratados a 215°C durante 2 minutos mediante la técnica de explosión con vapor.

Tabla 4.33 Hidrólisis enzimática (HE2). Rendimiento en D-glucosa (Y_{GLU} , %)

Exp.	T, °C	Tiempo, h						
		0	4	10	24	48	72	120
Control	0	0	0,6	6,2	5,1	5,0	5,9	5,9
HE2 ₁	190	0	8,0	10,6	10,2	13,5	13,6	12,1
HE2 ₂	195	0	9,2	10,4	13,2	14,2	17,5	14,3
HE2 ₃	200	0	10,3	11,7	14,2	17,2	16,2	16,6
HE2 ₄	205	0	10,5	15,0	12,4	14,3	15,0	16,2
HE2 ₅	210	0	12,3	16,8	17,4	21,4	22,5	23,6
HE2 ₆	215	0	12,5	15,2	20,3	21,7	22,9	23,0

*Control: hueso no pretratado.

4.3.3 Hidrólisis del sólido pretratado. Influencia del tamaño de partícula (HE3)

Para estudiar el efecto del tamaño de sólido pretratado en la etapa de hidrólisis enzimática, se llevó a cabo una nueva serie experimental (HE3) en la que se hidrolizaron partículas de hueso con cuatro tamaños (>1,6 mm, 0,60-0,425 mm, 0,30-0,125 mm y < 0,125 mm) que habían sufrido pretratamiento entre 190 y 215°C. Los resultados de producción de D-glucosa en la etapa de hidrólisis enzimática, en forma de concentración o de rendimiento, se recogen en las Tablas 4.34 y 4.35, respectivamente. El análisis de los datos determina los siguientes puntos de interés:

- En general, para una misma temperatura de pretratamiento, a medida que disminuye el tamaño de partícula se obtienen mayores concentraciones y rendimientos de D-glucosa. Sin embargo, no se observaron grandes diferencias entre las producciones alcanzadas con sólidos de tamaño comprendido entre 0,30-0,125 mm y 0,60-0,425 mm.
- Las máximas concentraciones de D-glucosa no sobrepasaron los 46 g/L (Tabla 4.34). Esto pudo deberse a la aparición de fenómenos de inhibición por producto, ya que ese nivel de concentración fue similar al conseguido en la serie experimental HE1 cuando se hidrolizó enzimáticamente papel de celulosa Whatman n°1; es decir, sustrato sin barreras físicas de lignina.
- Para un mismo tamaño de partícula, el máximo rendimiento de D-glucosa se consiguió a 210°C, mientras que a 215°C el parámetro fue prácticamente el mismo o descendió

levemente para tamaños de partículas superiores a 0,125 mm. (Tabla 4.35). Así, para sólidos de tamaño superior a 1,6 mm pretratados a 210°C y 215°C los rendimientos fueron de 23,6 y 23%, respectivamente. Para sólidos de diámetro comprendido entre 0,30-0,125 mm, pretratados a 210°C y 215°C, Y_{GLU} alcanzó valores de 41,1 y 37,8%, respectivamente. Sin embargo, para tamaños de partículas menores de 0,125 mm se detecta que los rendimientos en D-glucosa son ligeramente superiores a 215°C. Los máximos rendimientos de D-glucosa (tamaños < 0,125 mm) fueron próximos a 62%.

Tabla 4.34 Hidrólisis enzimática (HE3). Concentración de D-glucosa, g/L

Tamaño, mm	Tiempo, h	T, °C					
		190	195	200	205	210	215
> 1,6	0	0	0	0	0	0	0
	4	7,0	8,3	10,2	10,7	9,5	10,5
	10	9,4	9,4	11,7	15,5	13,1	12,9
	24	9,1	12,1	14,3	13,0	13,7	17,4
	48	12,3	13,3	17,6	15,4	17,2	18,9
	72	12,5	14,8	19,0	15,2	20,4	20,9
	120	14,8	14,0	17,6	19,3	19,6	20,9
0,60-0,425	0	0	0	0	0	0	0
	4	9,1	14,5	18,6	24,2	33,5	28,1
	10	13,7	17,2	24,9	33,4	37,5	33,1
	24	18,8	22,9	28,5	33,8	36,1	39,1
	48	18,3	22,4	29,8	33,1	38,6	33,0
	72	19,8	20,9	31,5	38,0	38,7	39,6
	120	24,5	31,9	38,0	45,4	45,1	44,3
0,30-0,125	0	0	0	0	0	0	0
	4	4,7	9,8	14,7	16,1	23,5	25,3
	10	9,8	10,8	14,7	32,7	39,0	41,2
	24	10,8	19,5	28,1	33,4	41,3	38,2
	48	16,3	22,8	28,9	39,3	39,3	40,3
	72	18,9	27,6	33,6	41,0	42,4	38,4
	120	20,9	26,8	36,3	44,3	42,8	42,8
< 0,125	0	0	0	0	0	0	0
	4	15,5	15,9	21,7	23,1	28,2	28,6
	10	19,5	17,9	28,4	30,9	34,9	n.d.
	24	21,3	25,5	30,4	32,3	38,9	43,3
	48	22,3	25,4	34,4	41,2	39,5	44,1
	72	26,9	30,9	33,3	39,4	n.d.	44,2
	120	30,3	29,8	32,7	39,6	42,1	n.d.

n.d.: no determinado.

Tabla 4.35 Hidrólisis enzimática (HE3). Rendimiento en D-glucosa (Y_{GLU} , %)

Tamaño, mm	Tiempo,	T , °C					
		190	195	200	205	210	215
> 1,6	0	0	0	0	0	0	0
	4	8,0	9,2	10,3	10,5	12,3	12,5
	10	10,6	10,4	11,7	15,0	16,8	15,2
	24	10,2	13,2	14,2	12,4	17,4	20,3
	48	13,5	14,2	17,2	14,3	21,4	21,7
	72	13,6	17,5	16,2	15,0	22,5	22,9
	120	12,1	14,3	16,6	16,2	23,6	23,0
0,60-0,425	0	0	0	0	0	0	0
	4	9,2	14,5	18,5	23,6	36,1	28,3
	10	13,7	17,0	24,4	32,1	39,9	33,0
	24	18,3	22,1	27,4	31,6	37,7	38,1
	48	17,3	21,0	27,9	29,8	39,0	31,2
	72	18,1	19,0	28,7	32,7	37,9	36,3
	120	21,3	27,6	33,3	36,8	42,0	38,7
0,30-0,125	0	0	0	0	0	0	0
	4	5,1	10,1	14,8	16,2	26,5	26,2
	10	10,5	10,9	14,6	32,3	43,3	42,1
	24	11,3	19,2	27,3	32,1	44,8	38,1
	48	16,5	21,7	27,3	36,2	41,2	38,9
	72	18,4	25,2	30,7	35,9	42,9	35,8
	120	19,2	23,1	31,8	36,0	41,1	37,8
< 0,125	0	0	0	0	0	0	0
	4	22,7	23,4	31,8	33,9	41,3	42,4
	10	28,3	26,0	41,2	44,8	50,7	n.d.
	24	30,3	36,3	42,3	45,9	55,5	62,2
	48	30,8	35,0	45,4	56,9	54,7	61,6
	72	36,0	41,2	42,5	52,6	n.d.	59,9
	120	38,4	37,5	39,5	50,1	53,4	n.d.

n.d.: no determinado.

Si se representa gráficamente el rendimiento global de azúcares fermentables calculado como suma de los monosacáridos derivados de las etapas de pretratamiento con ácido diluido e hidrólisis enzimática, se observa que el máximo rendimiento de estos productos se logra llevando a cabo las hidrólisis ácidas a temperaturas entre 200°C y 210°C (Figura 4.18). Para temperaturas superiores, el rendimiento de D-glucosa en la etapa de hidrólisis enzimática podría incrementarse (tal y como se ha comentado en los párrafos anteriores), pero este aumento no logra compensar el descenso de carbohidratos que se produce, vía degradación térmica, durante la hidrólisis ácida. El valor más alto de rendimiento global de monosacáridos (54,5 g por cada

100 g de hueso de aceituna) se consiguió usando, durante la hidrólisis enzimática, sólidos de tamaño inferior a 0,125 mm (Figura 4.18).

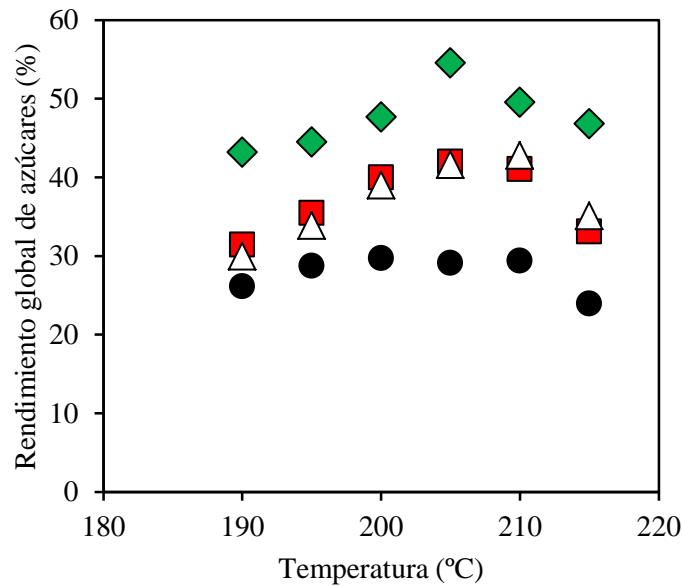


Figura 4.18 Influencia de la temperatura de pretratamiento y del tamaño de partícula en el rendimiento global de azúcares fermentables, ● > 1,6 mm, ■ 0,60-0,425 mm, △ 0,30-0,125 mm, ◆ < 0,125 mm

Teniendo en cuenta la composición del hueso utilizado en la presente Tesis Doctoral (Tabla 4.2), el potencial máximo de monosacáridos de la materia prima fue de 61,7 g/100 g hueso. Por tanto, en las mejores condiciones ensayadas pudo recuperarse un porcentaje de azúcares fermentables equivalente al 88,3% del total (Tabla 4.36).

Tabla 4.36 Porcentaje de recuperación de monosacáridos en el proceso completo (hidrólisis ácida + hidrólisis enzimática), %

T, °C	Tamaño de partícula, mm			
	>1,6	0,6-0,425	0,3-0,125	<0,125
190	42,3	50,9	48,6	69,9
195	46,6	57,4	54,9	72,1
200	48,1	64,8	63,2	77,2
205	47,1	68,0	67,4	88,3
210	47,6	66,5	69,3	80,3
215	38,8	53,6	56,8	75,9

4.3.4 Hidrólisis conjunta de sólido pretratado e hidrolizado líquido (HE4)

Para concluir las series de hidrólisis enzimáticas, se ensayó la viabilidad de practicar estos procesos utilizando como sustrato no el sólido pretratado, limpio y seco (sustrato de las series HE1, HE2 y HE3), sino la suspensión completa (prehidrolizado líquido y partículas sólidas) obtenida en la etapa de pretratamiento con ácido sulfúrico diluido. Se llevaron a cabo dos ensayos de hidrólisis enzimática empleando, durante el pretratamiento, dos condiciones que maximizan (de acuerdo a la discusión del Apartado 4.2.2) la producción de D-xilosa: 201°C-5,2 min para una concentración de H₂SO₄ igual a 0,010 M (OPT-PT2) y 195°C-5 min para H₂SO₄ 0,025 M (OPT-PT3). La relación Sólido/Líquido utilizada en los pretratamientos fue 1/6. Las hidrólisis enzimáticas se practicaron en matraces Erlenmeyer de 1 L de capacidad total. El contenido del reactor a presión se trasvasó al matraz y fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos. En la etapa de hidrólisis enzimática las principales condiciones de operación fueron: 50°C, pH 4,8, agitación a 150 rpm, carga de celulasa (Celluclast 1.5) de 40 UPF/g sólido y carga de β-glucosidasa (Novozyme188) igual a la contenida en un volumen de preparado enzimático la mitad que el usado para Celluclast 1.5. Los datos de producción de D-glucosa durante las hidrólisis enzimáticas se incorporan, en forma de concentraciones y rendimientos, en las Tablas 4.37 y 4.38, respectivamente.

Tabla 4.37 Hidrólisis enzimática (HE4). Concentración de D-glucosa, g/L

Experimento	Pretratamiento	Tiempo, h						
		4	8	24	48	72	96	120
HE4 ₁	OPT-PT2	9,6	9,9	15,3	16,7	20,7	17,8	18,0
HE4 ₂	OPT-PT3	10,9	11,1	18,8	14,7	19,3	19,0	18,6

OPT-PT2: 200°C, 5 min, H₂SO₄ 0,010 M.OPT-PT3: 195°C, 5 min, H₂SO₄ 0,025 M.Tabla 4.38 Hidrólisis enzimática (HE4). Rendimiento en D-glucosa (Y_{GLU}, %)

Experimento	Pretratamiento	Tiempo, h						
		4	8	24	48	72	96	120
HE4 ₁	OPT-PT2	9,6	9,9	15,1	16,3	19,8	16,6	16,3
HE4 ₂	OPT-PT3	10,0	10,2	17,2	13,3	17,3	16,6	15,9

OPT-PT2: 200°C, 5 min, H₂SO₄ 0,010 M.OPT-PT3: 195°C, 5 min, H₂SO₄ 0,025 M.

Los rendimientos máximos de D-glucosa en las dos hidrólisis enzimáticas fueron 19,8% (HE4₁) y 17,3% (HE4₂), ambos alcanzados a las 72 h de bioproceso. Para tiempos superiores, la cantidad de hexosa disminuyó, posiblemente como consecuencia de la incipiente contaminación microbiana del medio. Al comparar los rendimientos máximos de las series HE1 y HE4 se comprobó como la acción enzimática sufrió una reducción muy significativa al hidrolizar los

sólidos pretratados sin separarlos del prehidrolizado líquido. Este fenómeno de inhibición enzimática por parte de los componentes del prehidrolizado ha sido puesto de relieve en diversas publicaciones. Así, Tengborg et al. (2001b) ensayaron pretratamientos de explosión con vapor sobre maderas blandas, y sometieron los sólidos resultantes a hidrólisis enzimática con y sin separación del prehidrolizado líquido; en el primer caso la conversión de la celulosa alcanzó un 30,3%, mientras que en el segundo el parámetro se redujo hasta un 19,5%.

4.4 Fermentación de hidrolizados (FE)

Tras el estudio de la hidrólisis enzimática, aplicada sobre el hueso de aceituna, se procedió a fermentar algunos de los hidrolizados obtenidos en las etapas de pretratamiento ácido o hidrólisis enzimática. Los hidrolizados fueron aquellos que presentaron mayores potenciales para generar bioproductos usando la levadura *Pachysolen tannophilus*. Este microorganismo, al igual que otras levaduras no tradicionales, es capaz de fermentar D-xilosa a xilitol (Sánchez et al., 2004; Cuevas et al., 2009) y etanol (Bravo et al., 1993; Zhao et al., 2008), productos de gran interés tanto en el campo alimentario como energético. Para estudiar el comportamiento de *P. tannophilus* al actuar sobre hidrolizados derivados del hueso de aceituna, se llevaron a cabo las siguientes series experimentales:

- FE1:** Fermentación del prehidrolizado ácido conseguido en el pretratamiento OPT-PT2. Se modificó la concentración de inóculo en el rango (0,5–4,0 g/L).
- FE2:** Fermentación del prehidrolizado ácido conseguido en el pretratamiento OPT-PT3. Se modificó la concentración de inóculo en el rango (0,5–4,0 g/L).
- FE3:** Fermentación de hidrolizados enzimáticos obtenidos con hueso de aceituna pretratado en las condiciones OPT-PT2 y OPT-PT3.

Antes de fermentar los prehidrolizados ácidos, éstos sufrieron una etapa de concentración en rotavapor operando a bajas temperaturas (35°C) y presiones. Con ello se pretendió conseguir un doble objetivo:

- a. Iniciar las fermentaciones con concentraciones iniciales de D-xilosa comprendidas entre 15 y 20 g/L.
- b. Detoxificar los medios; es decir, eliminar compuestos relativamente volátiles que pueden reducir la actividad de la levadura *P. tannophilus*. Algunos de estas especies químicas son el ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural y compuestos fenólicos (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a; Zhao y Xia, 2010). En bibliografía existe información sobre la bondad de la evaporación a presiones reducidas para la eliminación de estos compuestos (Quarta y Anese, 2012).

Al aplicar una evaporación a vacío sobre los hidrolizados se consiguió reducir algunos de los tóxicos microbianos presentes en la fase líquida. En concreto, se realizaron varias pruebas para relacionar el tiempo de concentración en rotavapor con la cantidad de ácido acético y 5-HMF en el prehidrolizado (Tabla 4.39).

Tabla 4.39 Evolución del peso de ácido acético en un hidrolizado durante su concentración en rotavapor ($T = 35^{\circ}\text{C}$).

t, min	Peso, g
0	2,9
20	2,6
40	2,7
60	2,4
80	1,2

La etapa de evaporación a vacío provocó un fuerte descenso en la concentración de ácido acético presente en el hidrolizado. La caída de ácido fue especialmente importante cuando el tiempo de detoxificación superó los 40 minutos. En el caso del furfural y el 5-HMF, éstos compuestos prácticamente desaparecieron del hidrolizado tras 40 minutos de evaporación. Esto es lo que se observa, de una forma cualitativa, en la Figura 4.19, en la que se muestran varios cromatogramas del hidrolizado señalándose la zona donde aparecen los picos relativos a los dos furanos antes comentados.

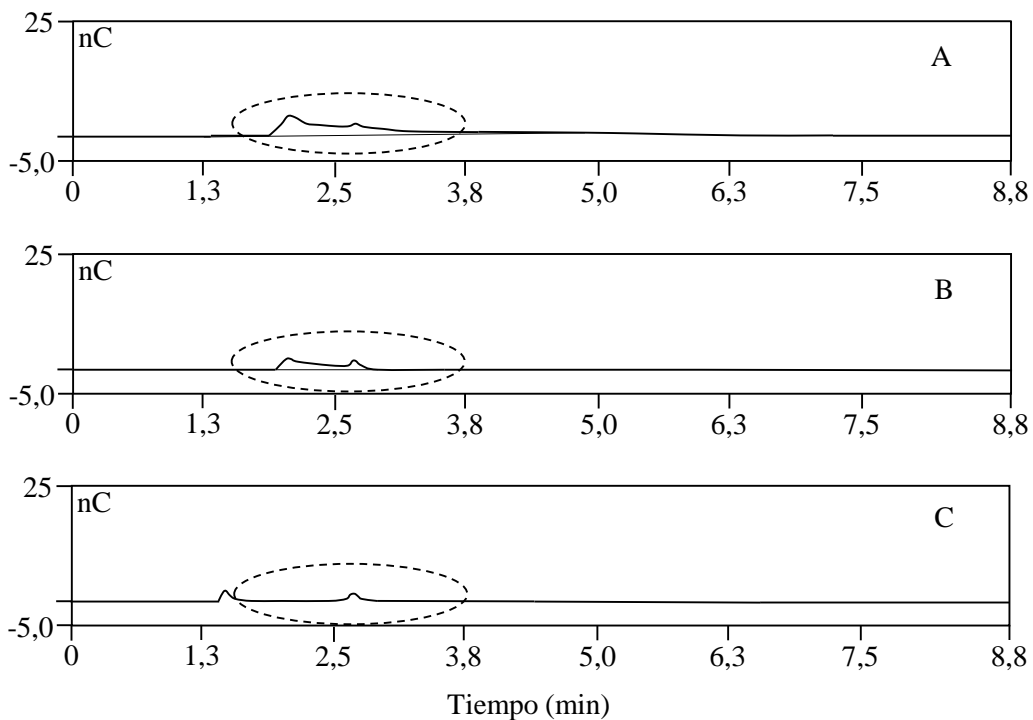


Figura 4.19 Cromatogramas del hidrolizado sometido a detoxificación mediante evaporación en rotavapor (35°C). Tiempo de destilación: 0 min (A), 20 min (B) y 40 min (C)

4.4.1 Fermentación del prehidrolizado ácido OPT-PT2 (FE1)

Se partió de prehidrolizados líquidos obtenidos tras someter huesos de aceituna a hidrólisis con ácido sulfúrico (0,010 M) bajo las condiciones de 201°C mantenidos durante 5,2 minutos. Estas condiciones son las que maximizaron la cantidad de D-xilosa en la fase líquida de acuerdo al diseño factorial de la serie PT2.

Antes de la fermentación, el prehidrolizado fue concentrado y detoxificado en rotavapor para alcanzar la siguiente composición: 14,45 g/L D-xilosa, 0,73 g/L de L-arabinosa, 0,28 g/L D-galactosa y 2,23 g/L de ácido acético. El tratamiento a vacío eliminó gran parte del ácido acético y los furanos presentes en el hidrolizado. No se detectó D-glucosa al comienzo de la fermentación.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 mL de capacidad, a 30°C, pH de 4,5, velocidad de agitación de 150 rpm y cuatro concentraciones de inóculo: 0,5, 1,0, 2,0 y 4,0 g/L.

La evolución de la concentración de biomasa, D-xilosa, L-arabinosa, ácido acético y xilitol a lo largo del proceso de fermentación se muestra en las Figuras 4.20 a 4.23.

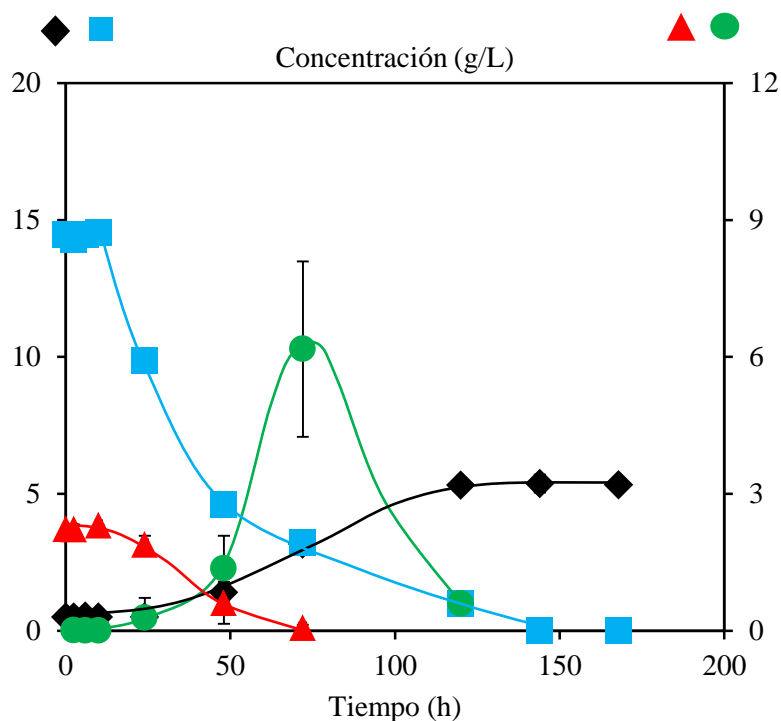


Figura 4.20 Concentración de biomasa (◆), D-xilosa (■), ácido acético (▲) y xilitol (●) en la fermentación FE1 llevada a cabo con concentración de inóculo 0,5 g/L

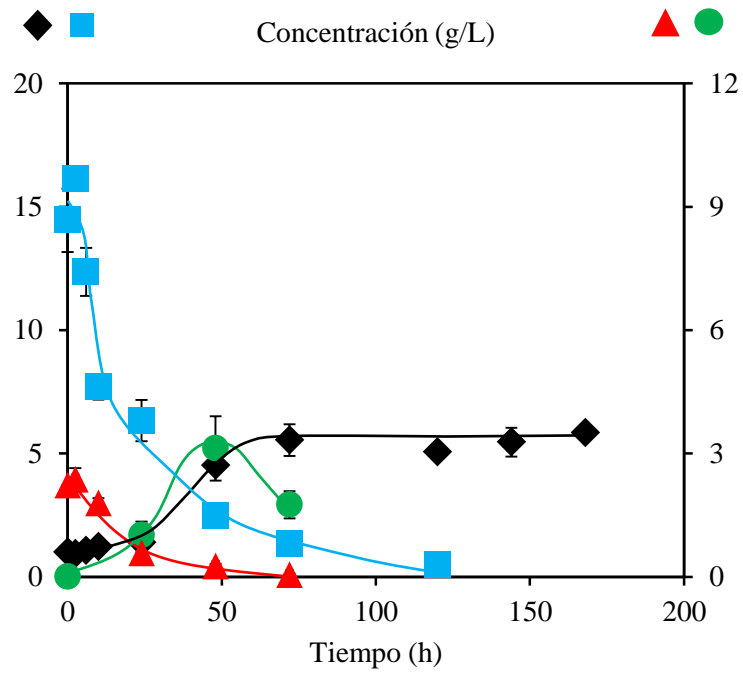


Figura 4.21 Concentración de biomasa (◆), D-xilosa (■), ácido acético (▲) y xilitol (●) en la fermentación FE1 llevada a cabo con concentración de inóculo 1,0 g/L

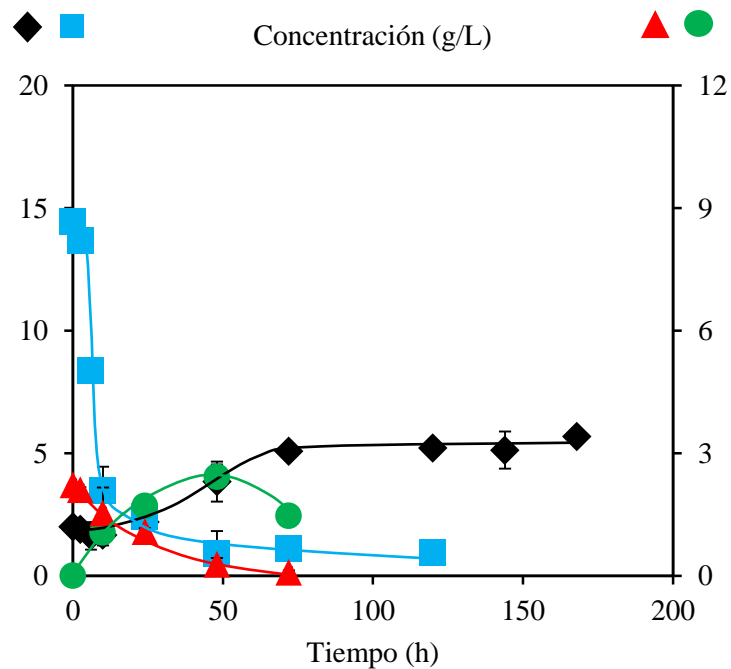


Figura 4.22 Concentración de biomasa (◆), D-xilosa (■), ácido acético (▲) y xilitol (●) en la fermentación FE1 llevada a cabo con concentración de inóculo 2,0 g/L

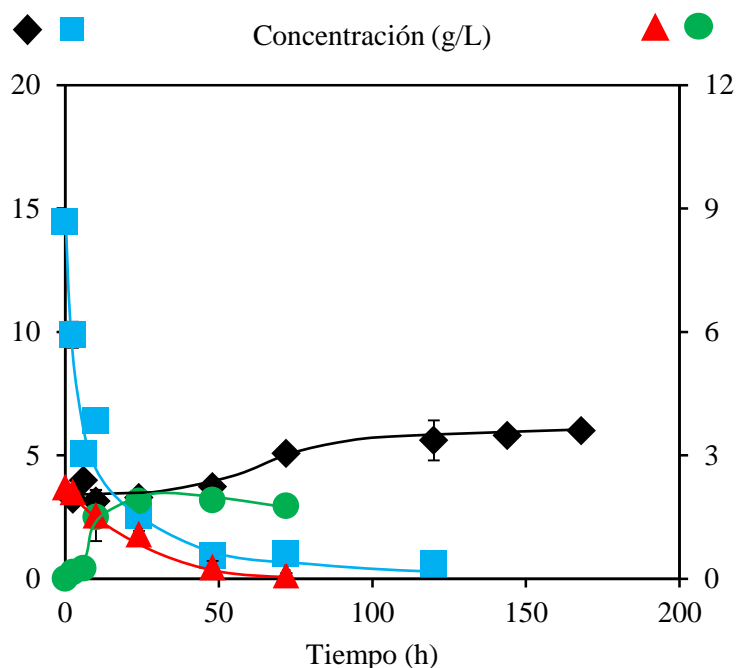


Figura 4.23 Concentración de biomasa (◆), D-xilosa (■), ácido acético (▲) y xilitol (●) en la fermentación FE1 llevada a cabo con concentración de inóculo 4,0 g/L

Pachysolen tannophilus consumió, durante la fermentación del hidrolizado ácido, tanto D-xilosa como ácido acético (Figuras 4.20 a 4.23). El monosacárido fue consumido por completo a las 144 h cuando se utilizó una concentración inicial de biomasa de 0,5 g/L. El incremento de la concentración de inóculo, desde 1,0 hasta 4,0 g/L, redujo el tiempo necesario para el consumo de D-xilosa a 120 h y 48 h, respectivamente. En relación al ácido acético, para todos los ensayos este compuesto fue consumido por la levadura a las 72 h. En cualquier caso, se observó un desarrollo rápido de las fermentaciones, lo que indicó una baja capacidad de inhibición del medio sobre *P. tannophilus*. Esto también se pone de manifiesto al analizar los datos de crecimiento de biomasa. Sólo existió fase de adaptación (fase 'lag') en el biorreactor con concentración de inóculo de 0,5 g/L, y éste periodo de adaptación no superó las 10 h. En la Tabla 4.40 se encuentran los datos de concentración de biomasa producida durante las fermentaciones (concentración neta de biomasa). Estos datos ponen de manifiesto como el incremento de carga de inóculo derivó en menores producciones de levadura.

Respecto a la producción de xilitol y etanol, se observó como el primer compuesto fue el principal producto del metabolismo celular (Tabla 4.40). Sin embargo, las diferencias de concentración entre ambos alcoholes se redujeron al incrementarse la concentración de inóculo. Así, por ejemplo, con inóculo de 0,5 g/L las concentraciones fueron de 4,8 g/L (xilitol) y 0,25 g/L (etanol), mientras que con inóculo de 4,0 g/L las concentraciones fueron de 1,9 g/L (xilitol)

y 1,8 g/L (etanol). El rendimiento máximo de xilitol fue de 0,42 g por gramo de D-xilosa consumida, mientras que la máxima productividad volumétrica instantánea (72 h) de xilitol fue de 0,07 g/(L h).

Tabla 4.40 Parámetros máximos de producción de xilitol y etanol a partir del prehidrolizado OPT-PT2. Efecto de la concentración de inóculo.

	Concentración inicial de biomasa, g/L			
	0,5	1,0	2,0	4,0
Concentración neta de biomasa, g/L	4,8 ± 0,2 (120 h) ¹	4,6 ± 0,7 (72 h)	3,2 ± 0,1 (72 h)	1,9 ± 0,2 (72 h)
Concentración de etanol ² , g/L	0,25 ± 0,00	0,41 ± 0,04	0,97 ± 0,10	1,8 ± 0,1
Concentración de xilitol, g/L	4,8 ± 1,9 (72 h)	3,1 ± 0,8 (48 h)	2,4 ± 0,3 (48 h)	1,9 ± 0,2 (48 h)
Rendimiento de xilitol ³ , g/g	0,42 ± 0,08 (72 h)	0,26 ± 0,08 (48 h)	0,18 ± 0,01 (48 h)	0,14 ± 0,02 (48 h)
Productividad volumétrica de xilitol, g/(L h).	0,07 ± 0,03 (72 h)	0,07 ± 0,02 (48 h)	0,05 ± 0,01 (48 h)	0,04 ± 0,00 (48 h)

¹ El tiempo de cultivo se muestra entre paréntesis.

² Calculada a las 10 h.

³ Rendimiento basado en D-xilosa consumida.

4.4.2 Fermentación del prehidrolizado ácido OPT-PT3 (FE2)

En esta serie experimental se partió del prehidrolizado líquido obtenido tras someter huesos de aceituna a hidrólisis (195°C durante 5 minutos) con ácido sulfúrico de concentración 0,025 M. Estas condiciones son las que maximizaron la generación de D-xilosa en la fase líquida de acuerdo al diseño factorial de la serie PT3.

Antes de la fermentación el prehidrolizado fue concentrado y detoxificado en rotavapor para alcanzar la siguiente composición: 20 g/L D-xilosa, 0,88 g/L L-arabinosa, 0,55 g/L D-galactosa, 0,83 g/L D-glucosa y 2,86 g/L de ácido acético. El tratamiento a vacío eliminó el 56% y el 100% del ácido acético y el furfural. La concentración de 5-hidroximetilfurfural fue inferior a 0,5 g/L al comienzo del bioproceso.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 mL de capacidad, a 30°C, pH de 4,5, velocidad de agitación de 150 rpm y cuatro concentraciones de inóculo: 0,5, 1,0, 2,0 y 4,0 g/L.

La evolución de la concentración de biomasa, D-xilosa, L-arabinosa, ácido acético y xilitol a lo largo de los procesos de fermentación se recoge en las Figuras 4.24 a 4.27. Los resultados de producción de etanol para cada concentración inicial de inóculo se han considerado en una grafica separada con objeto de realizar una mejor comparación, Figura 4.28.

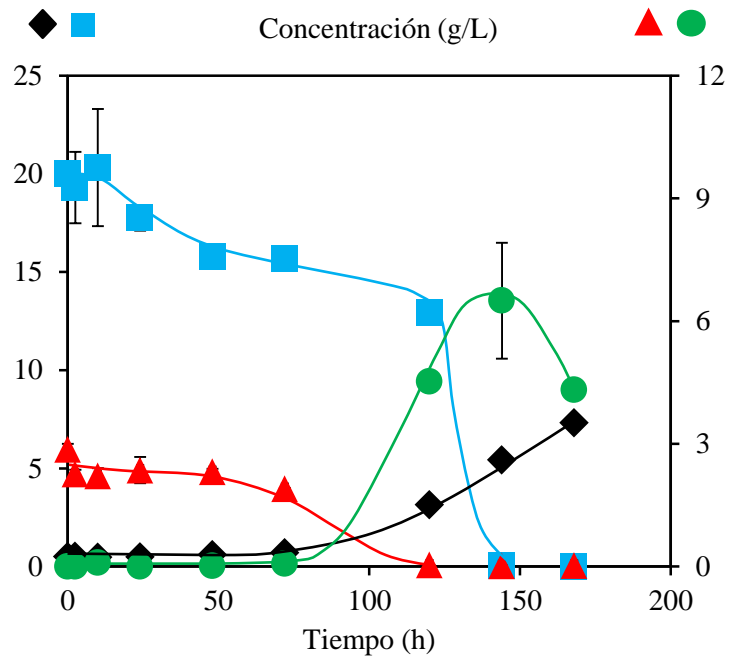


Figura 4.24 Concentración de biomasa (◆), D-xilosa (■), ácido acético (▲) y xilitol (●) en la fermentación FE2 llevada a cabo con concentración de inóculo 0,5 g/L

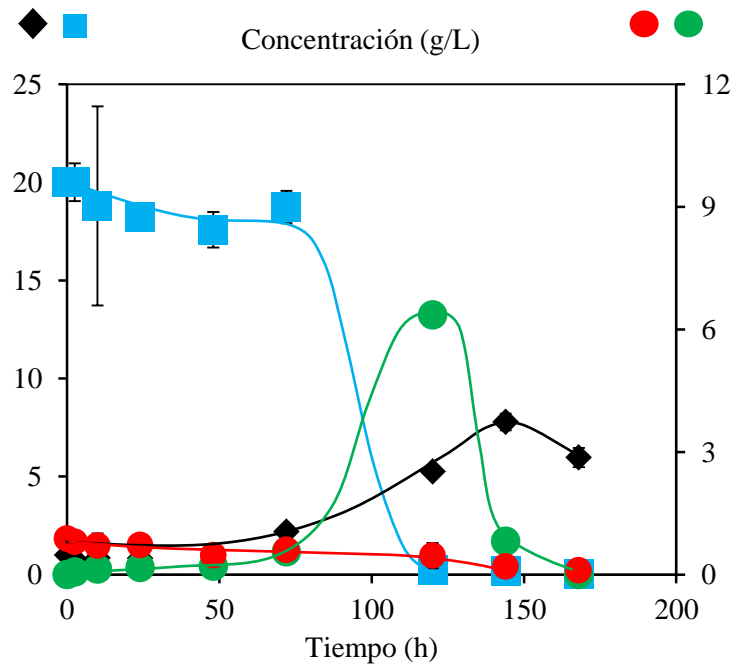


Figura 4.25 Concentración de biomasa (◆), D-xilosa (■), L-arabinosa (●) y xilitol (●) en la fermentación FE2 llevada a cabo con concentración de inóculo 1,0 g/L

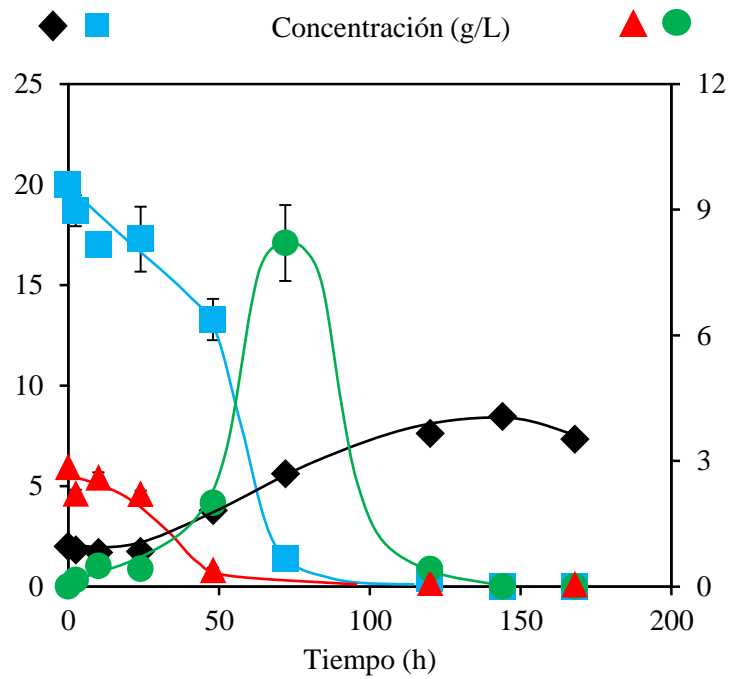


Figura 4.26 Concentración de biomasa (◆), D-xilosa (■), ácido acético (▲) y xilitol (●) en la fermentación FE2 llevada a cabo con concentración de inóculo 2,0 g/L

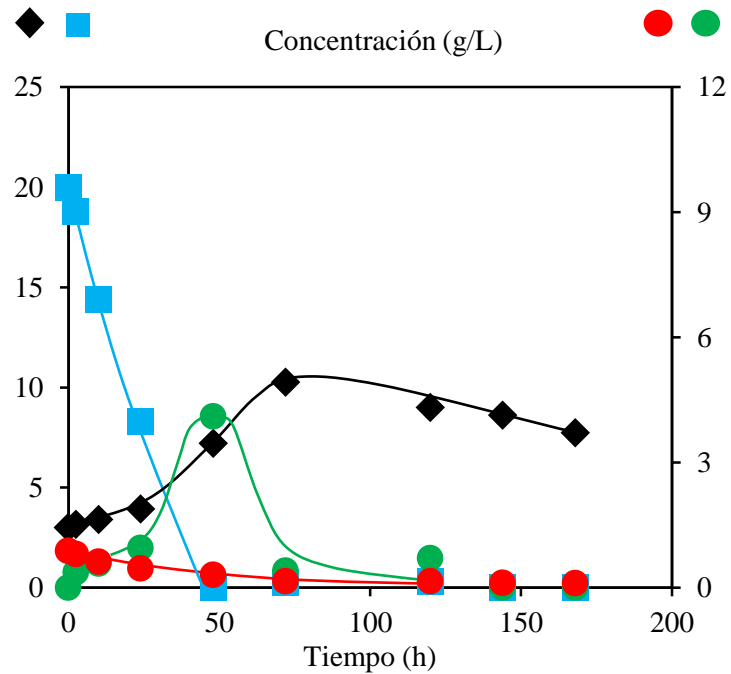


Figura 4.27 Concentración de biomasa (◆), D-xilosa (■), L-arabinosa (●) y xilitol (●) en la fermentación FE2 llevada a cabo con concentración de inóculo 4,0 g/L

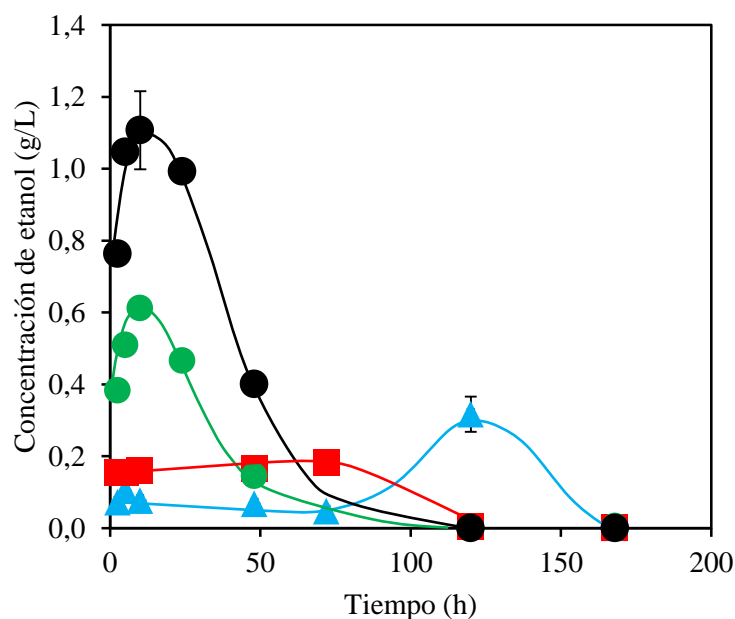


Figura 4.28 Evolución de la concentración de etanol en las fermentaciones de la serie FE2. Influencia de la concentración de inóculo (▲, 0,5 g/L; ■, 1,0 g/L; ●, 2,0 g/L; ●, 4,0 g/L)

Con relación al consumo de sustratos, los resultados de las cuatro fermentaciones llevadas a cabo por duplicado muestran como *P. tannophilus* es capaz de utilizar D-glucosa, D-xilosa y ácido acético como fuente de carbono. Sin embargo, la forma de metabolización de cada especie química fue diferente, lo que se tradujo en distintas velocidades de consumo para D-glucosa, D-xilosa y ácido acético. Se observó una fuerte dependencia entre dichas velocidades y la concentración inicial de biomasa en cada fermentador.

Para concentraciones de inóculo de 0,5, 1,0 y 2,0 g/L se detectaron dos zonas con distintas velocidades de consumo de D-xilosa (Figuras 4.24 a 4.27). En la primera, la asimilación de pentosa fue más lenta que en la segunda. El comienzo de la segunda zona de consumo de D-xilosa (consumo rápido) se situó en las 120 h, 72 h, 24 h y 0 h para los ensayos realizados con concentraciones iniciales de biomasa de 0,5, 1,0, 2,0 y 4,0 g/L, respectivamente, lo que demuestra la importancia del tamaño de inóculo durante las fermentaciones. Estas curvas de consumo de sustrato (monosacáridos) son similares a las descritas de una forma estandarizada por diferentes autores que trabajaron con levaduras en la fermentación de medios sintéticos conteniendo hexosas y pentosas, Aiba et al., (1973), Quintero (1981).

Respecto al ácido acético, en las Figuras 4.24 y 4.26 se incorporan las curvas de consumo de este compuesto. En la primera (0,5 g/L de inóculo) el ácido se eliminó a las 120 h, mientras que en la segunda (2,0 g/L de inóculo) el sustrato prácticamente desapareció a las 48 h de fermentación.

El xilitol fue el principal producto del metabolismo de la levadura, y las cantidades de etanol generadas fueron sensiblemente más bajas (Figura 4.28 y Tabla 4.41). Este comportamiento podría ser explicado asumiendo fuertes limitaciones en el suministro de oxígeno al medio de fermentación, lo que estimula la productividad de xilitol de acuerdo al denominado efecto Custer (Slininger et al., 1987). La máxima concentración de xilitol se consiguió en los momentos posteriores al consumo completo de D-xilosa. Las máximas concentraciones de xilitol detectadas fueron 6,5, 6,4, 8,2 y 4,1 g/L para las fermentaciones llevadas a cabo con inóculos de *P. tannophilus* de 0,5, 1,0, 2,0 y 4,0 g/L, respectivamente. Esta información, junto con el máximo rendimiento y productividad volumétrica de xilitol, se muestran en la Tabla 4.41. El máximo rendimiento de xilitol (0,44 g por g de D-xilosa consumida) se alcanzó con un inóculo de levadura de 2,0 g/L tras 72 h de fermentación. En este ensayo, la productividad volumétrica instantánea de xilitol a 72 h fue de 0,11 g/(L h).

En la Tabla 4.41 también se presentan los datos de concentración de biomasa producida durante los bioprocesos (concentración neta de biomasa). Cabe destacar que a medida que aumenta la concentración de biomasa al comienzo de la fermentación, se detecta un ligero descenso en el parámetro estudiado.

Tabla 4.41 Parámetros máximos de producción de xilitol y etanol a partir del prehidrolizado OPT-PT3. Efecto de la concentración de inóculo.

	Concentración inicial de biomasa, g/L			
	0,5	1,0	2,0	4,0
Concentración neta de biomasa, g/L	6,8 ± 0,1 (168 h) ¹	6,8 ± 0,4 (144 h)	6,5 ± 0,0 (144 h)	6,3 ± 0,0 (72 h)
Concentración de etanol, g/L	0,32 ± 0,05 (120 h)	0,18 ± 0,01 (72 h)	0,61 ± 0,00 (10 h)	1,1 ± 0,1 (5 h)
Concentración de xilitol, g/L	6,5 ± 1,4 (144 h)	6,4 ± 0,1 (120 h)	8,2 ± 0,9 (72 h)	4,1 ± 0,0 (48 h)
Rendimiento de xilitol ² , g/g	0,33 ± 0,07 (144 h)	0,32 ± 0,00 (120 h)	0,44 ± 0,05 (72 h)	0,20 ± 0,00 (48 h)
Productividad volumétrica de xilitol, g/(L h)	0,05 ± 0,01 (144 h)	0,05 ± 0,00 (120 h)	0,11 ± 0,01 (72 h)	0,09 ± 0,01 (48 h)

¹ El tiempo de cultivo se muestra entre paréntesis.

² Rendimiento basado en D-xilosa consumida.

Si se comparan los resultados obtenidos en las series FE1 y FE2 se observa, con claridad, como el primer hidrolizado presentó una menor capacidad de inhibición sobre *P. tannophilus*. Esto pudo deberse a su menor contenido inicial de ácido acético (2,23, frente a 2,86 g/L del hidrolizado empleado en FE2), o como consecuencia de la existencia de menores cantidades de otros inhibidores no analizados. En este sentido, es interesante recordar que el primer hidrolizado se obtuvo con ácido sulfúrico de concentración 0,010 M operando a 201°C durante 5,2 minutos, mientras que el segundo derivó de un tratamiento que empleó ácido sulfúrico de mayor concentración (0,025 M) pero que se desarrolló a menor temperatura (195°C durante 5 minutos).

Las fermentaciones de la serie FE1 se desarrollaron, en general, con menores producciones netas de biomasa y mayores concentraciones máximas de etanol respecto a los ensayos FE2 (Tablas 4.40 y 4.41). Respecto al xilitol, ambos hidrolizados consiguieron rendimientos máximos muy parecidos (0,42 y 0,44 g/g D-xilosa) a las 72 h de fermentación, aunque para FE1 se necesitó una concentración de inóculo (0,5 g/L) inferior a la requerida en la FE2 (2,0 g/L). Los rendimientos máximos de xilitol en el presente trabajo fueron similares a los conseguidos por García et al. (2011) al fermentar hidrolizados ácidos de poda de olivo con la levadura *Candida tropicalis*. Por otro lado, Virgilio da Silva et al. (2007) obtuvieron un rendimiento de xilitol de 0,45 g/g durante el cultivo, con *Candida guilliermondii*, de hidrolizados ácidos generados con bagazo de caña de azúcar.

4.4.3 Fermentación de hidrolizados enzimáticos (FE3)

En los apartados 4.4.1 y 4.4.2 se fermentaron los hidrolizados ácidos obtenidos en los pretratamientos OPT-PT2 y OPT-PT3; es decir, bajo unas condiciones de hidrólisis ácida que maximizan la producción de D-xilosa en la fase líquida. En estos pretratamientos se obtuvieron residuos sólidos que podría ser fuente de D-glucosa por hidrólisis enzimática de la fracción de celulosa que queda en dichos residuos.

En esta serie experimental se fermentan líquidos obtenidos de la hidrólisis enzimática de los residuos sólidos conseguidos durante los pretratamientos OPT-PT2 y OPT-PT3. Las hidrólisis se llevaron a cabo en las siguientes condiciones:

Parámetro	Valor
Temperatura, °C	50
pH	4,8
Velocidad de agitación, rpm	150
Carga de 'Celluclast 1.5', UPF/g sólido	40
Volumen de 'Novozyme188'	0,5 veces el volumen de 'Celluclast 1.5'

Los hidrolizados enzimáticos no sufrieron etapa de detoxificación debido a la nula presencia de inhibidores generados a alta temperatura, como el furfural y el 5-HMF.

Las fermentaciones se desarrollaron con la levadura *Pachysolen tannophilus* a 30°C, pH 4,5 y 150 rpm. Se ensayaron, para cada uno de los medios de cultivo, cuatro concentraciones iniciales de biomasa: 0,5, 1,0, 2,0 y 4,0 g/L.

Los dos medios de fermentación utilizados en esta serie presentaron una concentración inicial de D-glucosa de 20,6 g/L (Figura 4.29) y 23,2 g/L (Figura 4.30). La no presencia de inhibidores fermentativos hizo que el consumo de hexosa fuera muy rápido para los dos hidrolizados, completándose la asimilación de D-glucosa, en todos los casos, en menos de 24 h. No obstante, se observó cómo el incremento del tamaño de inóculo aceleró este consumo. Así, por ejemplo, para el hidrolizado enzimático derivado de OPT-PT2, a las 7,5 h de bioproceso la concentración de D-glucosa en los matraces Erlenmeyer con inóculos de *P. tannophilus* de 0,5, 1,0 y 4,0 g/L fue de 12,6, 6,4 y 2,6 g/L, respectivamente. Para el hidrolizado enzimático derivado de OPT-PT3 se observó el mismo comportamiento; por ejemplo, a las 5 h la concentración de D-glucosa en los matraces Erlenmeyer con inóculos de 1,0, 2,0 y 4,0 g/L fue de 14,8, 9,7 y 4,4 g/L, respectivamente.

La máxima concentración de etanol en las fermentaciones del hidrolizado OPT-PT2 se alcanzó a las 24 h, para los ensayos llevados a cabo con 0,5 y 1,0 g/L de inóculo, y a las 10 h para el resto de condiciones. Las concentraciones de etanol más altas detectadas pueden observarse en la Figura 4.29, siendo de 9,6, 10,1, 10,8 y 9,7 g/L para las gráficas A, B, C y D, respectivamente. El rendimiento de etanol pudo ser calculado refiriendo en peso de alcohol producido al peso de D-glucosa consumida. De esta forma, se determinaron valores de 46,4, 49,1, 52,3 y 47,2%. Para el hidrolizado enzimático OPT-PT3 también se consiguieron las máximas concentraciones de etanol entre las 10 y 24 h; concretamente, y de acuerdo con la Figura 4.30, los valores máximos fueron de 12,3 g/L (gráfica A), 12,2 g/L (gráfica B), 12,3 g/L

(gráfica C) y 12,4 g/L (gráfica D). En este caso, los rendimientos de etanol fueron del 52,9, 52,5, 52,9 y 53,4% para los ensayos llevados a cabo con inóculos de 0,5, 1,0, 2,0 y 4,0 g/L, respectivamente.

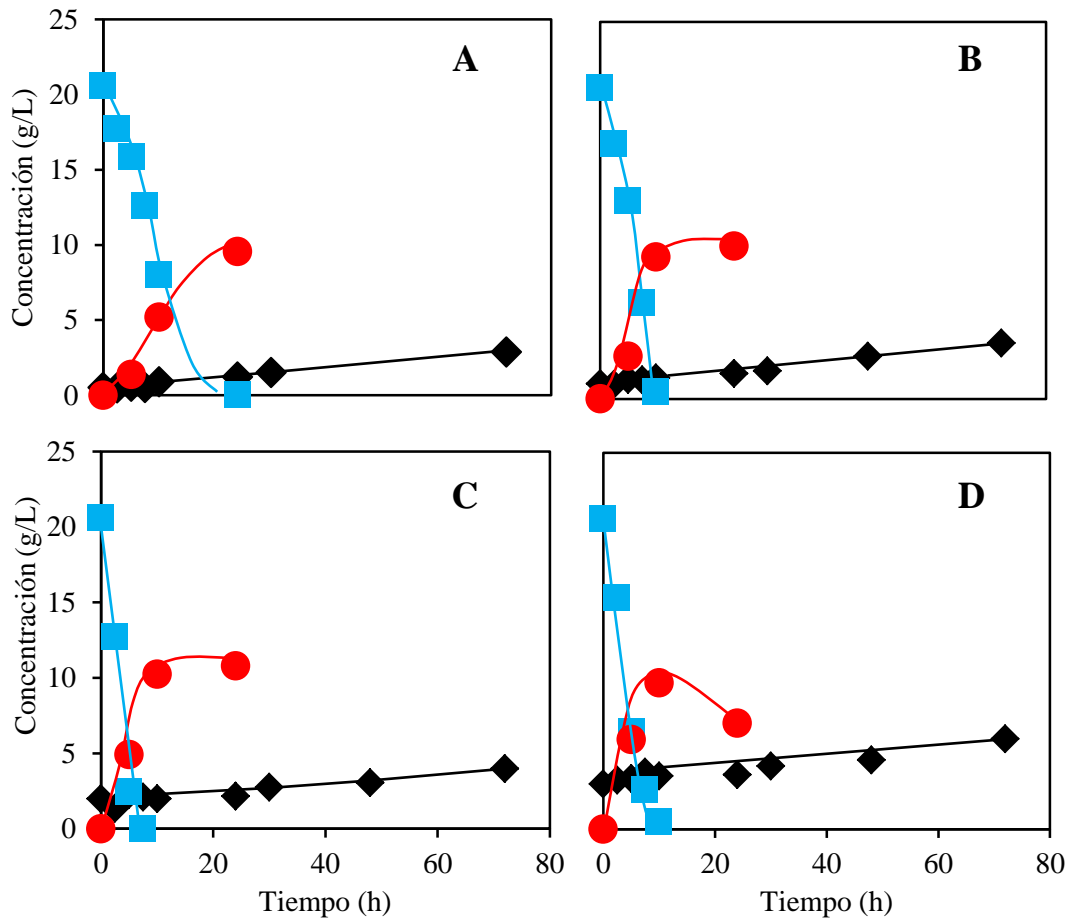


Figura 4.29 Concentración de biomasa (◆), D-glucosa (■) y etanol (●) en las fermentaciones de la serie FE3₁. Concentración de inóculo: 0,5 g/L (A), 1,0 g/L (B), 2,0 g/L (C) y 4,0 g/L (D)

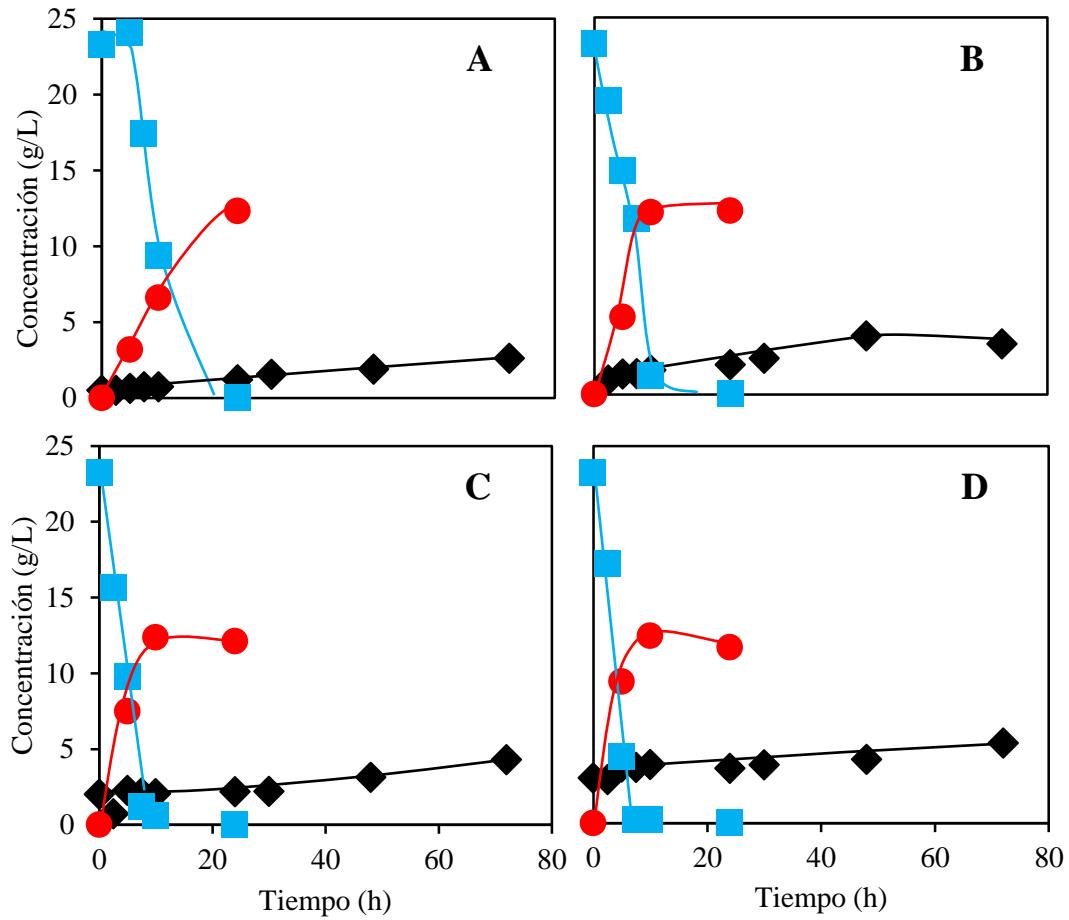


Figura 4.30 Concentración de biomasa (◆), D-glucosa (■) y etanol (●) en las fermentaciones de la serie FE3₂. Concentración de inóculo: 0,5 g/L (A), 1,0 g/L (B), 2,0 g/L (C) y 4,0 g/L (D)

4.5 Proceso completo de transformación. Balances de materia

Considerando los objetivos planteados al comienzo de la Tesis Doctoral, y analizando el proceso completo de tratamiento de la biomasa (pretratamiento ácido a presión, hidrólisis enzimática y fermentación) mediante balances de materia, se deduce que en las condiciones más favorables el empleo de ácido sulfúrico 0,010 y 0,025 M lleva a producciones similares de etanol y xilitol (Figuras 4.31 y 4.32). En todo caso, el uso de ácido con concentración más alta conduce a rendimientos globales de bioproductos ligeramente superiores, $Y_{E/S} = 10,3$ g etanol /100 g hueso y $Y_{XIL/S} = 9,2$ g xilitol /100 g hueso.

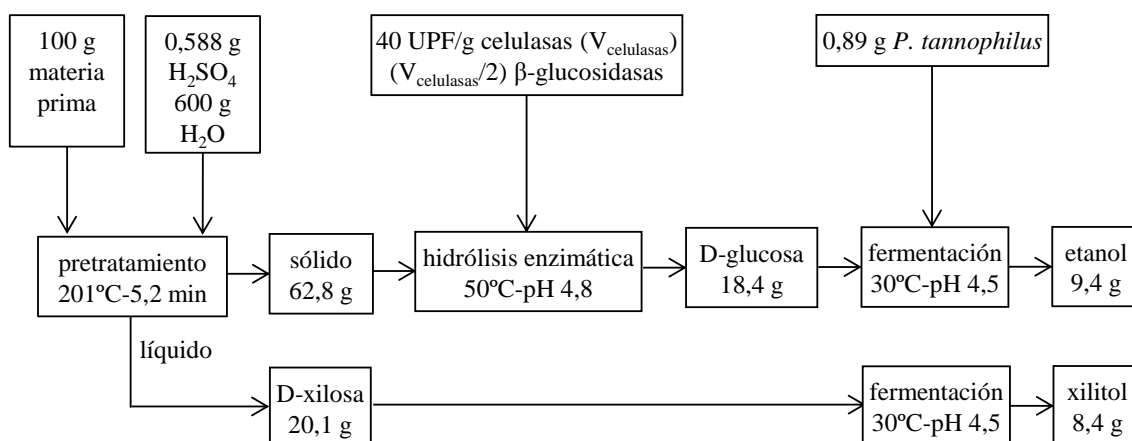


Figura 4.31 Balances macroscópicos de materia cuando se parte de un pretratamiento con H_2SO_4 0,010 M

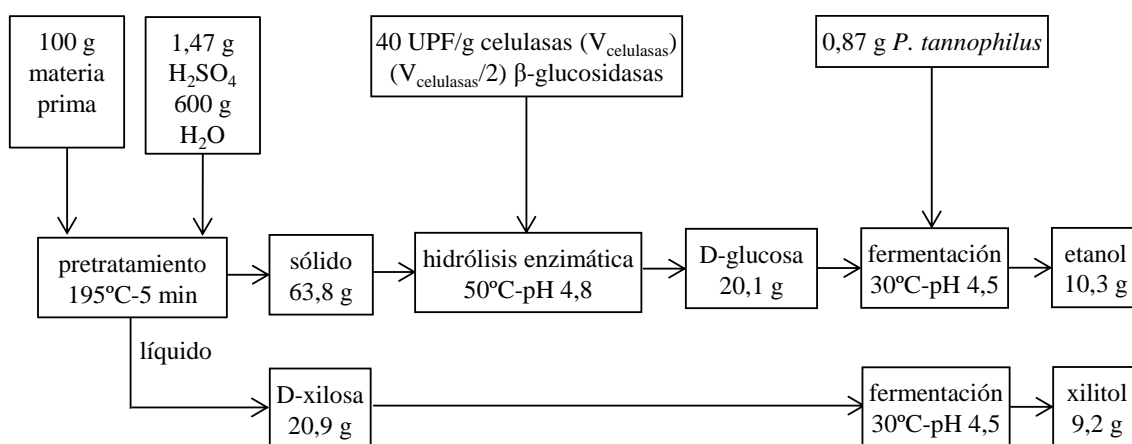


Figura 4.32 Balances macroscópicos de materia cuando se parte de un pretratamiento con H_2SO_4 0,025 M

5. CONCLUSIONES

Tesis de doctorado
*Tratamientos a presión e hidrólisis del hueso de aceituna.
Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen tannophilus**

A partir de la discusión de los resultados experimentales reflejados en esta Memoria, se han podido deducir las siguientes conclusiones:

1. El pretratamiento de huesos de aceituna a alta temperatura, usando agua, o ácidos sulfúrico (0,025 M) y nítrico (0,025 M), logró la eliminación completa de su fracción de hemicelulosas. Para este fin, y con tiempos de residencia a la máxima temperatura de 0 minutos, se necesitaron temperaturas iguales o superiores a 220°C, 205°C y 200°C al operar con agua, ácido sulfúrico y ácido nítrico, respectivamente. Con cualquiera de los tres medios hidrolíticos anteriores, la fracción celulósica del endocarpio de aceituna sufrió la mayor alteración a las temperaturas más altas ensayadas. En el caso del agua ultrapura, la conversión fraccional de celulosa fue reducida, 17,4% a 220°C. Sin embargo, el empleo de ácidos inorgánicos diluidos aceleró la despolimerización del polisacárido a la misma temperatura, hasta el 35,8% con ácido sulfúrico y 68,5% con ácido nítrico. En relación a la lignina, tanto el agua como los dos ácidos estudiados condujeron a una conversión fraccional cercana al 25% para temperaturas en el intervalo 200–220°C, excepto cuando se empleó ácido nítrico a 220°C; en ese caso, se logró una conversión de lignina próxima al 50%.
2. Al comparar las composiciones de los prehidrolizados obtenidos pretratando huesos de aceituna a temperaturas entre 200 y 220°C con agua y ácidos sulfúrico y nítrico (ambos 0,025 M), se comprobó como el primer medio condujo a bajos rendimientos en monosacáridos, mientras el ácido sulfúrico maximizó la recuperación de D-xilosa (18,1% a 210°C) y el ácido nítrico llevó a los mayores rendimientos en D-glucosa (8,6% a 220°C). Temperaturas superiores a 210°C, en experimentos realizados con ácidos sulfúrico y nítrico, produjeron destrucciones térmicas severas de monosacáridos hemicelulósicos y, paralelamente, incrementos de inhibidores fermentativos como el 5-hidroximetilfurfural. Atendiendo al rendimiento conjunto de D-glucosa y D-xilosa, cabría destacar tres condiciones operativas que lo maximizan: dos que emplean ácido sulfúrico (205°C, con rendimiento del 16,2%; 210°C, con rendimiento del 20,0%) y una con ácido nítrico (205°C, con rendimiento del 14,2%). En los tres casos anteriores, los rendimientos en 5-hidroximetilfurfural fueron menores del 1% (0,53, 0,79 y 0,95%, respectivamente), un buen dato si se quiere desarrollar un posterior proceso de fermentación. Por tanto, el medio con ácido sulfúrico es el que presenta mayor potencial para generar prehidrolizados ricos en D-xilosa y con bajas concentraciones de inhibidores fermentativos.

3. La aplicación de diseños factoriales ha mostrado ser una interesante herramienta para el estudio de las condiciones operativas durante la hidrólisis del hueso de aceituna con ácido sulfúrico diluido. Para una concentración fija de ácido, existen unas condiciones específicas de temperatura y tiempo de reacción que maximizan la producción de azúcares fermentables y la conversión de fibras. En este sentido, la temperatura es el factor más determinante en la despolimerización de hemicelulosa y celulosa, y en la generación de D-xilosa y otros azúcares simples.

3.1 Empleando H_2SO_4 de concentración 0,010 M en una suspensión de huesos de aceituna con relación Sólido/Líquido de 1/6 (p/v), se logró hidrolizar la fracción de hemicelulosas trabajando a 200°C durante 5 minutos. Tratamientos de mayor severidad condujeron a valores nulos de hemicelulosa en el residuo, a fuertes descensos en los porcentajes de celulosa pretratada (*CEL*) y a aumentos del contenido en lignina ácido insoluble (*LAI*). Los valores de *CEL* y *LAI* en los sólidos pretratados se ha ajustado a las ecuaciones polinomiales,

$$CEL (\%) = -225,93 + 2,70 T + 0,77 t - 0,007 T^2$$

$$LAI (\%) = -17,42 + 0,29 T$$

donde *T* y *t* representan la temperatura máxima de hidrólisis (°C) y el tiempo de residencia, en minutos, a dicha temperatura. Se observó como el contenido de lignina ácido insoluble del residuo dependió linealmente de la temperatura.

En el caso del prehidrolizado líquido, el rendimiento de D-xilosa (Y_{XIL}) pudo ser descrito, en función de *T* y *t* (valores reales), mediante la expresión,

$$Y_{XIL} (\%) = -993,94 + 9,79 T + 11,60 t - 0,024 T^2 - 0,50 t^2 - 0,032 T t$$

a partir de la cual pudieron determinarse las condiciones que maximizan la producción de esta pentosa (201°C mantenidos durante 5,2 minutos). Hay que destacar la considerable presencia de ácido acético en los prehidrolizados obtenidos a altas temperaturas (5,8% a 220°C y 8 min). El rendimiento de este compuesto se ajustó adecuadamente mediante la ecuación,

$$Y_{ACE} (\%) = -9,78 + 0,064 T + 0,14 t$$

3.2 Usando H_2SO_4 de concentración 0,025 M en una suspensión de huesos de aceituna con relación Sólido/Líquido de 1/6 (p/v), se lograron resultados similares al caso anterior (H_2SO_4 0,010 M) aunque se puso de manifiesto como

la mayor concentración de protones en el medio aceleró la hidrólisis de la hemicelulosa y la celulosa y, por tanto, permitió recuperar mayores cantidades de monosacáridos a menores temperaturas y tiempos de reacción. Con H_2SO_4 0,025 M la hemicelulosa prácticamente se eliminó del sólido en pretratamientos efectuados a 200°C durante 0,76 minutos. Los valores de *CEL* y *LAI* en los sólidos pretratados se ajustaron a las ecuaciones polinomiales,

$$CEL (\%) = -875,87 + 9,37 T + 10,44 t - 0,024 T^2 - 0,049 T t$$

$$LAI (\%) = 266,93 - 2,73 T + 0,008 T^2$$

Al igual que en los ensayos con concentración de ácido igual a 0,010 M, aquí se observó como el contenido de lignina ácido insoluble sólo dependió de la temperatura.

En el caso del prehidrolizado líquido, el rendimiento de D-xilosa (Y_{XIL}) pudo ser descrito, en función de T y t (valores reales), mediante la expresión,

$$Y_{\text{XIL}} (\%) = -726,25 + 7,34 T + 12,37 t - 0,018 T^2 - 0,34 t^2 - 0,47 \cdot T t$$

a partir de la cual pudieron determinarse las condiciones que maximizan la producción de esta pentosa (195°C durante 5 minutos). El rendimiento de ácido acético en el prehidrolizado pudo ser ajustado mediante la ecuación,

$$Y_{\text{ACE}} (\%) = -13,62 + 0,079 T + 0,19 t$$

que describe un comportamiento muy parecido al observado empleando H_2SO_4 de concentración 0,010 M.

- 3.3 Es posible obtener altas recuperaciones de D-xilosa, y de otros azúcares hemicelulósicos, por hidrólisis ácida del hueso de aceituna al operar con ácido sulfúrico de concentraciones 0,010 y 0,025 M, y relaciones Sólido/Líquido de 1/6 (p/v). Con el ácido más diluido, el porcentaje de extracción de D-xilosa fue 85,9%, mientras que con el más concentrado, la extracción alcanzó el 89,3%. En ambos casos, el rendimiento máximo de monosacáridos superó el 21%. Sin embargo, el incremento de concentración (desde 0,010 hasta 0,025 M) trajo consigo una reducción de 6°C en la temperatura óptima de operación (de 201°C a 195°C), lo que puede ser ventajoso desde el punto de vista energético. Por otra parte, en la fracción sólida resultante de los anteriores pretratamientos quedaría preservada la mayor parte de la celulosa del hueso (82,7% si se emplea H_2SO_4 de concentración 0,010 M), por lo que dicho material podría ser sometido a posteriores ensayos de hidrólisis enzimática con el fin de generar D-glucosa.

- 3.4 Al ser el hueso fragmentado de aceituna un material relativamente pequeño y duro, es posible incrementar la relación Sólido/Líquido (p/v) hasta valores de 1/2 en los pretratamientos con ácido sulfúrico diluido sin que se produzcan problemas significativos de agitación, ni limitaciones en el ataque del sólido por parte del líquido. Sin embargo, para mantener la capacidad hidrolítica ante un incremento de la carga de sólido, se deberá producir un aumento paralelo en el peso de ácido sulfúrico añadido al reactor, de forma que su porcentaje (referido a peso seco de hueso) se mantenga en el 0,59%. En estas condiciones, se han generado hidrolizados con concentraciones de D-xilosa próximas a 100 g/L (95,5 g/L al pretratar 150 g de hueso con 300 mL de disolución de ácido sulfúrico 0,030 M). El problema de estos hidrolizados es la alta concentración de ácido acético, próxima a 30 g/L, y que obligaría a diseñar un protocolo de detoxificación si se quiere proceder a la fermentación de los medios azucarados.
4. Si se desea usar una etapa de hidrólisis enzimática sobre los sólidos resultantes del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido con el fin de producir D-glucosa, debe evitarse la esterilización en autoclave de los sustratos, ya que este tratamiento térmico (121°C-20 min) reduce drásticamente el rendimiento del bioproceso. Así, al hidrolizar enzimáticamente (celulasa 'Celluclast 1.5' con carga de 20 UPF/g sólido) los residuos resultantes de los pretratamientos que optimizan la producción de D-xilosa con H₂SO₄ 0,010 y 0,025 M, se comprobó que la esterilización el sustrato reduce el rendimiento en D-glucosa desde el 13,8% hasta el 2,4%, y desde el 17,6% al 3,4%, respectivamente.
5. La hidrólisis enzimática de los sólidos pretratados con ácido sulfúrico diluido está fuertemente condicionada por la carga de celulasa 'Celluclast 1.5' empleada. Así, al hidrolizar enzimáticamente los sólidos resultantes de los pretratamientos que optimizan la producción de D-xilosa, con H₂SO₄ 0,010 y 0,025 M, se comprobó que un incremento de la dosis de enzima, desde 0 hasta 60 UPF/g sólido, provoca un aumento del rendimiento de D-glucosa desde el 2% hasta el 37%, y desde el 3% al 37%, respectivamente. Por otro lado, no se observaron grandes diferencias en el rendimiento en D-glucosa cuando las hidrólisis enzimáticas se llevaron a cabo con cargas de celulasas de 40 y 60 UPF/g sólido. Por esta razón, y con el fin de disminuir los costes del bioproceso, se propone utilizar una carga de 40 UPF/g sólido.

Otro factor que afecta al desarrollo de la hidrólisis enzimática es la presencia de prehidrolizado junto a los sólidos pretratados. Se ha observado como los procesos que usan como único sustrato el sólido pretratado, limpio y seco, son más favorables que aquellos que operan con el conjunto “sólido pretratado-prehidrolizado”.

6. La temperatura máxima a la que se lleva a cabo el pretratamiento del hueso de aceituna, con ácido sulfúrico diluido, y el tamaño de partícula, afectan significativamente al rendimiento de D-glucosa durante la hidrólisis enzimática de los sólidos pretratados.

6.1 En relación al efecto de la temperatura máxima de pretratamiento (en el rango 190-215°C) sobre la etapa de hidrólisis enzimática, los máximos rendimientos de D-glucosa se consiguieron tras hidrólisis ácidas a presión llevadas a cabo a temperaturas iguales o superiores a 210°C. Así, para huesos de tamaño por encima de 1,6 mm, el rendimiento enzimático fue de 13,6, 17,2, 23,6 y 23,0% utilizando pretratamientos a 190, 200, 210 y 215°C, respectivamente. Si el hueso no se pretrata, el rendimiento máximo de D-glucosa por acción enzimática desciende hasta el 6,2%.

Considerando el rendimiento global de azúcares fermentables obtenibles en las etapas de hidrólisis ácida (pretratamiento) e hidrólisis enzimática, este parámetro se maximiza para pretratamientos efectuados a 205°C, ya que temperaturas superiores, aunque mejoran la hidrólisis enzimática, degradan gran parte de los monosacáridos del prehidrolizado. Para endocarpios con diámetro superior a 1,6 mm el rendimiento global máximo de monosacáridos fue del 29,7%.

6.2 En general, la disminución del tamaño de partícula favoreció la hidrólisis enzimática de los sólidos pretratados. Se observó un fuerte incremento del rendimiento en D-glucosa cuando los sólidos de diámetro superior a 1,6 mm fueron molturados hasta tamaños en el intervalo 0,60-0,425 mm. Sin embargo, no se observaron grandes diferencias de resultados para tamaños comprendidos entre 0,30-0,125 y 0,60-0,425 mm. La concentración máxima de D-glucosa fue prácticamente idéntica cuando se hidrolizaron enzimáticamente sólidos de diámetro por debajo de 0,6 mm (44,3, 42,8 y 44,2 g/L para sólidos pretratados a

215°C y con tamaño 0,60-0,425 mm, 0,30-0,125 mm y <0,125 mm, respectivamente).

7. La fermentación, con *P. tannophilus*, de los prehidrolizados ácidos que maximizan la producción de D-xilosa operando con concentraciones de ácido sulfúrico 0,010 y 0,025 M, se ha llevado a cabo de forma satisfactoria. Esto se puede justificar por la alta concentración inicial de D-xilosa y las bajas concentraciones de inhibidores fermentativos, todo ello como consecuencia de una etapa previa de detoxificación mediante concentración del prehidrolizado ácido en rotavapor a vacío. Este tratamiento, extendido durante 80 minutos a 35°C, permite reducir a la mitad la cantidad de ácido acético en la fase líquida, así como eliminar el furfural y el 5-hidroximetilfurfural.

7.1 La duración del proceso de fermentación estuvo fuertemente condicionada por la concentración de inóculo de *P. tannophilus*. Así, D-xilosa prácticamente se consumió tras 144 h (inóculo de 0,5 g/L), 120 h (1,0 g/L) y 48 h (2,0 y 4,0 g/L) si el prehidrolizado derivó de una hidrólisis con H₂SO₄ 0,010 M, o tras 144 h (inóculo de 0,5 g/L), 120 h (1,0 g/L), 72 h (2,0 g/L) y 48 h (4,0 g/L) si el cultivo derivó de una hidrólisis con H₂SO₄ 0,025 M. También se ha comprobado el consumo de ácido acético por la levadura. Esta metabolización se ha llevado a cabo de forma simultánea con de D-xilosa. El uso de ácido sulfúrico más concentrado, durante el pretratamiento, llevó a bioprocesos algo más lentos, debido a la mayor presencia de compuestos inhibidores.

7.2 La producción máxima de biomasa durante las fermentaciones descendió a medida que aumentaba la concentración inicial de *P. tannophilus*. Los valores oscilaron entre 1,9 y 4,8 g/L (para cultivos derivados del pretratamiento con H₂SO₄ 0,010 M) y entre 6,3 y 6,8 g/L (cultivos obtenidos del pretratamiento con H₂SO₄ 0,025 M).

7.3 En todas las fermentaciones se han observado producciones máximas de etanol inferiores a las de xilitol, como consecuencia de la muy baja relación D-glucosa/D-xilosa existente al inicio de los cultivos. Además, el tamaño de inóculo afectó a la concentración máxima de etanol sintetizado, de manera que aumentos del primer parámetro (desde 0,5 g/L hasta 4,0 g/L) originaron incrementos en el segundo (desde 0,25 hasta 1,8 g/L, para pretratamientos con

H₂SO₄ 0,010 M, y desde 0,32 a 1,1 g/L, para pretratamientos con H₂SO₄ 0,025 M).

El xilitol es el producto principal de las fermentaciones. Su concentración máxima osciló entre 4,8 y 1,9 g/L, tras pretratamientos con H₂SO₄ 0,010 M, y entre 8,2 y 4,1 g/L, tras pretratamientos con H₂SO₄ 0,025 M. Lo anterior se traduce en un rendimiento instantáneo máximo de 0,42 g xilitol por gramo de D-xilosa (para el primer cultivo con inóculo de 0,5 g/L) y de 0,44 g xilitol por gramo de D-xilosa (para el segundo cultivo con inóculo de 2,0 g/L).

8. La fermentación, con *P. tannophilus*, de los líquidos generados por hidrólisis enzimática de los sólidos pretratados con ácido sulfúrico (0,010 M o 0,025 M) en las condiciones de pretratamiento para las que se maximizan las producciones de D-xilosa, ha sido muy favorable. Esto se debe a la presencia de D-glucosa como sustrato de fermentación, lo que hace que el bioproceso se complete en menos de 24 h, para inóculos de levadura de 0,5 g/L, y para tiempos iguales o inferiores a 10 h con inóculos entre 1,0 y 4,0 g/L. Las concentraciones máximas de etanol, para fermentaciones efectuadas con distintas concentraciones de inóculo, oscilaron entre 9,7 y 10,8 g/L, cuando la concentración inicial de D-glucosa fue de 20,6 g/L, y entre 12,2 y 12,4 g/L, para concentraciones iniciales de hexosa de 23,2 g/L. Lo anterior lleva a rendimientos instantáneos en etanol muy elevado, próximos al rendimiento teórico de Gay-Lussac (0,51 g etanol/g D-glucosa).

9. Considerando los objetivos planteados al inicio de la Tesis Doctoral, y analizando el proceso completo de tratamiento de la biomasa (pretratamiento ácido a presión, hidrólisis enzimática y fermentación), se deduce que, en las condiciones de operación más favorables, a partir de los balances macroscópicos de materia, el empleo de ácido sulfúrico 0,010 y 0,025 M lleva a producciones similares de etanol y xilitol. En todo caso, el uso de ácido con concentración más alta conduce a rendimientos globales de bioproductos ligeramente superiores, $Y_{E/S} = 10,3$ g etanol /100 g hueso y $Y_{XIL/S} = 9,2$ g xilitol/100 g hueso.

6. NOMENCLATURA

Tesis de doctorado
*Tratamientos a presión e hidrólisis del hueso de aceituna.
Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen tannophilus**

AAE	Agencia Andaluza de la Energía
Ac	Concentración de ácido acético, kg m ⁻³
ACE	Ácido acético
ACS	Acetil-CoA sintetasa
ADH	Alcohol deshidrogenasa
4-AF	Enzima 4-aminofenazona
AI-DH	Enzima aldehído deshidrogenasa
AMP	Adenosín monofosfato
ARA	L-arabinosa
ART	Azúcares reductores totales
ATCC	Colección de cultivos `American Type Culture Collection´
ATP	Adenosín 5-trifosfato
BP	British Petroleum
C	Concentración, kg m ⁻³ o mg dm ⁻³
CBS	Banco de células `Centraalbureau voor Schimmelcultures´ (Holanda)
CEL	Celulosa, %
CoA	Coenzima A
CS	Citrato cintasa
DE	Diseño experimental
DNS	Reactivo dinitrosalicílico
DSM	Banco de células `German Collection of Microorganisms and Cell Cultures´ (Alemania)
E	Concentración de etanol, kg m ⁻³
EC	Número de identificación enzimática
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Efecto estimado
ES	Errores estándar
E/S	Relación `Enzima /Sustrato´
FE	Fermentación
g	Concentración de D-glucosa, kg m ⁻³
gf	Concentración de D-glucosa al final de las hidrólisis enzimáticas, kg m ⁻³
GOD	Enzima glucosa-oxidasa
HE	hidrólisis enzimática
HEM	Hemicelulosa, %

5-HMF	5-Hidroximetilfurfural
HPLIC	Cromatografía iónica acoplada a detector de pulsos amperométricos
INT	Cloruro de iodotetrazolio
L-MDH	L-malato deshidrogenasa
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NRRL	Banco de células `Agricultural Research Service Culture Collection´ (EE.UU.)
OLI	Oligosacáridos
OPT-PT	Optimo del pretratamiento
<i>p</i>	Nivel de significación
PA	Pureza para análisis químico
P/V	Relación entre el peso de hueso seco (g) y el volumen del líquido (cm ³) en el tratamiento
PNB	Producto Nacional Bruto
POD	Enzima peroxidasa
PRS	Pureza para análisis químico
PT	Pretratamientos
PVP	Polivinilpirrolidona
QP	Químicamente puro
<i>R</i> ₀	Factor de severidad del tratamiento hidrotérmico
RPE	Reactivos de grado analítico
RS	Recuperación de sólido
<i>s</i>	Concentración de azúcares reductores totales, kg m ⁻³
SCP	Proteína de origen unicelular
S/L	Relación entre el peso de hueso seco (g) y el volumen del líquido (cm ³)
SDH	Enzima sorbitol deshidrogenasa
SE	Serie experimental
SOL	% Porcentaje de sólido disgregado en el tratamiento hidrotérmico
SSF	Sacarificación y fermentación simultaneas
T	Temperatura, °C
<i>t</i>	Tiempo, minutos o hora
TAPPI	`Technical Association of the Pulp and Paper Industry´
tep	Tonelada equivalente de petróleo

TRIS	Tri-hidroximetil-aminometano
UPF	Unidad de Papel de Filtro
x	Concentración de biomasa, kg m ⁻³
X _{CEL}	Conversión fraccional de celulosa, %
X _{HEM}	Conversión fraccional de hemicelulosa, %
X _i	Concentración de xilitol, kg m ⁻³
X _{LAI}	Conversión fraccional de lignina ácido insoluble, %
Y _{GLU}	Rendimiento en D-glucosa, %
Y _{XIL}	Rendimiento en D-xilosa, %
Y _{E/S}	Rendimiento de etanol /100 g hueso
Y _{HE}	Rendimiento de hidrólisis enzimática, %
Y _{XIL/S}	Rendimiento de xilitol /100 g hueso
%Cenizas	Materia mineral, %
%FAD	Fibra Ácido Detergente, %
%FND	Fibra neutro detergente, %
%HMV	Humedad y materia volátil, %
%LIG	Lignina, %

7. BIBLIOGRAFÍA

Tesis de doctorado
*Tratamientos a presión e hidrólisis del hueso de aceituna.
Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen tannophilus**

- Abdi N., Hamdache F., Belhocine D., Grib H., Lounici H., Piron D.L., Mameri N. “Enzymatic saccharification of solid residue of olive mill in a batch reactor”. *Biochem. Eng. J.* 6, 177-183 (2000).
- Ahamed A., Vermette P. “Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions”. *Biochem. Eng. J.* 40, 399-407 (2008).
- Aiba S., Humphrey A.F., Millis N.F. “Kinetics”. En: *Biochem. Eng.* 2ª Ed., pp. 92-127, Academic Press, Nueva York (1973).
- Allen S.G., Schulman D., Lichwa J., Antal M.J., Jennings E., Elander R. “A comparison of aqueous and dilute-acid single-temperature pretreatment of yellow poplar sawdust”. *Ind. Eng. Chem. Res.* 40, 2352-2361 (2001).
- Aragon C., Santos A.F., Ruiz-Matute A.I., Corzo N., Guisan J.M., Monti R., Mateo C. “Continuous production of xylooligosaccharides in a packed bed reactor with immobilized-stabilized biocatalysts of xylanase from *Aspergillus versicolor*”. *J. Journal Catalysis B: Enzymatic.* 98, 8-14 (2013).
- Ballesteros I., Oliva J.M., Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros M. “Enzymatic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes”. *Process Biochem.* 38, 187-192 (2002).
- Ballesteros I., Oliva J.M., Saez F., Ballesteros M. “Ethanol production from lignocellulosic byproducts of olive oil extraction”. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91-93, 237-252 (2001).
- Ben Dris, S. Aprovechamiento del hueso de aceituna. Biosorción de iones metálicos. Tesis doctoral. Universidad de Granada, 2010.
- Bergmeyer H., Möllering H. “Acetic acid”. En: “Methods of enzymatic analysis” (2ª Ed.), Bergmeyer, H.U. (Ed.), Vol. 3, Academic Press, Nueva York 1520-1528 (1974).
- Berlin A., Balakshin M., Gilkes N., Kadla J., Maximenko V., Kubo S., Saddler J. “Inhibition of cellulose, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations”. *J. Biotechnol.* 125, 198-209 (2006).

- Berlin A., Gilkes N., Kurabi A., Bura R., Tu M.B., Kilburn D. “Weak lignin-binding enzymes - A novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics”. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121, 163-170 (2005).
- Beutler H.O. “Ethanol”. En: “Methods of enzymatic analysis”, Bergmeyer, H.U. (Ed.), Vol. 6, pp. 598-606 (1984).
- Beutler H.O., Becker J. “Enzymatische Bestimmung von D-Sorbit und Xylit in Lebensmitteln”. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 6, 182-187 (1977).
- Beutler H.O., Michal G. “Neue Methode zur enzymatischen Bestimmung von Ethanol in Lebensmitteln”. *Z. Anal. Chem.* 284, 113-117 (1977).
- Bianchi G. “Lipids and phenols in table olives”. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105, 229-242 (2003).
- Blanco M.C., Blanco C.G., Martínez-Alonso A., Tascón J.M.D. “Composition of gases released during olive stones pyrolysis”. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 65, 313-322 (2002).
- Blázquez G., Hernáinz F., Calero M., Martín-Lara MA., Tenorio G. “The effect of pH on the biosorption of Cr (III) and Cr (VI) with olive stone”. *Chem. Eng. J.* 148, 473-479 (2009).
- Bollok M., Reczey K. “Cellulase enzyme production by various fungal strains on different carbon sources”. *Acta Alimentaria.* 29, 155-168 (2005).
- Boussaid A.L., Esteghlalian A.R., Gregg D.J., Lee K.H., Saddler J.N. “Steam pretreatment of Douglas-fir wood chips – Can conditions for optimum hemicelluloses recovery still provide adequate access for efficient enzymatic hydrolysis”. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84, 693-705 (2000).
- Boussaid A.L., Saddler J.N. “Adsorption and activity profiles of cellulases during the hydrolysis of two Douglas-fir pulps”. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 138-143 (1999).
- Boyer L.J., Vega J.L., Klasson K.T., Clausen E.C., Gaddy J.L. “The effect of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture”. *Biomass Bioenerg.* 3, 41-48 (1992).

- Bravo V., Camacho F., Sánchez S., Castro E. “The effect of pH on kinetic and yield parameters during the ethanolic fermentation of the D-xylose with *Pachysolen tannophilus*”. *Bioprocesos Engineering*. 9, 159-165 (1993).
- Bravo V., Martínez M.E., Sánchez S., Castro E., Sánchez P. “Fermentación etanólica de disoluciones de D-xilosa con *Pachysolen tannophilus*. Influencia del nivel de aireación”. *Afinidad* 52, 189-196 (1995).
- Calero M., Hernáinz F., Blázquez G., Tenorio G., Martín-Lara M.A. “Study of Cr (III) biosorption in a fixed-bed column”. *Chem. Eng. J.* 171, 886-893 (2009).
- Canettieri E.V., de Moraes Rocha G.J., de Carvalho J.A.J.r., de Almeida e Silva J.B. “Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology”. *Bioresource Technol.* 98, 422-428 (2007).
- Castellanos O.F., Sinitsyn A.P., Vlasenko E. Yu. “Evaluation of hydrolysis conditions of cellulosic materials by *Penicillium cellulase*”. *Bioresource Technol.* 52, 109-117 (1995).
- Chapla D., Pandit P., Shah A. “Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics”. *Bioresource Technol.* 115, 215-221 (2012).
- Chen L.F., Gong C.S. “Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolyzate to xylitol by a hydrolyzate-acclimatized yeast”. *J. Food Sci.* 50, 226-228 (1985).
- Chian C., Knight S.G. “Xylose metabolism by cell-free extract of *Penicillium chrysosporium*”. *Nature*. 188, 79-81 (1960).
- Choi S., Kim J.H., Wi S.G., Kim K.H., Bae H.J. “Bioethanol production from mandarin (*Citrus unshiu*) peels waste using popping pretreatment”. *Appl. Energ.* 102, 204-210 (2013).
- Coimbra M.A., Waldron K.W., Selvendran R.R. “Isolation and characterization of cell wall polymers from the heavily lignified tissues of olive (*Olea europaea*) seed hull”. *Carbohydr. Polym.* 27, 285-294 (1995).

- Converti A., Perego P., Domínguez J.M. “Xylitol production from hardwood hemicellulose hydrolyzates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii*”. Appl. Biochem. Biotechnol. 82, 141-151 (1999).
- Cuadros S. Máster en Ingeniería y Gestión Medioambiental. Residuos agrícolas, forestales y lodos. Contaminación de residuos. EOI Escuela de negocios. Madrid: 2008.
- Cuevas M. “Hidrólisis enzimática del hueso de aceituna. Fermentación de hidrolizados con levaduras”. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén (2007).
- Cuevas M., García J.F., Cruz N., Sánchez S. “Generación de D-xilosa por tratamiento hidrotérmico de endocarpios de aceitunas e hidrólisis enzimática de los oligosacáridos”. Afinidad. 70, 99-106 (2013).
- Cuevas M., Sánchez S., Bravo V., Cruz N., García J.F. “Fermentation of enzymatic hydrolysates from olive stones by *Pachysolen tannophilus*”. J. Chem Technol Biotechnol. 84, 461-467 (2009).
- De Faveri D., Torre P., Perego P., Converti A. “Statistical investigation on the effects of starting xylose concentration and oxygen mass flow rate on xylitol production from rice straw hydrolysate by response surface methodology”. J. Food Eng. 65, 383-389 (2004).
- Demirbaş A. “Partly chemical analysis of liquid fraction of flash pyrolysis products from biomass in the presence of sodium carbonate”. Energ. Convers. Manage. 43, 1801-1809 (2002).
- Deswal D., Khasa Y.P, Kuhad R.C. “Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation”. Bioresource Technol. 102, 6065-6072 (2011).
- El Bakouri H., Usero J., Morillo J., Ouassini A. “Adsorptive features of acid-treated olive stones for drin pesticides: Equilibrium, kinetic and thermodynamic modeling studies”. Bioresource Technol. 100, 4147-4155 (2009).

- El-Sheikh A.H., Newman A.P., Al-Daffaee H.K., Phull S., Cresswell N. “Characterization of activated carbon prepared from a single cultivar of Jordanian Olive stones by chemical and physicochemical techniques”. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 71, 151-164 (2004).
- Ericsson K., Nilsson L.J. “Assessment of the potential biomass supply in Europe using a resource-focused approach”. *Biomass Bioenerg.* 30, 1-15 (2006).
- Fernández-Bolaños J., Felizón B., Heredia A., Guillén R., Jiménez A. “Characterization of the lignin obtained by alkaline delignification and of the cellulose residue from steam-exploded olive stones”. *Bioresource Technol.* 68, 121-132 (1999).
- Fernández-Bolaños J., Felizón B., Heredia A., Rodríguez R., Guillén R., Jiménez A. “Steam-explosion of olive stones: Hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose”. *Bioresource Technol.* 79, 53-61 (2001).
- Fischer G., Schrattenholzer L. “Global bioenergy potentials through 2050”. *Biomass Bioenerg.* 20, 151-159 (2001).
- Galbe M., Zacchi G. “A review of the production of ethanol from softwood”. *Appl. Microb. Biotechnol.* 59, 618-628 (2002).
- Gan Q., Allen S.J., Taylor G. “Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview, an experimental study and mathematical modelling”. *Process Biochem.* 38, 1003-1018 (2003).
- García J.F., Sánchez S., Bravo V., Cuevas M., Rigal L., Gaset A. “Xylitol production from olive-pruning debris by sulphuric acid hydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*”. *Holzforschung* 65, 59-65 (2011).
- García X. “Solar absorption cooling in Spain: Perspectives and outcomes from the simulation of recent installations”. *Renew. Energ.* 31, 1371-1389 (2006).
- Garrote G., Domínguez H., Parajó J.C. “Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production”. *J. Food Eng.* 52, 211-218 (2002).

- Garrote G., Domínguez H., Parajó J.C. “Interpretation of deacetylation and hemicellulose hydrolysis during hydrothermal treatments on the basis of the severity factor”. *Process Biochem.* 37, 1067-1073 (2002).
- Ghose T.K. “Measurement of cellulase activities”. *Pure Appl. Chem.* 59, 257-268 (1987).
- González J.F., González-García C.M., Ramiro A., González J., Sabio E., Gañán J., Rodríguez M.A. “Combustion optimisation of biomass residue pellets for domestic heating with a mural boiler”. *Biomass Bioenerg.* 27, 145-154 (2004).
- González M., Molina-Sabio M., Rodriguez R. “Steam activation of olive stones chars, development of porosity”. *Carbon* 32, 1407-1413 (1994).
- Gregg D.J., Saddler J.N. “Factor affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process”. *Biotechnol. Bioeng.* 51, 375-383 (1996).
- Gutierrez T., Ingram L.O., Preston J.F. “Purification and characterization of a furfural reductase (FFR) from *Escherichia coli* strain LYO1. An enzyme important in the detoxification of furfural during ethanol production”. *J. Biotechnol.* 121, 154-164 (2006).
- Han B., Carvalho W., Canilha L., Silva S.S. da, Silva J., McMillan J.D., Wickramasinghe S.R. “Adsorptive membranes vs. resins for acetic acid removal from biomass hydrolysates”. *Desalination.* 193, 361-366 (2006).
- Helle S., Cameron D., Lam J., White B., Duff S. “Effect of inhibitory compounds founds in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*”. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 786-792 (2003).
- Hodaifa G., Pulido-Ochando J.M., Ben Driss Alami S., Vives- Rodriguez S., Ferez-Martinez A. “Kinetic and thermodynamic parameters of iron adsorption onto olive stones”. *Ind. Crop. Prod.* 49, 526-534 (2013).
- Hodge D.B., Karim M.N., Schell D.J., McMillan J.D. “Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis”. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 152, 88 (2009).

- Hodge D.B., Karim M.N., Schell D.J., McMillan JD. “Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose”. *Bioresource Technol.* 99, 8940 (2008).
- Huang H.J., Ramaswamy S., Tschirner U.W., Ramarao B.V. “A review of separation technologies in current and future biorefineries”. *Sep. Purif. Technol.* 62, 1-21 (2008).
- Jenkin B.M., Baxter L.L., Miles Jr T.R., Mile T.R. “Combustion properties of biomass”. *Fuel Process. Technol.* 54, 17-46 (1998).
- Ju X., Engelhard M, Zhang Xi. “An advanced understanding of the specific effects of xylan and surface lignin contents on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass”. *Bioresource Technol.* 132, 137-145 (2013).
- Juhász T., Kozma K., Szengyel Z., Réczey K. “Production of β -Glucosidase in Mixed Culture of *Aspergillus niger* BKMF 1305 and *Trichoderma reesei* RUT C30”. *Food Technol. Biotechnol.* 41, 49-53 (2003).
- Karimi K., Kheradmandinia S., Taherzadeh M. J. “Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis”. *Biomass Bioenerg.* 30, 274-253 (2006).
- Katzen R. A. “60 year journey through conversion of biomass to ethanol”. En: *Proceedings of the Fifth Brazilian Symposium on the chemistry of lignins and other woods components*, Ramos L. P. (Ed), Vol. 6, pp. 334-339, Curitiba, Brasil (1997).
- Keller F. A. “Integrated bioprocess development for bioethanol production”. En: *Handbook on bioethanol: production and utilization*, Wyman C. E. (Ed), pp. 1-18 Taylor and Francis, Bristol, Reino Unido (1996).
- Kim I., Lee B., Park J.Y., Choi S.A., Han J.I. “Effect of nitric acid on pretreatment and fermentation for enhancing ethanol production of rice straw”. *Carbohydr. Polym.* 99, 563-567 (2014).
- Kim S.Y., Oh D.K., Kim J.H. “Evaluation of xylitol production from corn cob hemicellulose hydrolyzate by *Candida parapsilosis*”. *Biotechnol. Lett.* 21, 891-895 (1999).

- Kristensen J.B., Borjesson J., Bruum M.H., Tjerneld F., Jorgensen H. “Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose”. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 888-895 (2006).
- Kruse B., Schügerl K. “Investigation of ethanol formation by *Pachysolen tannophilus* from xylose/glucose co-substrates”. *Process Biochem.* 31, 389-407 (1996).
- Kumar L., Arantes V., Chandra R., Saddler J. “The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility”. *Bioresource Technol.* 103, 201-208 (2012).
- Larsson S. “Ethanol from lignocellulose-Fermentation inhibitors, detoxification and genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced resistance”. Tesis Doctoral, Universidad de Lund, Suecia (2000).
- Larsson S., Reimann A., Nilvebrant N.O., Jönsson L.J. “Comparison of different methods for detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce”. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77-79, 91-103 (1999).
- Laser M., Schulman D., Allen S.G., Lichwa J., Antal M.J., Lynd L.R. “A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol”. *Bioresource Technol.* 81, 33-44 (2002)
- Lee H., James A.P., Zahab D.M., Mahmoudides G., Maleszka R., Schneider H. “Mutants of *Pachysolen tannophilus* with improved production of ethanol from Dxylose”. *Appl. Environ. Microb.* 51, 1252-1258 (1986).
- Lenihan P., Orozco A., O'Neill E., Ahmad M.N.M., Rooney D.W., Walker G.M. “Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass”. *Chem. Eng. J.* 156, 395-403 (2010).
- Lindegren C.C., Nagai S., Nagai H. “Induction of respiratory deficiency in yeast by manganese, copper, cobalt and nickel”. *Nature* 182, 446-448 (1958).
- Lozano P., Bernal B., Jara A.G., Belleville M.P. “Enzymatic membrane reactor for full saccharification of ionic liquid-pretreated microcrystalline cellulose”. *Bioresource Technol.* 151, 159-165 (2014).

- Lu Y.P., Yang B., Gregg D., Saddler J.N., Mansfield S.D. “Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues” *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98, 641-654 (2002).
- Lu Y.F., Wang Y.H., Xu G.Q., Chu J., Zhuang Y.P., Zhang S.L. “Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass”. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 360 (2010).
- Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. “Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology” *Microb. Mol. Biol. R.* 66, 506-577 (2002).
- Ma X.X., Yue G.J., Yu J.L., Zhang X., Tan T.W. “Enzymatic hydrolysis of cassava bagasse with high solid loading”. *J. Biobased Mater Bioenerg.* 5, 275 (2011).
- Martínez M.L., Sánchez S., Bravo V. “Production of xylitol and ethanol by *Hansenula polymorpha* from hydrolysates of sunflower stalks with phosphoric acid”. *Ind. Crops Products.* 40, 160-166 (2012).
- Martín-Sampedro R., Eugenio M.E., García J.C., Lopez F., Villar J.C., Diaz M.J. “Steam explosion and enzymatic pre-treatments as an approach to improve the enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus globulus*”. *Biomass Bioenerg.* 42, 97-106 (2012).
- Mateo S., Puentes J.G., Sánchez S., Moya A.J. “Oligosaccharides and monomeric carbohydrates production from olive tree pruning biomass”. *Carbohydr. Polym.* 93, 416-423 (2013).
- Miettinen-Oinonen A., Suominen P. “Enhanced production of *Trichoderma reesei* endoglucanases and use of the new cellulase preparations in producing the stonewashed effect on denim fabrics”. *App. and Environmental Microb.* 68, 3956-3964 (2002).
- Miller G. “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar”. *Anal. Chem.* 31, 426-428 (1959).
- Mohagheghi A., Ruth A., Schell D.J. “Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields”. *Process Biochem.* 41, 1806-1811 (2006).

- Monavari S., Galbe M., Zacchi G. “The influence of solid/liquid separation techniques on the sugar yield in two-step dilute acid hydrolysis of softwood followed by enzymatic hydrolysis”. *Biotechnol. Biofuels*. 2:6 (2009).
- Montané D., Salvadó J., Torras C., Farriol X. “High-temperature dilute-acid hydrolysis of olive stones for furfural production”. *Biomass Bioenerg.* 22, 295-304 (2002).
- Montero M.A. “Hidrolisi enzimatica de materials lignocelulosics residuals pretractats per metodes termomecanics en fase aquosa”. Tesis Doctoral. Universidad Rovira I Virgili, Tarragona (1997).
- Montgomery D.C. “Design and analysis of experiments”. Wiley, Nueva York (2001).
- Mooney C.A., Mansfield S.D., Beatson R.P., Saddler J.N. “The effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulose accessibility to softwood substrates”. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 644-650 (1999).
- Mussatto S.I., Roberto I.C. “Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes”. *Bioresource Technol.* 93, 1-10 (2004).
- Mussatto S.I., Dragone G., Roberto I.C. “Influence of the toxic compounds present in brewer’s spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*”. *Process Biochem.* 40, 3801-3806 (2005).
- Nabarlantz D., Farriol X., Montané D. “Kinetic modelling of the autohydrolysis of lignocellulosic biomass for the production of hemicellulose-derived oligosaccharides”. *Ind. Eng. Chem. Res.* 43, 4124-4131 (2004).
- Nefzaoui A. Etude de l’ utilisation des sous-produits de l’olivier en alimentation animal en Tunisie. Dirección de Producción y Salud Animal, FAO, Roma, 1983.
- Nigam J.N. “Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*”. *J. Biotechnol.* 87, 17-27 (2001).
- Oliveira Fernando M.V., Pinheiro Irapuan O., Souto-Maior Ana M., Martin Carlos., Gonçalves Adilson R., Rocha George J.M. “Industrial-scale steam explosion pretreatment

- of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products”. *Bioresource Technol.* 130, 168-173 (2013).
- Ooshima H., Sakata M., Harano Y. “Enhancement of enzymatic-hydrolysis of cellulose by surfactant”. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 1727-1734 (1986).
 - Overend R.P., Chornet E. “Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatment”. *Phil. Trans. Roy. Soc. London A.* 321, 523-536 (1987).
 - Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. “Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification”. *Bioresource Technol.*, Vol. 74, 17-24 (2000a).
 - Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. “Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition”. *Bioresource Technol.* 74, 25-33 (2000b).
 - Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Galbe M., Zacchi G. “The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation”. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 470-476 (1996).
 - Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M. “Xylitol production from eucaliptus wood hydrolysates extracted with organic solvents”. *Process Biochem.* 32, 599-604 (1997).
 - Park J.W., Park K., Song H., Shin H. “Saccharification and adsorption characteristics of modified cellulases with hydrophilic/hydrophobic copolymers”. *J. Biotechnol.* 93, 203-208 (2002).
 - Pfeifer M.J., Silva S.S., Felipe M.G.A., Roberto I.C., Mancilha I.M. “Effect of culture conditions on xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037”. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57/58, 423-430 (1996).
 - Pierre G., Sannier F., Goude R, Nouviaire A., Maache-Rezzoug Z., Rezzoug S.A., Maugard T. “Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from Brewers' spent grain”. *J. Cereal Science.* 54, 305-310 (2011).
 - Puls J., Poutanen K., Körner H., Viikari L. “Biotechnical utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment”. *Appl. Microb. Biotechnol.* 22, 416-423 (1985).

- Quarta B., Anese M. “Furfurals removal from roasted coffee powder by vacuum treatment”. *Food Chem.* 130, 610-614 (2012).
- Quintero R. “Cinética de fermentaciones”. En: *Ingeniería Bioquímica*, pp. 39-55. Alhambra Mexicano, México (1981).
- Rahman S.H.A., Choudhury J.P., Ahmad A.L., Kamaruddin A.H. “Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose”. *Bioresource Technol.* 98, 554-559 (2007).
- Ramos J.P., Breuil C., Saddler J.N. “The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma cellulases*”. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 19-25 (1993).
- Reese E., Siu R., Levinson H. “The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis”. *J. Appl. Bacteriol.* 59, 485-497 (1950).
- Roberto I.C., Laci L.S., Barbosa M.F.S., de Mancilla I.M. “Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol”. *Process Biochem.* 26, 15-21 (1991).
- Rodríguez-Chong A., Ramírez J.A., Garrote G., Vázquez M. “Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment”. *J. Food Eng.* 61, 143-152 (2004).
- Rojas S., Ramiro A., Aroca S. “Aprovechamiento de residuos agrícolas por combustión”. *Ing. Quim. Mayo*, 221-225 (1992).
- Roos A., Persson T., Krawczyk H., Zacchi G., Stålbbrand H. “Extraction of water-soluble hemicelluloses from barley husks”. *Bioresource Technol.* 100, 763-769 (2009).
- Rosúa J.M., Pasadas M. “Biomass potential in Andalusia, from grapevines, olives, fruit trees and poplar, for providing heating in homes”. *Renew. and Sustainable Energ. Reviews.* 16, 4190-4195 (2012).

- Saddler J.N., Ramos L.P., Breuil C. “Steam pretreatment of lignocellulosic residues”. En: Bioconversion of forest and agricultural plant residues. Saddler J.N. (Ed.), pp. 73-91 C.A.B. International, Wallingford (1993).
- Saha B.C., Bothast R.J. “Production of 2,3-butanediol by a new isolated *Enterobacter cloacae*”. Appl. Microb. Biotechnol. 52, 321-326 (1999a).
- Saha B.C., Bothast R.J. “Production of xylitol by *Candida peltata*”. J. Ind. Microb. Biotechnol. 22, 633-636 (1999b).
- Sampaio F.C., De Faveri D., Mantovani H.C., Lopes Passos F.M., Perego P., Converti A. “Use of response surface methodology for optimization of xylitol production by the new yeast strain *Debaryomyces hansenii* UFV-17”. J. Food Eng. 76, 376-386 (2006).
- Sánchez G., Pilcher L., Roslander C., Modig T., Galbe M., Liden G. “Diluted-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw material Paja Brava”. Bioresource Technol. 93, 249-256 (2004).
- Sánchez S., Bravo V., García J.F., Cruz N., Cuevas M. “Fermentation of D-glucose and D-xylose mixtures by *Candida tropicalis* NBRC 0618 for xylitol production”. World J. Microb. Biotechnol. 24, 709-716 (2008).
- Sánchez S., Bravo V., Moya A.J., Castro E., Camacho F. “Influence of temperature on the fermentation of D-xylose by *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol and xylitol”. Process Biochem. 39, 673-679 (2004).
- Sato N., Shinji Ki., Mizuno M., Nozaki K., Suzuki M., Makishima S., Shiroishi M., Onoda T., Takahashi F., Kanda T., Amano Y. “Improvement in the productivity of xylooligosaccharides from waste medium after mushroom cultivation by hydrothermal treatment with suitable pretreatment”. Bioresource Technol. 101, 6006-6011 (2010).
- Schütt F., Westereng B., Horn S.J., Puls Jürgen., Saake Bodo. “Steam refining as an alternative to steam explosion”. Bioresource Technol. 111, 476-481 (2012).
- Seillière G. “Sur un cas d’hydrolyse diastasique de la cellulose du coton, après dissolution dans la liqueur de Schweitzer”. C.R. Soc. Biol. 61, 205-206 (1906).

- Sewalt V.J.H., Glasser W.G., Beauchemin K.A. “Lignin impact on fiber degradation. 3. Reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives”. *J. Agr. Food Chem.* 45, 1823-1828 (1997).
- Shatalov A., Pereira H. “Xylose production from giant reed (*Arundo donax* L.): Modeling and optimization of dilute acid hydrolysis”. *Carbohydr. Polym.* 87, 210-217 (2012).
- Siqueira G., Várnai Anikó., Ferraz., Milagres A.M.F. “Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite”. *Appl. Energ.* 102, 399-402 (2013).
- Skodras G., Grammelis P., Basinas P., Kakaras E., Sakellariopoulos G. “Pyrolysis and combustion characteristics of biomass and waste-derived feedstock”. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45, 3791-3799 (2006).
- Slininger P.J., Bolen P.L., Kurtzman C.P. *Pachysolen tannophilus*: “Properties and process considerations for ethanol production from D-xylose”. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 5–16 (1987).
- Sun Y., Cheng J. “Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review”. *Bioresource Technol.* 83, 1-11 (2002).
- Taralas G., Kontominas M.G. “Thermochemical treatment of solid and wastewater effluents originating from the olive oil food industry”. *Energ. Fuel.* 19, 1179-1185 (2005).
- Tengborg C., Galbe M., Zacchi G. “Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreatment softwood”. *Biotechnol. Progr.* 17, 110-117 (2001a).
- Tengborg C., Galbe M., Zacchi G. “Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood”. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 835-844 (2001b).
- Teymouri F., Laureano-Perez L., Alizadeh H., Dale B.E. “Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover”. *Bioresource Technol.* 96, 2014-2018 (2005).

- Toivola A., Yarrow D., van den Bosch E., van Dijken J.P., Scheffers W.A. “Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts”. *Appl. Environ. Microb.* 47, 1221-1223 (1984).
- Torget R., Werdene M., Himmel K., Grohmann K. “Diluted-acid pretreatment of short rotational woody and herbaceous crops”. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24-25, 115-126 (1990).
- Tortosa J.F., Rubio M., Demetrio G. “Autohidrólisis de tallo de maíz en suspensión acuosa”. *Afinidad* 52, 181-188 (1995).
- Trinder P. “Determination of glucose blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor”. *Ann. Clin. Biochem.* 6, 24-27 (1969).
- Van Soest P.J., Wine R.H. “Use of detergents in the analysis of fibrous feed. IV. The determination of plant cell wall constituents”. *J. Assoc. off Anal. Chem.* 50, 50-55, (1967).
- Villarreal M.L.M., Prata A.M.R., Felipe M.G.A., Almeida E Silva J.B. “Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*”. *Enzyme and Microb. Technol.* 40, 17-24 (2006).
- Virgilio da Silva D.D., Maciel de Mancilha I., da Silva S.S., de Almeida Felipe M.G. “Improvement of biotechnological xylitol production by glucose during cultivate of *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate”. *Brazilian Archives Biol. Technol.* 50, 207-215 (2007).
- Wang W., Zhuang X.S., Yuan ZH., Yu Q., Qi W., Wang Q. “High consistency enzymatic saccharification of sweet sorghum bagasse pretreated with liquid hot water”. *Bioresource Technol.* 108, 252 (2012).
- Weng Y.H., Wei H.J., Tsai T.Y., Chen W.H., Wei T.Y., Hwang W.S., Wang C.P., Huang C.P. “Separation of acetic acid from xylose by nanofiltration”. *Separ. Purif. Technol.* 67, 95-102 (2009).
- Winkelhausen E., Kuzmanova S. “Microbial conversion of d-xylose to xylitol”. *J. Fermen. Bioeng.* 86, 1-14 (1998).

- Yablochkova E.N., Bolotnikova O.I., Mikhailova N.P., Nemova N.N., Ginak A.I. “Specific features of fermentation of D-xylose and D-glucose by xylose-assimilating yeast”. Appl. Biochem. Microb. 39, 265-269 (2003).
- Yablochkova E.N., Bolotnikova O.I., Mikhailova N.P., Nemova N.N., Ginak A.I. “The activity of key enzymes in xylose-assimilating yeasts at different rates of oxygen transfer to the fermentation medium”. Microb. 73, 163-168 (2004).
- Yang J., Zhang X.P., Yong Q.A, Yu S.Y. “Three-stage enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover at high substrate concentration”. Bioresource Technol. 102, 4905 (2011).
- Zhang R., Lu X., Sun Y., Wang X., Zhang S. “Modeling and optimization of dilute nitric acid hydrolysis on corn stover”. Chemical Technol. and Biotechnol. 86, 306-314 (2011).
- Zhao J., Xia L. “Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells”. Biochem. Eng. J. 49, 28-32 (2010).
- Zhao L., Zhang X., Tan T. “Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*”. Biomass Bioenerg. 32, 1156-1161 (2008).
- Zhu J.Y., Wang G.S., Pan X.J., Gleisner R. “Specific surface to evaluate the efficiencies of milling and pretreatment of wood for enzymatic saccharification”. Chemical Engineering Science. 64, 474-485 (2009).
- Zhu W., Zhu J.Y., Gleisner R., Pan X.J. “On energy consumption for size-reduction and yields from subsequent enzymatic saccharification of pretreated lodgepole pine”. Bioresource Technol. 101, 2782-2792 (2010).

PÁGINAS WEB

- AAE (2011). “[La energía en Andalucía](http://www.agenciaandaluzadelaenergia.es)”. www.agenciaandaluzadelaenergia.es.
- AAE (2008). “[La energía en Andalucía](http://www.agenciaandaluzadelaenergia.es)”. www.agenciaandaluzadelaenergia.es
- BP. (2013). “Statistical Review of World Energy 2012”, <http://www.bp.com>; accedido el día 3-10-2013.
- EIA (2007). “Administración de Información de la Energía”, International Energy Outlook 2007. Washington, DC, EE.UU. Disponible en: www.eia.doe.gov/oiaf/ieo/index.html.
- Greenpeace (2009). “La crisis del clima. Evidencias del cambio climático en España”. http://www.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/cambio_climatico/090503.pdf; accedido el día 13-01-2014.
- Humbird D., Davis R., Tao L., Kinchin C., Hsu D., Aden A., Schoen P., Lukas J., Olthof B., Worley M., Sexton D., Dudgeon D. (2011). “Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover”. Report NREL/TP-5100-47764. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory. <http://www.nrel.gov/docs/fy11osti/50900.pdf>; accedido el día 3-10-2013.
- SODEAN (1999). “Potencial y aprovechamiento energético de la biomasa del olivar en Andalucía”, <http://www.energiasrenovables.ciemat.es/?pid=4000&id=88&tipo=documentos>; accedido el día 8-10-2013.
- SODEAN (2003). “Potencial y aprovechamiento energético de la biomasa del olivar en Andalucía”, <http://www.energiasrenovables.ciemat.es/?pid=4000&id=88&tipo=documentos>; accedido el día 8-10-2013.

8. ANEXO

Tesis de doctorado
*Tratamientos a presión e hidrólisis del hueso de aceituna.
Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen tannophilus**

A.1 Hidrólisis a presión con agua y ácidos sulfúrico y nítrico (PT1)

A.1.1 Pretratamiento con agua a 200°C mantenidos durante 0 minutos

Tabla A.1.1 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con agua $T_{\text{máxima}}: 200^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$	
t , min	T , °C
0,00	100
1,30	107
6,30	134
11,30	162
16,30	188
17,30	193
18,30	198
18,70	200
19,30	182
19,80	151
20,30	130
20,80	115
21,30	102
21,40	100

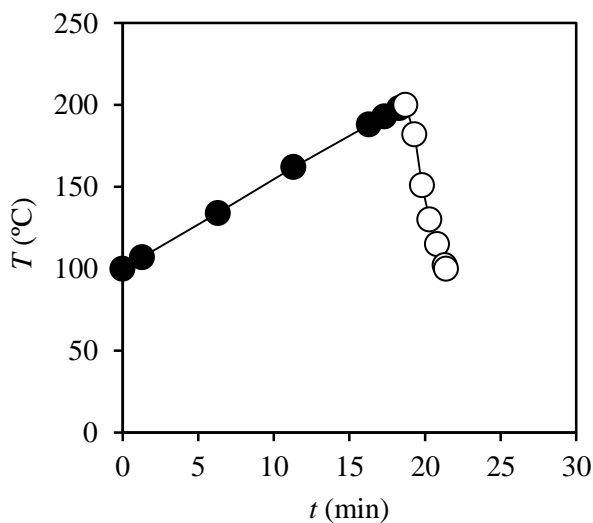


Figura A.1.1 Evolución de temperaturas en el pretratamiento de huesos de aceituna con agua ($T_{\text{máxima}}: 200^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$)

Pretratamiento con agua ($T_{\text{máxima}}: 200^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 100,25^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 1,000$
$b = 5,363^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2510$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 0$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -40936^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 1,000$
$b = 6333,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 330$
$c = -322,85^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 5,4444^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 2840$	$\log R_0 = 3,45$

A.1.2 Pretratamiento con agua a 205°C mantenidos durante 0 minutos

Tabla A.1.2 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con agua $T_{\text{máxima}}: 205^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$	
t , min	T , °C
0,00	100
3,72	121
7,82	150
8,72	152
9,72	158
10,72	163
11,72	169
12,72	174
13,72	179
14,72	185
15,72	191
16,72	196
17,72	201
18,21	205
18,72	205
19,22	187
19,72	164
20,22	147
20,72	135
21,22	126
21,72	120
22,22	114
22,72	111
23,22	107
23,72	104
24,22	102
24,62	100

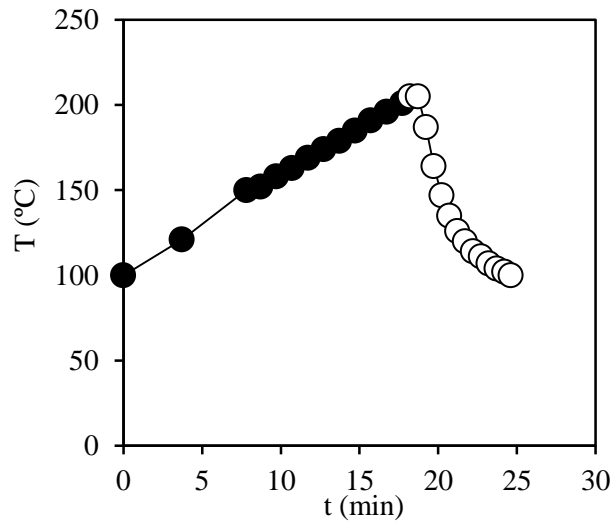


Figura A.1.2 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con agua ($T_{\text{máxima}}: 205^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$)

Pretratamiento con agua ($T_{\text{máxima}}: 205^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 102,11^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,997$
$b = 5,631^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 3837$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 205^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 0$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = 8525,4^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,998$
$b = -1054,7^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 507$
$c = 44,233^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = -0,6212^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 4343$	$\log R_0 = 3,64$

A.1.3 Pretratamiento con agua a 210°C mantenidos durante 0 minutos

Tabla A.1.3 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con agua $T_{\text{máxima}}: 210^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$	
t , min	T , °C
0,00	100
0,87	105
10,87	157
15,87	184
16,87	190
17,87	195
18,87	200
19,37	203
19,87	206
20,37	208
20,87	210
21,37	193
21,87	156
22,37	133
22,87	116
23,37	104
23,61	100

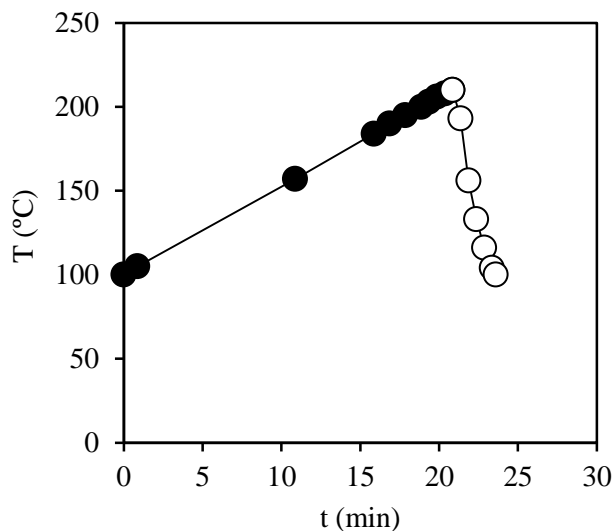


Figura A.1.3 Evolución de temperaturas en el pretratamiento de huesos de aceituna con agua ($T_{\text{máxima}}: 210^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$)

Pretratamiento con agua ($T_{\text{máxima}}: 210^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 100,08^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 1,000$
$b = 5,301^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 5061$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 210^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 0$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -53118^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,994$
$b = 7472,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 610$
$c = -346,68^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 5,3225^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 5671$	$\log R_0 = 3,75$

A.1.4 Pretratamiento con agua a 220°C mantenidos durante 0 minutos

Tabla A.1.4 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con agua $T_{\text{máxima}}: 220^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$	
t , min	T , °C
0,00	100
1,38	107
6,38	134
11,38	163
16,38	188
17,38	192
18,38	197
19,38	202
20,38	207
21,38	213
22,38	218
22,88	221
23,38	220
23,88	186
24,38	155
24,88	133
25,38	118
25,88	107
26,27	100

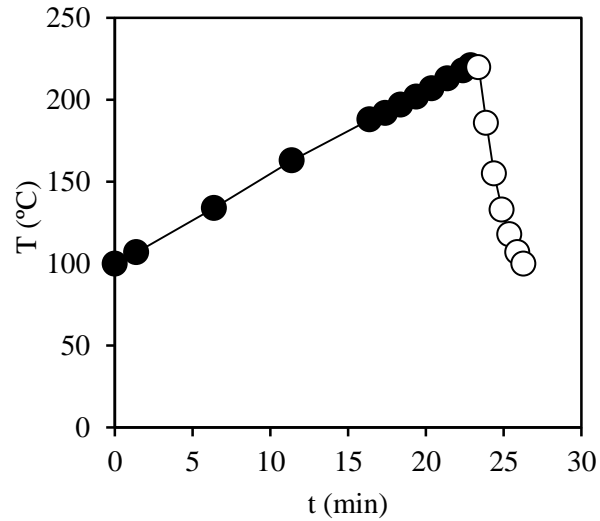


Figura A.1.4 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con agua ($T_{\text{máxima}}: 220^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$)

Pretratamiento con agua ($T_{\text{máxima}}: 220^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 100,81^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,999$
$b = 5,230^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 11868$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 220^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 0$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = 25224^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 1,000$
$b = -2661,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 776$
$c = 93,846^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = -1,1021^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 12644$	$\log R_0 = 4,10$

A.1.5 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 200°C mantenidos durante 0 minutos

Tabla A.1.5 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}: 200^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$	
t , min	T , °C
0,00	100
0,90	105
5,90	130
10,90	157
15,90	183
16,90	188
17,40	191
17,90	193
18,40	196
18,90	198
19,07	200
19,90	178
20,90	130
21,40	114
21,90	103
22,09	100

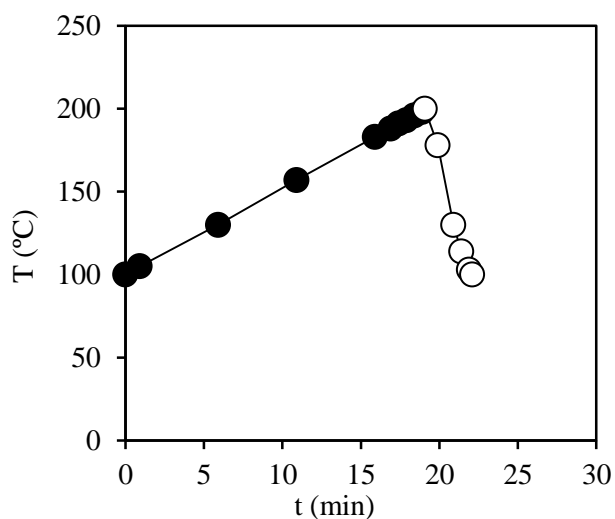


Figura A.1.5 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}: 200^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}: 200^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,94^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 1,000$
$b = 5,21^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2392$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 0$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -51025^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,999$
$b = 7590,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 509$
$c = -372,92^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 6,0698^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 2901$	$\log R_0 = 3,46$

A.1.6 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 205°C mantenidos durante 0 minutos

Tabla A.1.6 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 205°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min	
t , min	T , °C
0,00	100
0,53	103
5,53	129
10,53	155
15,53	182
16,53	187
17,53	192
18,53	196
19,53	201
20,03	203
20,53	205
21,03	175
21,53	146
22,03	126
22,53	112
23,03	101
23,10	100

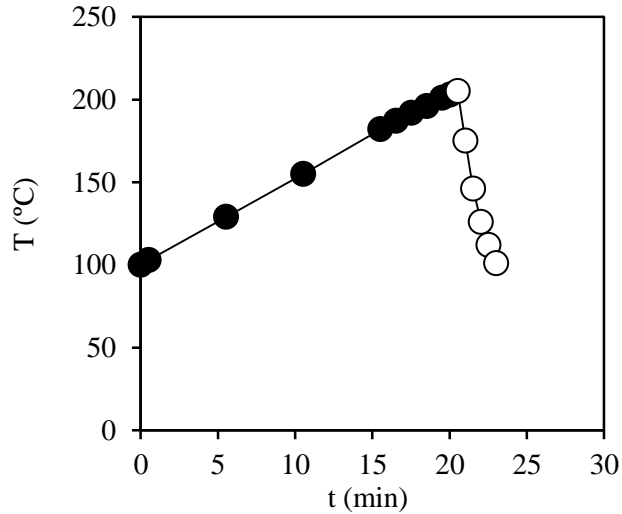


Figura A.1.6 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 205°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min))

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 205°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 100,48^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 1,000$
$b = 5,164^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 3904$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 205^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 0$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = 6687,5^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 1,000$
$b = -579,69^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 312$
$c = 13,712^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = -0,0416^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 4216$	$\log R_0 = 3,62$

A.1.7 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 210°C mantenidos durante 0 minutos

Tabla A.1.7 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 210°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min	
t , min	T , °C
0,00	100
4,80	124
9,80	149
14,80	176
15,80	181
16,80	186
17,80	191
18,80	196
19,80	201
20,80	205
21,30	207
21,80	210
22,80	165
23,30	139
23,80	121
24,30	108
24,70	100

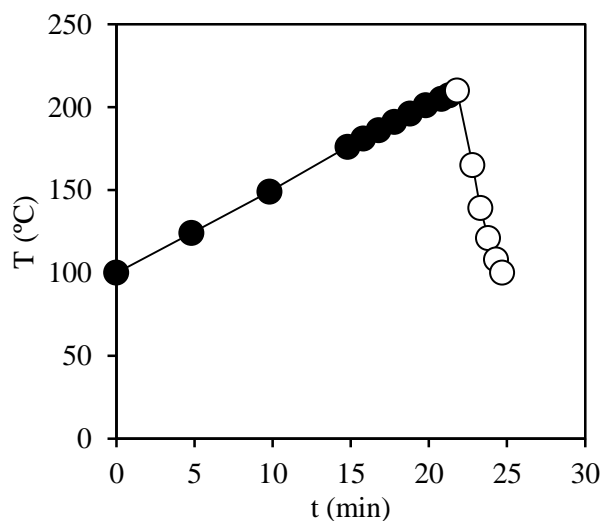


Figura A.1.7 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 210°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico $T_{\text{máxima}}$: 210°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 100,03^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 1,000$
$b = 5,077^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 5285$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 210^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 0$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -32796^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,999$
$b = 4475,8^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 555$
$c = -200,32^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 2,9568^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 5840$	$\log R_0 = 3, 77$

A.1.8 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 220°C mantenidos durante 0 minutos

Tabla A.1.8 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 220°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min	
t , min	T , °C
0,00	100
1,31	107
6,31	132
11,31	159
16,31	186
17,31	191
18,31	196
19,31	201
20,31	207
21,31	212
22,31	217
22,81	219
23,31	212
23,81	178
24,31	150
24,81	131
25,31	117
25,81	107
26,25	100

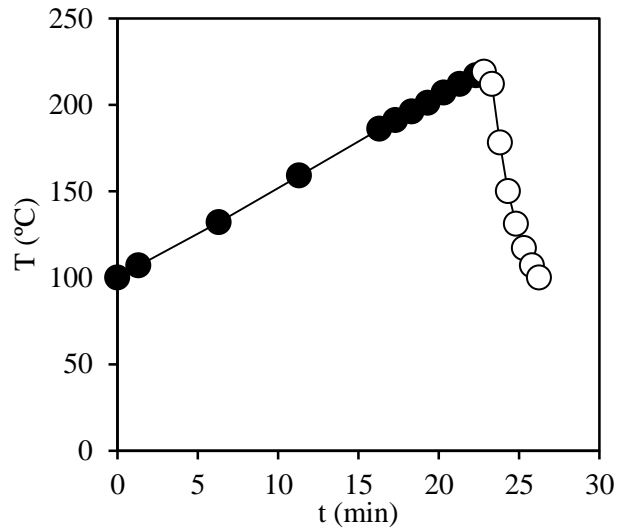


Figura A.1.8 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 220°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 220°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,78^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 1,000$
$b = 5,255^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 9355$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 220^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 0$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -50339^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,990$
$b = 6414,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 1552$
$c = -269,42^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 3,7433^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 10907$	$\log R_0 = 4,04$

A.1.9 Pretratamiento con disolución diluida de ácido nítrico (0,025 M) a 200°C mantenidos durante 0 minutos

Tabla A.1.9 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido nítrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min	
t , min	T , °C
0,00	100
0,52	103
5,52	128
10,52	154
15,52	180
16,52	185
17,52	190
18,52	194
19,52	199
20,52	200
21,52	120
22,02	107
22,37	100

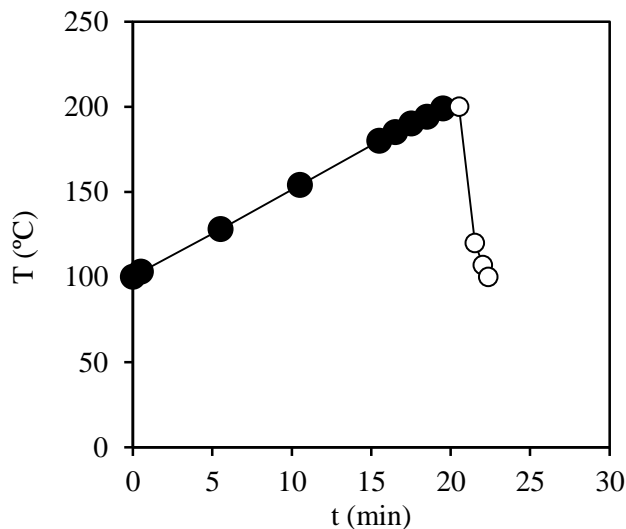


Figura A.1.9 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido nítrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min)

Pretratamiento con ácido nítrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 100,59^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,999$
$b = 5,030^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 3337$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 0$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = 169857^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 1,000$
$b = -22983^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 54$
$c = 1038,1^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = -15,644^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 3392$	$\log R_0 = 3,53$

A.1.10 Pretratamiento con disolución diluida de ácido nítrico (0,025 M) a 205°C mantenidos durante 0 minutos

Tabla A.1.10 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido nítrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 205°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min	
t , min	T , °C
0,00	100
1,11	106
6,11	131
11,11	158
16,11	185
17,11	191
18,11	196
19,11	202
20,11	203
21,11	163
21,61	142
22,11	125
22,61	112
23,11	100

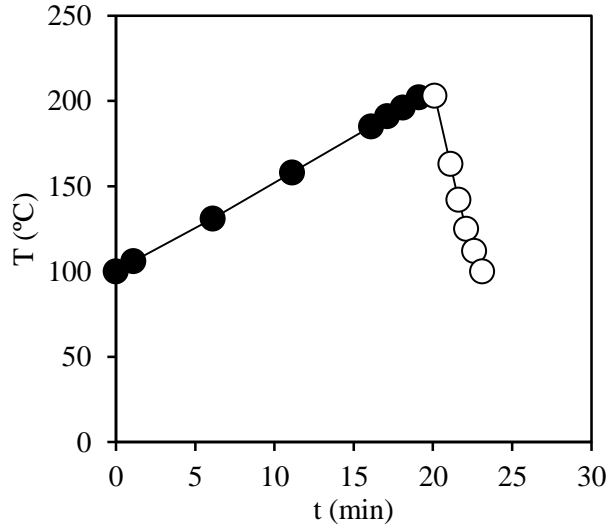


Figura A.1.10 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido nítrico ($T_{\text{máxima}}$: 205°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min)

Pretratamiento con ácido nítrico ($T_{\text{máxima}}$: 205°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,82^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,999$
$b = 5,268^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 3641$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 205^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 0$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -9788,7^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 1,000$
$b = 1538,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 427$
$c = -76,85^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 1,2464^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 4068$	$\log R_0 = 3,61$

A.1.11 Pretratamiento con disolución diluida de ácido nítrico (0,025 M) a 210°C mantenidos durante 0 minutos

Tabla A.1.11 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido nítrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 210°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min	
t , min	T , °C
0,00	100
0,92	105
5,92	130
10,92	157
15,92	184
16,92	189
17,92	194
18,92	199
19,92	204
20,42	206
20,92	209
21,42	208
21,92	174
22,42	147
22,92	128
23,42	114
23,92	104
24,21	100

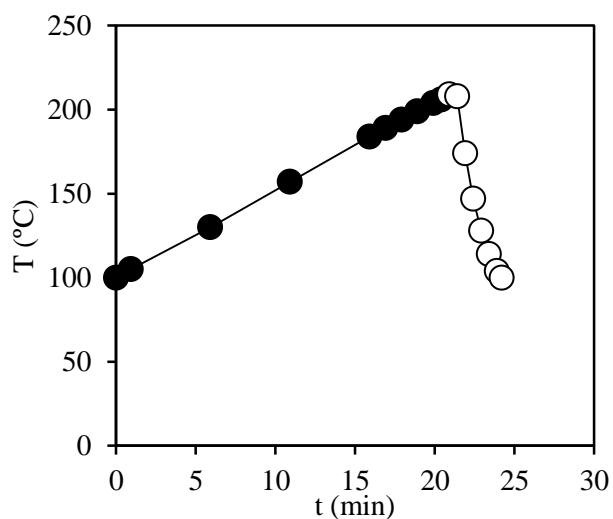


Figura A.1.11 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido nítrico ($T_{\text{máxima}}$: 210°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min)

Pretratamiento con ácido nítrico ($T_{\text{máxima}}$: 210°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 100,20^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,999$
$b = 5,188^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 5392$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 210^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 0$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = 27050^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 1,000$
$b = -3204,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 382$
$c = 127,31^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = -1,6907^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 5774$	$\log R_0 = 3,76$

A.1.12 Pretratamiento con disolución diluida de ácido nítrico (0,025 M) a 220°C mantenidos durante 0 minutos

Tabla A.1.12 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido nítrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 220°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min	
t , min	T , °C
0,00	100
1,15	106
6,15	132
11,15	159
16,15	187
17,15	192
18,15	197
19,15	203
20,15	208
21,15	214
22,15	221
22,65	204
23,15	170
23,65	147
24,15	131
24,65	119
25,15	109
25,65	102
25,85	100

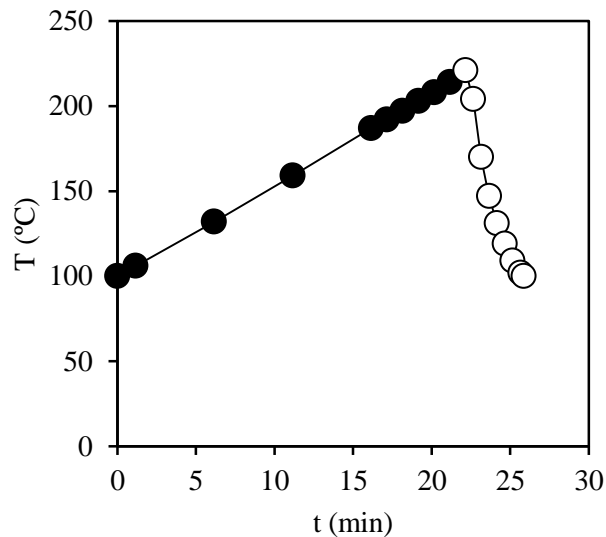


Figura A.1.12 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido nítrico ($T_{\text{máxima}}$: 220°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min)

Pretratamiento con ácido nítrico ($T_{\text{máxima}}$: 220°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,35^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 1,000$
$b = 55,417^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 8891$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 220^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 0$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -2987,8^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,995$
$b = 640,24^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 1255$
$c = -35,608^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 0,5982^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 10147$	$\log R_0 = 4,01$

A.2 Optimización de la hidrólisis con ácido sulfúrico (0,01 M y 0,025 M): influencia de la temperatura y el tiempo de hidrólisis

A.2.1 Diseño experimental DE1

A.2.1.1 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,010 M) a 172°C mantenidos durante 5 minutos

Tabla A.2.1.1 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,01 M) $T_{\text{máxima}}$: 172°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
2,29	111
7,29	137
12,29	164
13,29	169
13,62	172
14,29	173
14,59	171
15,29	170
15,59	172
16,29	174
16,59	172
17,29	173
17,59	172
18,29	171
18,59	172
18,62	173
19,29	163
19,59	137
20,29	120
20,59	106
21,01	100

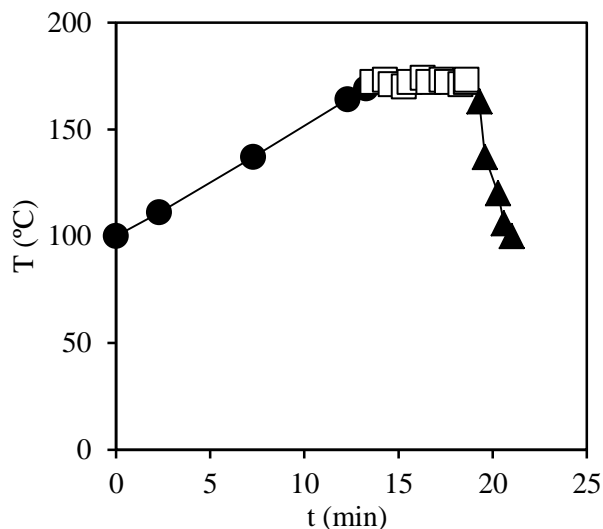


Figura A.2.1.1 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 172°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 172°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Región de calentamiento ($T = a + b t$)

$$a = 99,317^{\circ}\text{C} \quad r^2 = 0,9996$$

$$b = 5,2706^{\circ}\text{C}/\text{min} \quad R_0 = 347$$

Región de mantenimiento ($T = a$)

$$a = 172^{\circ}\text{C} \quad R_0 = 659$$

Región de enfriamiento ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)

$$a = -61216^{\circ}\text{C} \quad r^2 = 0,9743$$

$$b = 9396,8^{\circ}\text{C}/\text{min} \quad R_0 = 73$$

$$c = -477,56^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$$

$$d = 8,0537^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$$

$$(R_0)_{\text{total}} = 1079$$

$$\log R_0 = 3,03$$

A.2.1.2 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,01 M) a 180 °C mantenidos durante 2 minutos

Tabla A.2.1.2 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,01 M) $T_{\text{máxima}}$: 180°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 2 min	
t , min	T , °C
0,00	100
20,38	106
25,38	132
30,38	158
34,58	180
34,68	180
35,38	182
35,68	182
36,38	184
36,58	183
36,68	183
37,38	167
37,68	142
38,38	123
38,68	109
39,25	100

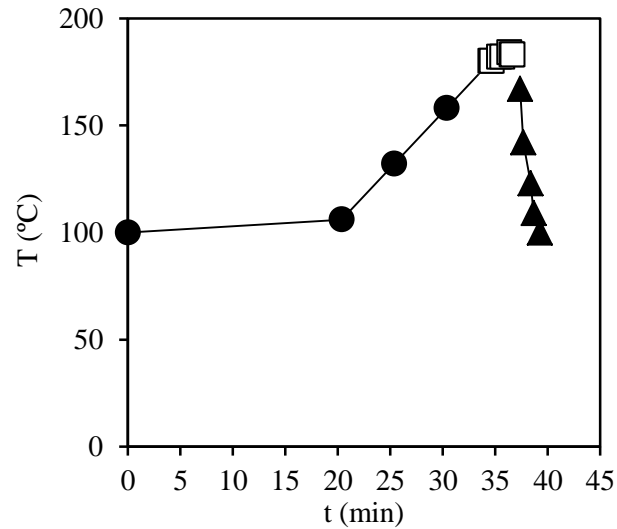


Figura A.2.1.2 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 180°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 2 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 180°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 2 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 87,477^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,7289$
$b = 2,1551^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 458$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 180^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 453$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -363189^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9872$
$b = 28903^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 365$
$c = -765,24^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 6,7435^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 1277$	$\log R_0 = 3,11$

A.2.1.3 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,010 M) a 180 °C mantenidos durante 8 minutos

Tabla A.2.1.3 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,01 M) $T_{\text{máxima}}$: 180°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 8 min	
t , min	T , °C
0,00	100
1,41	109
6,41	137
11,41	164
13,71	177
13,97	180
14,41	180
14,71	182
15,41	181
15,71	180
16,41	180
16,71	181
17,41	180
17,71	177
18,41	178
18,71	180
19,41	182
19,71	180
20,41	179
20,71	180
21,41	181
21,71	179
21,97	179
22,41	180
22,71	161
23,41	137
23,71	120
24,41	107
24,62	100

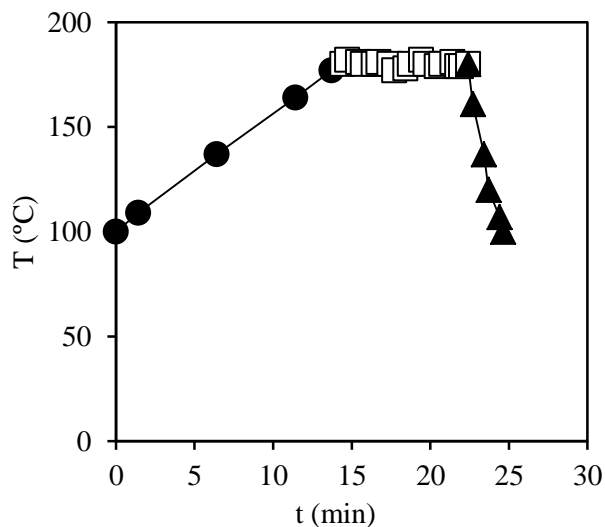


Figura A.2.1.3 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 180°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 8 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 180°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 8 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 100,67^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9994$
$b = 5,5822^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 646$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 180^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 1814$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -37201^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,8811$
$b = -4465,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 58$
$c = 180,04^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = -2,4322^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 2518$	$\log R_0 = 3,40$

A.2.1.4 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,010 M) a 200 °C mantenidos durante 0,45 minutos

Tabla A.2.1.4 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,01 M) $T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0,45 min	
t , min	T , °C
0,00	100
4,84	130
9,84	157
14,84	182
18,25	200
18,84	201
19,10	202
19,14	203
19,84	189
20,14	153
20,84	132
21,14	117
21,84	106
22,00	100

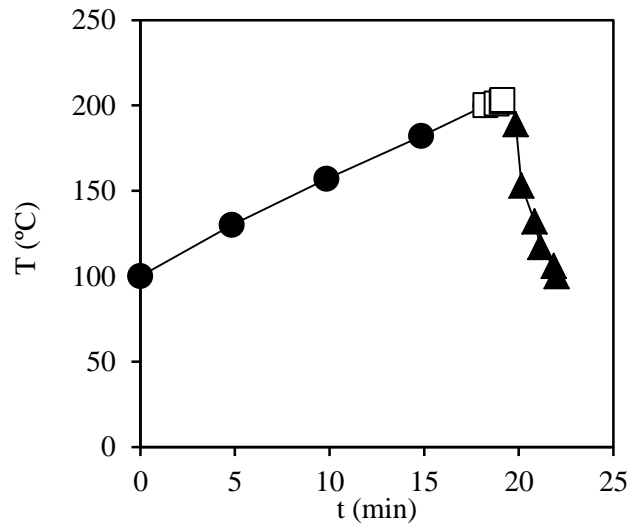


Figura A.2.1.4 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0,45 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0,45 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 101,97^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9983$
$b = 5,4246^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2555$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 748$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -58473^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9796$
$b = -8750,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 522$
$c = -432,81^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 7,0948^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 3825$	$\log R_0 = 3,85$

A.2.1.5 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,010 M) a 200 °C mantenidos durante 5 minutos

Tabla A.2.1.5 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,010 M) $T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
0,96	105
5,96	130
10,96	155
15,96	182
19,47	200
19,96	201
20,26	202
20,96	202
21,26	202
21,96	202
22,26	201
22,96	200
23,26	201
23,96	202
24,26	200
24,47	200
24,96	200
25,26	176
25,96	148
26,26	129
26,96	115
27,26	105
27,70	100

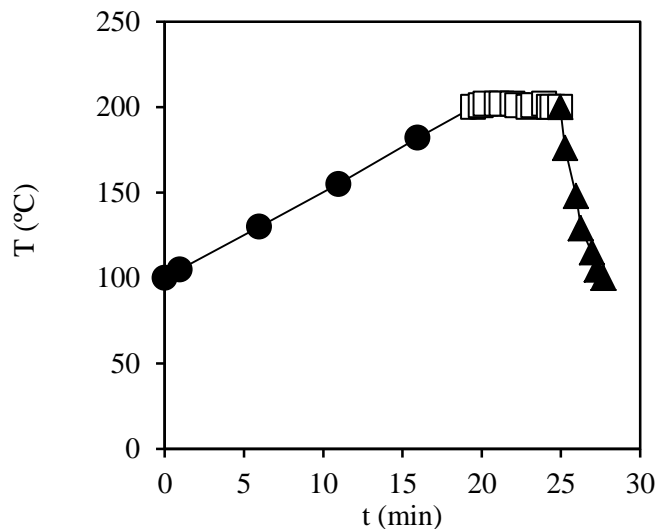


Figura A.2.1.5 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,734^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9998$
$b = 5,1322^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2471$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 4399$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -90121^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,8811$
$b = 10572^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 58$
$c = -410,91^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 5,3003^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 7119$	$\log R_0 = 3,85$

A.2.1.6 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,010 M) a 200 °C mantenidos durante 5 minutos

Tabla A.2.1.6 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,010 M) $T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
1,60	108
6,60	135
11,60	163
16,60	189
17,60	194
18,16	200
18,60	200
18,90	201
19,60	200
19,90	200
20,60	200
20,90	199
21,60	201
21,90	202
22,60	201
22,90	201
23,16	200
23,60	164
23,90	149
24,60	131
24,90	117
25,60	107
25,83	100

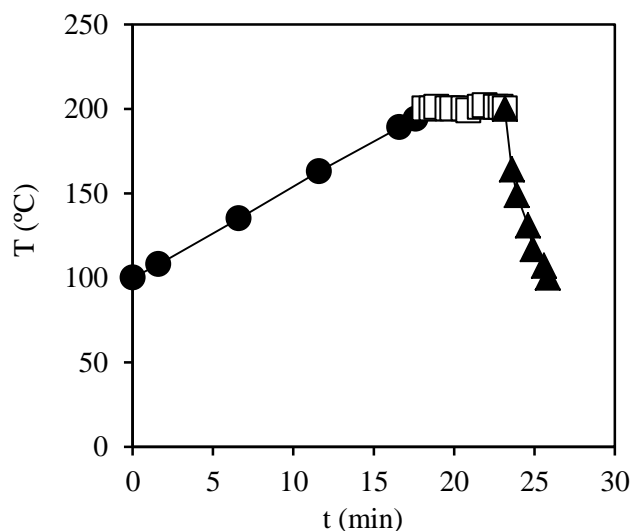


Figura A.2.1.6 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,554^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9995$
$b = 5,4341^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2119$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 4399$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = 115174^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9941$
$b = -13762^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 79$
$c = 549,39^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = -7,3207^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 6597$	$\log R_0 = 3,82$

A.2.1.7 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,010 M) a 200 °C mantenidos durante 5 minutos

Tabla A.2.1.7 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,010 M) $T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
1,35	107
6,35	133
11,35	160
16,35	187
18,73	200
19,35	201
19,65	202
20,35	203
20,65	203
21,35	200
21,65	200
22,35	202
22,65	202
23,35	200
23,65	201
23,73	201
24,35	201
24,65	169
25,35	145
25,65	128
26,35	115
26,65	106
27,12	100

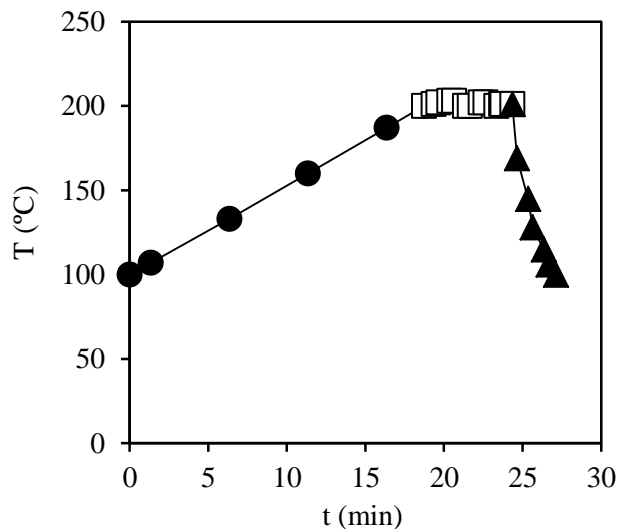


Figura A.2.1.7 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,652^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9999$
$b = 5,3406^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2378$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 4399$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -132324^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9732$
$b = 15927^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 276$
$c = -636,27^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 8,4458^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 7053$	$\log R_0 = 3,85$

A.2.1.8 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,010 M) a 200 °C mantenidos durante 9,14 minutos

Tabla A.2.1.8 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,01 M) $T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 9,14 min	
t , min	T , °C
0,00	100
3,65	119
8,65	145
13,65	172
18,65	197
18,93	200
19,65	202
19,95	201
20,65	202
20,95	202
21,65	201
21,95	200
22,65	201
22,95	200
23,65	199
23,93	200
24,65	200
24,95	199
25,65	200
25,95	197
26,65	197
26,95	198
27,65	199
27,95	200
28,07	201
28,65	197
28,95	169
29,65	144
29,95	127
30,65	114
30,95	105
31,39	100

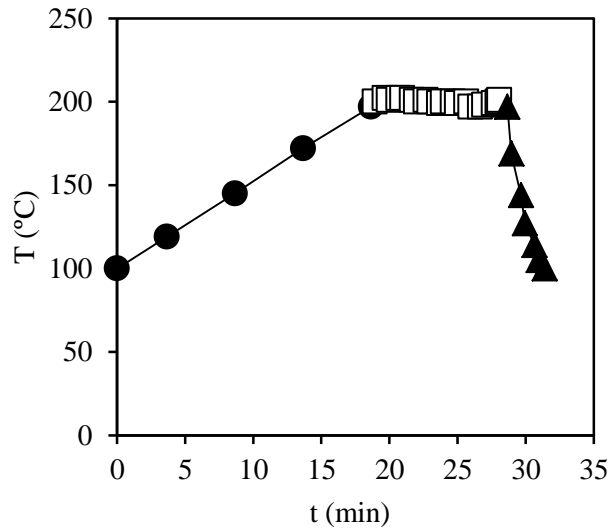


Figura A.2.1.8 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 9,14 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 9,14 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,885^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9998$
$b = 5,2525^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2358$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 8041$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -106924^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9817$
$b = 11018^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 216$
$c = -376,4^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 4,2692^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 10616$	$\log R_0 = 4,03$

A.2.1.9 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,01 M) a 220 °C mantenidos durante 2 minutos

Tabla A.2.1.9 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,010 M) $T_{\text{máxima}}$: 220°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 2 min	
t , min	T , °C
0,00	100
3,75	118
8,75	143
13,75	169
18,75	195
23,33	220
23,75	220
24,75	222
25,05	220
25,33	218
25,75	209
26,05	208
26,75	201
27,05	199
27,75	191
28,05	162
28,75	145
29,05	128
29,75	116
30,05	107
30,66	100

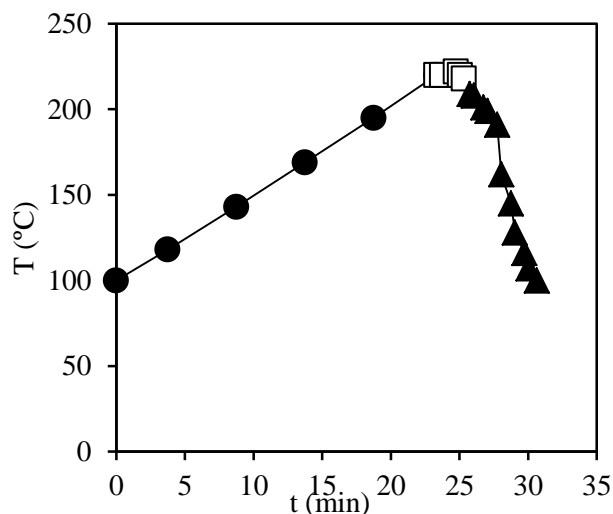


Figura A.2.1.9 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 220°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 2 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico

($T_{\text{máxima}}$: 220°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 2 min)

Región de calentamiento ($T = a + b t$)

$$a = 98,91^{\circ}\text{C} \quad r^2 = 0,9996$$

$$b = 5,1447^{\circ}\text{C}/\text{min} \quad R_0 = 9106$$

Región de mantenimiento ($T = a$)

$$a = 220^{\circ}\text{C} \quad R_0 = 6828$$

Región de enfriamiento ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)

$$a = -34991^{\circ}\text{C} \quad r^2 = 0,9824$$

$$b = 3777,5^{\circ}\text{C}/\text{min} \quad R_0 = 3673$$

$$c = -134,12^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$$

$$d = 1,5735^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$$

$$(R_0)_{\text{total}} = 19607$$

$$\log R_0 = 4,29$$

A.2.1.10 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,010 M) a 220 °C mantenidos durante 8 minutos

Tabla A.2.1.10 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,010 M) $T_{\text{máxima}}$: 220°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 8 min	
t , min	T , °C
0,00	100
2,04	111
7,04	137
12,04	164
17,04	189
22,04	213
23,21	220
23,34	221
24,04	222
24,34	219
25,04	219
25,34	221
26,04	223
26,34	222
27,04	221
27,34	222
28,04	221
28,34	219
29,04	220
29,34	222
30,04	222
30,34	221
31,04	221
31,21	222
32,04	201
32,34	164
33,04	142
33,34	125
34,04	113
34,34	104
34,69	100

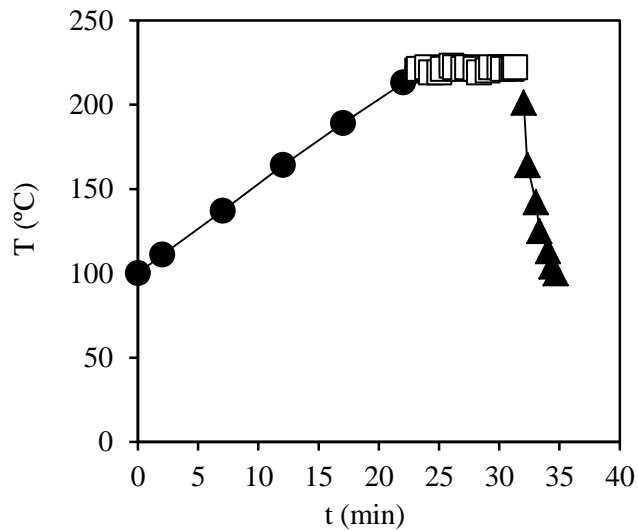


Figura A.2.1.10 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 220°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 8 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 220°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 8 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 100,67^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9997$
$b = 5,1467^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 9867$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 220^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 27311$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -108872^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9977$
$b = 10217^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 563$
$c = -317,54^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 3,274^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 39235$	$\log R_0 = 4,59$

A.2.1.11 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,010 M) a 228 °C mantenidos durante 5 minutos

Tabla A.2.1.11 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,01 M) $T_{\text{máxima}}$: 228°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
0,62	103
5,62	128
10,62	154
15,62	180
20,62	206
25,00	228
25,62	229
25,92	230
26,62	230
26,92	231
27,62	228
27,92	227
28,62	229
28,92	230
29,62	229
29,92	228
30,00	228
30,62	276
30,92	198
31,62	167
31,92	146
32,62	130
32,92	119
33,62	111
33,92	105
34,62	100

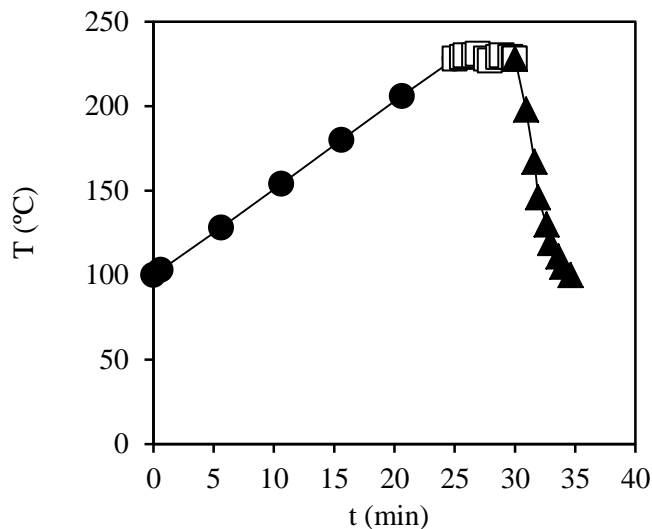


Figura A.2.1.11 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 228°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 228°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,67^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 1,000$
$b = 5,1384^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 17005$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 228^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 29360$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -90159^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,8811$
$b = 8682,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 7395$
$c = -276,52^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 2,9185^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 53760$	$\log R_0 = 4,73$

A.2.1.12 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,010 M) a 200 °C mantenidos durante 5 minutos (OPT-PT2)

Tabla A.2.1.12 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,010 M) $T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
3,52	119
8,52	146
13,52	173
18,00	200
18,52	200
19,02	199
19,52	199
20,02	199
20,52	200
21,02	200
21,52	201
22,02	199
22,52	198
23,00	198
23,02	199
23,52	195
24,02	163
24,52	140
25,02	127
25,52	120
26,02	115
26,52	111
27,02	107
27,52	103
28,02	100

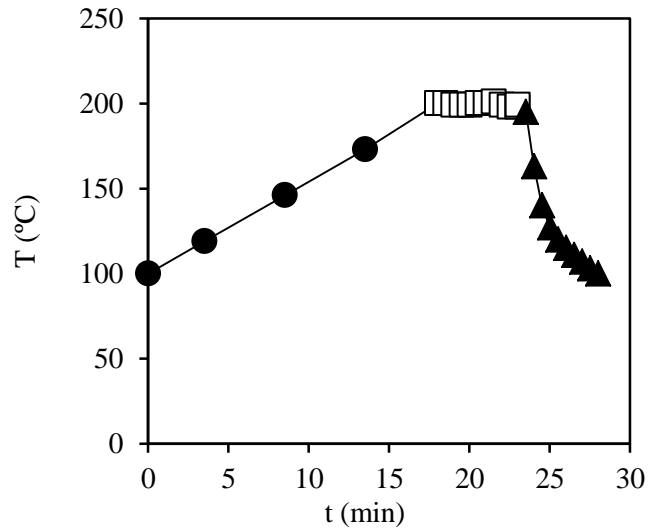


Figura A.2.1.12 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico

($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Región de calentamiento ($T = a + b t$)

$$a = 99,488^{\circ}\text{C} \quad r^2 = 0,9995$$

$$b = 5,5225^{\circ}\text{C}/\text{min} \quad R_0 = 2180$$

Región de mantenimiento ($T = a$)

$$a = 200^{\circ}\text{C} \quad R_0 = 4399$$

Región de enfriamiento ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)

$$a = 8452,3^{\circ}\text{C} \quad r^2 = 0,9792$$

$$b = -819,26^{\circ}\text{C}/\text{min} \quad R_0 = 396$$

$$c = 26,549^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$$

$$d = -0,2836^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$$

$$(R_0)_{\text{total}} = 6974 \quad \log R_0 = 3,84$$

A.2.2 Diseño experimental DE2

A.2.2.1 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 172°C mantenidos durante 5 minutos

Tabla A.2.1.1 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 172°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
0,50	102
5,50	132
10,50	161
12,52	172
12,80	174
13,50	171
13,80	167
14,50	167
14,80	169
15,50	171
15,80	173
16,50	175
16,80	174
17,50	170
17,52	170
17,80	162
18,50	139
18,80	120
19,50	106
19,66	100

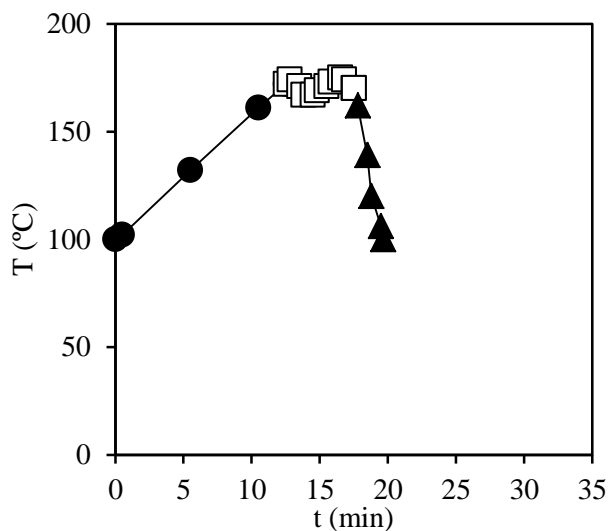


Figura A.2.1.1 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 172°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 172°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,688^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9998$
$b = 5,8083^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 344$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 172^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 659$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -54941^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9921$
$b = 9029,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 53$
$c = -491,07/\text{min}^2$	
$d = 8,8611^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 1056$	$\log R_0 = 3,02$

A.2.2.2 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 180 °C mantenidos durante 2 minutos

Tabla A.2.2.2	
Evolución de temperaturas	
Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico	
(0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 180°C,	
$t_{\text{mantenimiento}}$: 2 min	
t , min	T , °C
0,00	100
1,35	107
6,35	134
11,35	161
15,45	180
16,35	179
16,65	178
17,45	180
17,65	176
18,35	148
18,65	126
19,35	111
19,60	100

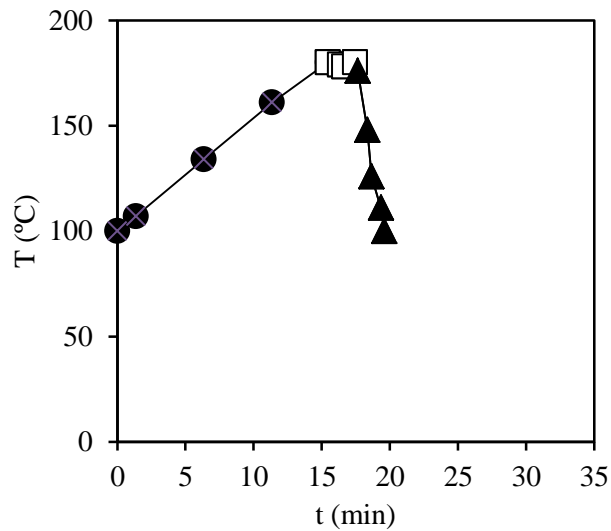


Figura A.2.2.2 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 180°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 2 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico	
($T_{\text{máxima}}$: 180°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 2 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 100.3^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0.9993$
$b = 5.2319^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 690$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 180^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 453$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -47390^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0.9883$
$b = 7865.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 115$
$c = -431.22^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 7.8346/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 1258$	$\log R_0 = 3,10$

A.2.2.3 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 180 °C mantenidos durante 8 minutos

Tabla A.2.2.3 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 180°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 8 min	
t , min	T , °C
0,00	100
0,37	102
5,37	128
10,37	155
14,77	180
15,37	181
15,67	179
16,37	178
16,67	179
17,37	181
17,67	180
18,37	179
18,67	180
19,37	181
19,67	179
20,37	179
20,67	180
21,37	179
21,67	176
22,37	176
22,67	177
22,77	178
23,37	175
23,67	148
24,37	127
24,67	111
25,31	100

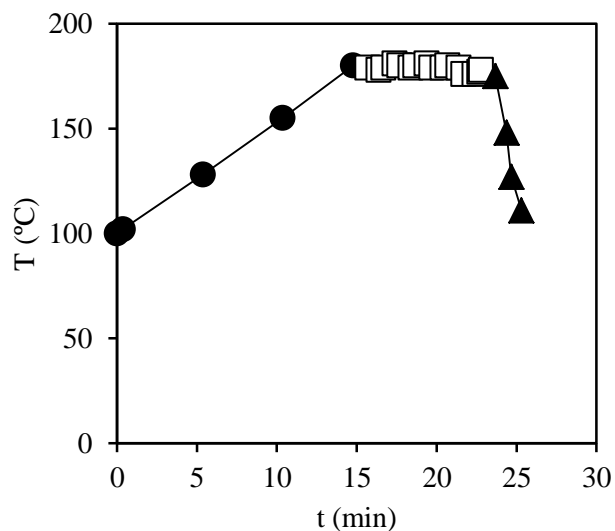


Figura A.2.2.3 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 180°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 8 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 180°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 8 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,699^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9997$
$b = 5,392^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 593$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 180^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 1814$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -140659^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9760$
$b = 17674^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 94$
$c = -737,55^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 10,232^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 2501$	$\log R_0 = 3,40$

A.2.2.4 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 200 °C mantenidos durante 0,45 minutos

Tabla A.2.2.4 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0,45 min	
t , min	T , °C
0,00	100
1,35	107
6,35	132
11,35	157
16,35	183
19,57	200
20,42	203
20,65	197
21,35	143
21,65	129
22,33	100

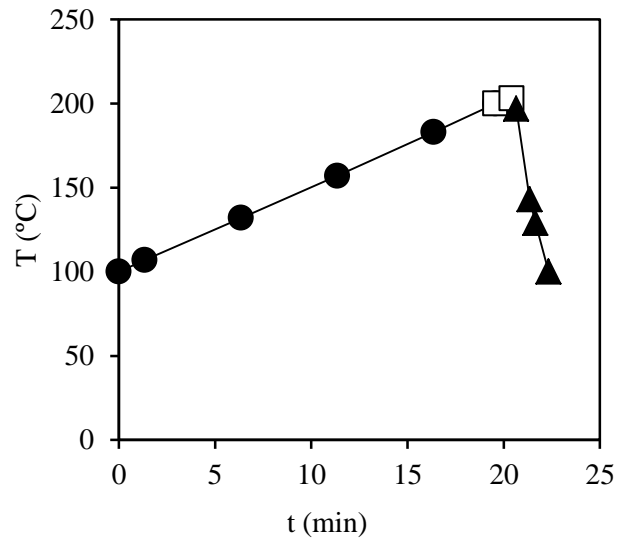


Figura A.2.2.3 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 180°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 8 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0,45 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,848^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9999$
$b = 5,0921^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2464$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 180^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 748$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -187011^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9959$
$b = 26586^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 260$
$c = -1255,3^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 19,702^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 3472$	$\log R_0 = 3,54$

A.2.2.5 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 200 °C mantenidos durante 5 minutos

Tabla A.2.2.5 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
0,19	101
5,19	126
10,19	153
15,19	180
19,22	200
20,19	204
20,49	205
21,19	188
21,49	161
22,19	162
22,49	152
23,19	154
23,49	158
24,19	162
24,22	
24,49	166
25,19	171
25,49	171
26,19	158
26,49	143
27,19	130
27,49	118
28,19	109
28,49	103
28,91	100

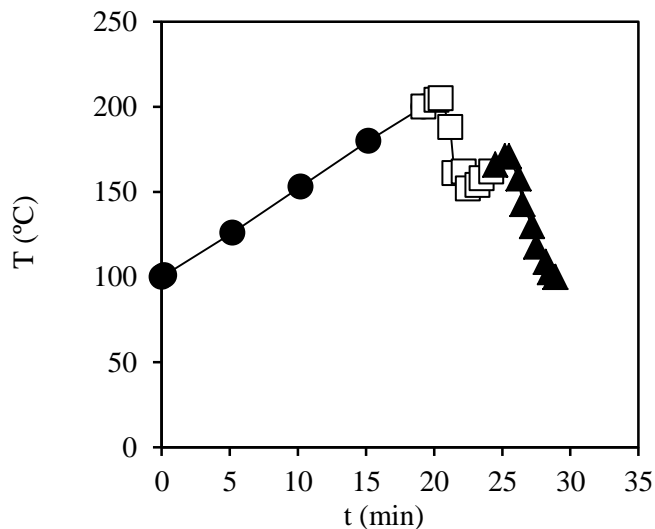


Figura A.2.2.5 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico

($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Región de calentamiento ($T = a + b t$)

$$a = 99,737^{\circ}\text{C}$$

$$r^2 = 0,9998$$

$$b = 5,2336^{\circ}\text{C}/\text{min}$$

$$R_0 = 2535$$

Región de mantenimiento ($T = a$)

$$a = 200^{\circ}\text{C}$$

$$R_0 = 4399$$

Región de enfriamiento ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)

$$a = -48661^{\circ}\text{C}$$

$$r^2 = 0,9925$$

$$b = 5497,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$$

$$R_0 = 231$$

$$c = -205,4^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$$

$$d = 2,5452^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$$

$$(R_0)_{\text{total}} = 7165$$

$$\log R_0 = 3,86$$

A.2.2.6 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 200 °C mantenidos durante 5 minutos

Tabla A.2.2.6 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
5,00	125
10,00	151
15,00	178
19,28	200
20,00	201
20,30	201
21,00	200
21,30	201
22,00	202
22,30	200
23,00	198
23,30	199
24,00	200
24,28	201
24,30	201
25,00	178
25,30	152
26,00	131
26,30	115
27,00	103
27,10	100

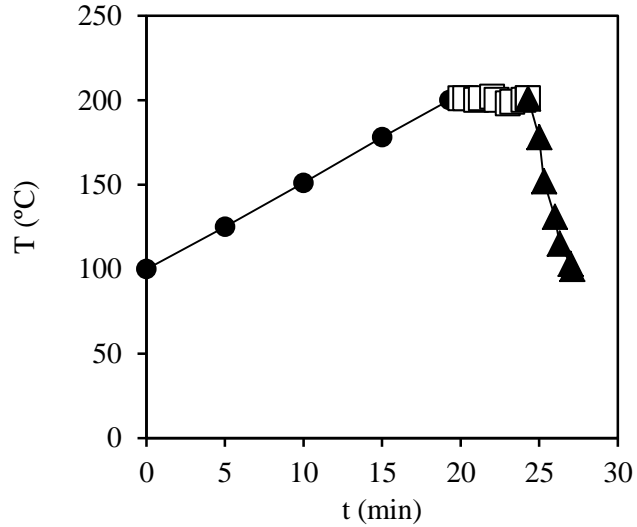


Figura A.2.2.6 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,453^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9998$
$b = 5,2097^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2473$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 4399$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -70952^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9925$
$b = 8528,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 319$
$c = -339,04^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 4,4683^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 7192$	$\log R_0 = 3,86$

A.2.2.7 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 200 °C mantenidos durante 5 minutos

Tabla A.2.2.7 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
0,77	104
5,77	130
10,77	155
15,77	181
19,23	200
20,77	202
21,07	203
21,77	193
22,07	190
22,77	191
23,07	193
23,77	195
24,07	197
24,23	198
24,77	198
25,07	182
25,77	150
26,07	132
26,77	116
27,07	104
27,38	100

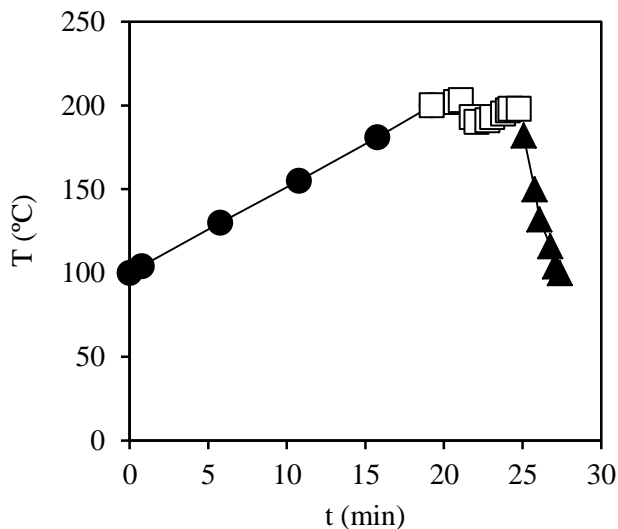


Figura A.2.2.7 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico

($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Región de calentamiento ($T = a + b t$)

$$a = 99,917^{\circ}\text{C}$$

$$r^2 = 0,9999$$

$$b = 5,171^{\circ}\text{C}/\text{min}$$

$$R_0 = 2402$$

Región de mantenimiento ($T = a$)

$$a = 200^{\circ}\text{C}$$

$$R_0 = 4399$$

Región de enfriamiento ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)

$$a = -118381^{\circ}\text{C}$$

$$r^2 = 0,9911$$

$$b = 13893^{\circ}\text{C}/\text{min}$$

$$R_0 = 731$$

$$c = -540,88^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$$

$$d = 6,9948^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$$

$$(R_0)_{\text{total}} = 7532$$

$$\log R_0 = 3,88$$

A.2.2.8 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 200 °C mantenidos durante 9,14 minutos

Tabla A.2.2.8	
Evolución de temperaturas	
Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico	
(0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 200°C,	
$t_{\text{mantenimiento}}$: 9,14 min	
t , min	T , °C
0,00	100
0,19	101
5,19	126
10,19	152
15,19	178
19,44	200
20,19	202
20,49	203
21,19	202
21,49	202
22,19	200
22,49	200
23,19	202
23,49	201
24,19	201
24,49	201
25,19	200
25,49	200
26,19	201
26,49	201
27,19	199
27,49	198
28,19	200
28,49	199
28,58	198
29,19	179
29,49	172
30,19	146
30,49	126
31,19	112
31,49	104
31,77	100

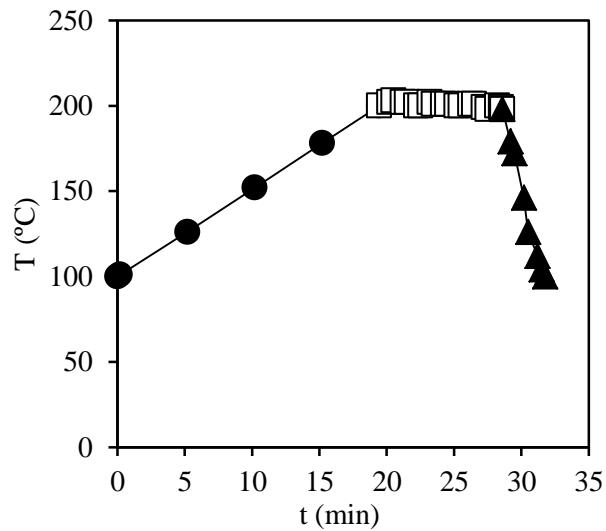


Figura A.2.2.7 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 9,14 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico	
($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 9,14 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,786^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9999$
$b = 5,1451^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2489$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 8041$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -89960^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9911$
$b = 9106,8^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 731$
$c = -305,43^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 3,3999^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 11029$	$\log R_0 = 4,04$

A.2.2.9 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 220 °C mantenidos durante 2 minutos

Tabla A.2.2.9 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 220°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 2 min	
t , min	T , °C
0,00	100
1,48	108
6,48	134
11,48	161
16,48	189
21,48	214
22,68	220
22,78	220
23,48	222
23,78	225
24,48	224
24,68	224
24,78	221
25,48	200
25,78	171
26,48	145
26,78	128
27,48	114
27,78	104
28,09	100

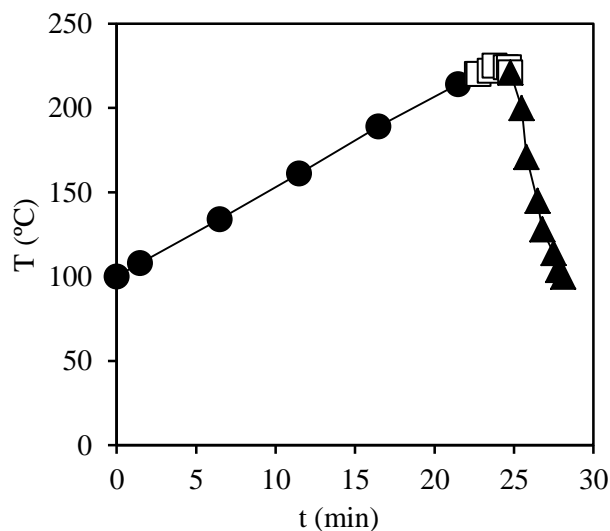


Figura A.2.2.9 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 220°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 2 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 220°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 2 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 100,05^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9998$
$b = 5,3153^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 9867$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 220^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 6828$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -55013^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9922$
$b = 6496,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 1870$
$c = -253^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 3,2601^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 18565$	$\log R_0 = 4,27$

A.2.2.10 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 220 °C mantenidos durante 8 minutos

Tabla A.2.2.10 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{máxima}$: 220°C, $t_{mantenimiento}$: 8 min	
t , min	T , °C
0,00	100
1,73	109
6,73	135
11,73	162
16,73	188
21,73	212
23,19	220
23,73	221
24,03	223
24,73	219
25,03	218
25,73	220
26,03	221
26,73	223
27,03	223
27,73	223
28,03	224
28,73	220
29,03	216
29,73	216
30,03	218
30,73	219
31,03	220
31,19	221
31,73	222
32,03	202
32,73	166
33,03	144
33,73	128
34,03	116
34,73	107
34,99	100

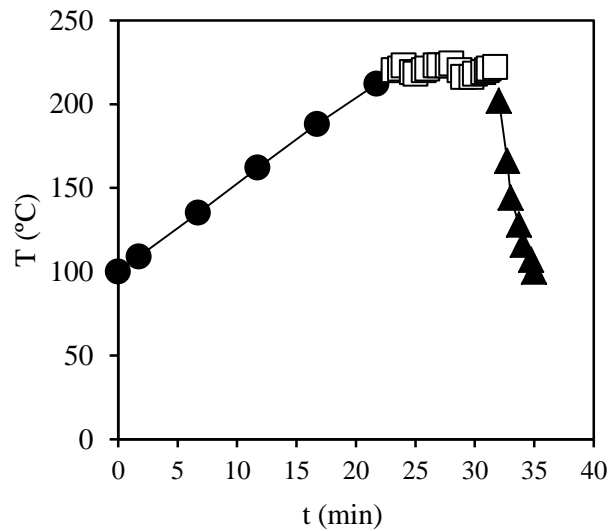


Figura A.2.2.10 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{máxima}$: 220°C, $t_{mantenimiento}$: 8 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{máxima}$: 220°C, $t_{mantenimiento}$: 8 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 100,33^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9998$
$b = 5,1774^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 9989$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 220^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 27311$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -200439^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9853$
$b = 18472^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 4407$
$c = -339,04^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 5,7524^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{total} = 41707$	$\log R_0 = 4,62$

A.2.2.11 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 228 °C mantenidos durante 5 minutos

Tabla A.2.2.11 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 228°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
1,54	108
6,54	133
11,54	160
16,54	187
21,54	212
24,57	228
25,84	228
26,54	228
26,84	229
27,54	228
27,84	228
28,54	228
28,84	227
29,54	227
29,57	227
29,84	215
30,54	177
30,84	152
31,54	134
31,84	120
32,54	109
32,84	101
32,96	100

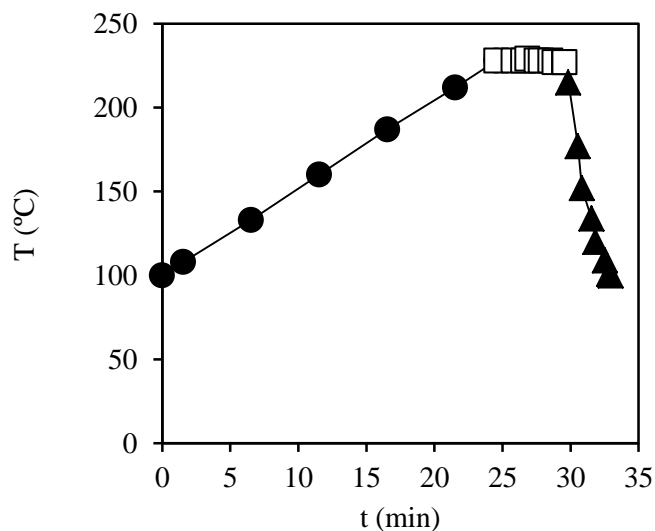


Figura A.2.2.11 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 228°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 228°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,751^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9999$
$b = 5,2236^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 16688$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 228^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 29360$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = 10250^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9948$
$b = -633,31^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 1571$
$c = 10,699^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = -0,0251^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 47620$	$\log R_0 = 4,68$

A.2.2.12 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 195 °C mantenidos durante 5 minutos (OPT-PT3)

Tabla A.2.1.12 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 195°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
0,96	105
5,96	131
10,96	157
15,96	183
16,96	188
17,96	193
18,15	195
18,46	195
18,96	197
19,46	197
19,96	195
20,46	195
20,96	192
21,46	193
21,96	194
22,46	196
22,96	197
23,15	197
23,46	196
23,96	182
24,46	161
24,96	142
25,46	126
25,96	114
26,46	103
26,65	100

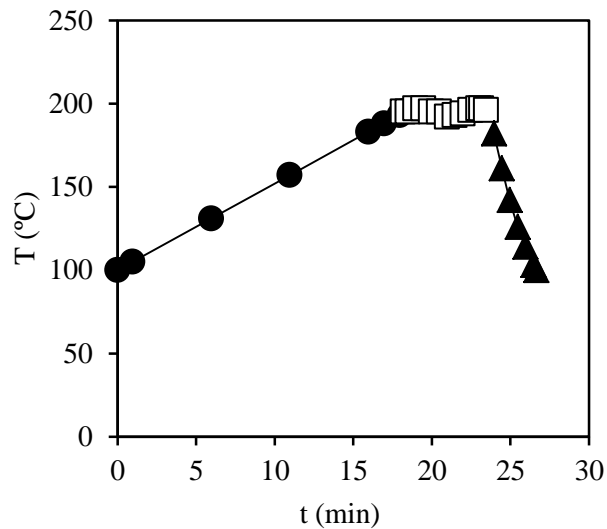


Figura A.2.2.12 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 195°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,995^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9999$
$b = 5,2012^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 1706$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 195^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 3134$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -47223^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9977$
$b = 5814^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 563$
$c = -236,27^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 3,1799^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 5403$	$\log R_0 = 3,73$

A.3 Optimización de la hidrólisis con ácido sulfúrico: influencia de la concentración de ácido y la carga de hueso

A.3.1 Pretratamiento con H₂SO₄ a 200°C mantenidos durante 5 minutos (29,03 g, 0,020M (0,-1,4)

Tabla A.3.1 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con H ₂ SO ₄ <i>T</i> _{máxima} : 200°C, <i>t</i> _{mantenimiento} : 5 min	
<i>t</i> , min	<i>T</i> , °C
0.00	100
3.49	115
8.49	140
13.49	167
18.49	193
19.49	198
19.70	200
19.99	200
20.49	200
20.99	200
21.49	200
21.99	200
22.49	201
22.99	200
23.49	199
23.99	200
24.49	200
24.70	199
25.49	196
25.99	164
26.49	121
26.99	107
27.01	100

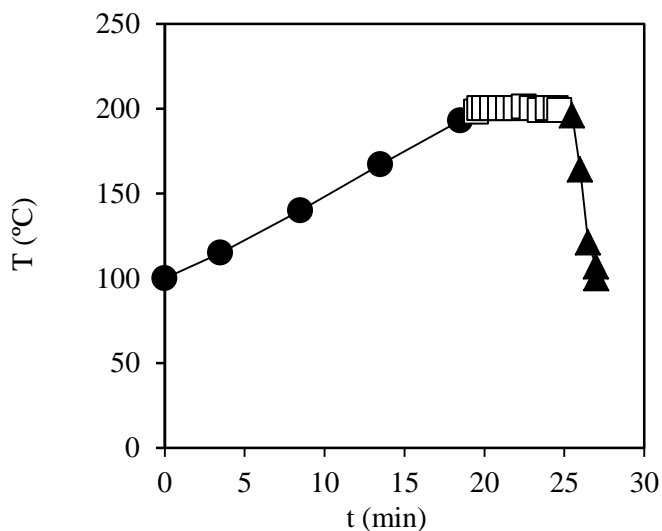


Figura A.3.1 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con H₂SO₄ (*T*_{máxima}: 200°C, *t*_{mantenimiento}: 5min)

Pretratamiento con H₂SO₄ (<i>T</i>_{máxima}: 200°C, <i>t</i>_{mantenimiento}: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 98.277^\circ\text{C}$	$r^2 = 0.9992$
$b = 5.0959^\circ\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2164$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^\circ\text{C}$	$R_0 = 4399$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -328964^\circ\text{C}$	$r^2 = 0.989$
$b = 38011^\circ\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 6778$
$c = -1460.5^\circ\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 18.671^\circ\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 13340$	$\log R_0 = 4,13$

A.3.2 Pretratamiento con H₂SO₄ a 200°C mantenidos durante 5 minutos (50 g, 0,030 M (+1,-1))

Tabla A.3.2 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con H ₂ SO ₄ <i>T</i> _{máxima} : 200°C, <i>t</i> _{mantenimiento} : 5 min	
<i>t</i> , min	<i>T</i> , °C
0.00	100
0.90	103
5.90	129
10.90	156
15.90	182
16.90	187
17.90	191
18.90	196
19.32	200
19.90	201
20.40	199
20.90	199
21.40	200
21.90	200
22.40	199
22.90	200
23.40	201
23.90	200
24.40	199
24.32	199
24.90	192
25.40	162
25.90	140
26.40	123
26.90	110
27.40	101
27.90	100

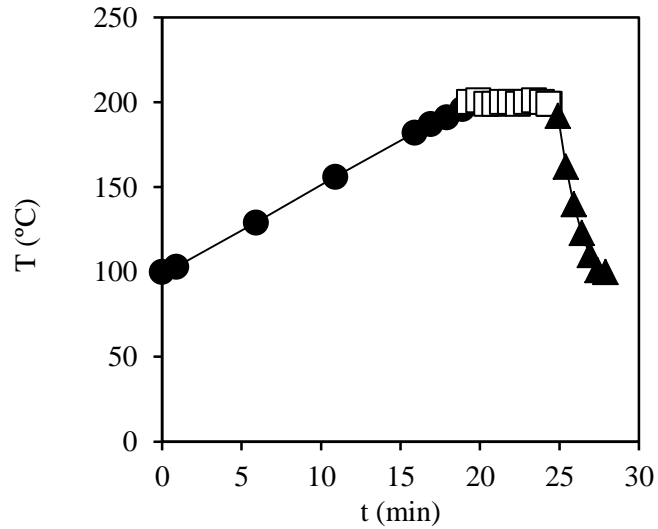


Figura A.3.2 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con H₂SO₄ (*T*_{máxima}: 200°C, *t*_{mantenimiento}: 5min)

Pretratamiento con H₂SO₄ (<i>T</i>_{máxima}: 200°C, <i>t</i>_{mantenimiento}: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99.096^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0.9996$
$b = 5.1785^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2365$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 4399$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -66369^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0.9917$
$b = 7859.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 561$
$c = -307.78^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 3.996^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 7324$	$\log R_0 = 3,86$

A.3.3 Pretratamiento con H₂SO₄ a 200°C mantenidos durante 5 minutos (100 g, 0,006 M (-1,4,0))

Tabla A.3.3 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con agua $T_{\text{máxima}}$: 205°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min	
t , min	T , °C
0.00	100
1.57	106
6.57	131
11.57	157
16.57	184
17.57	190
18.57	195
19.10	200
19.57	200
20.07	200
20.57	200
21.07	199
21.57	200
22.07	200
22.57	199
23.07	200
23.57	201
24.07	200
24.10	199
24.57	198
25.07	172
25.57	149
26.07	131
26.57	118
27.07	107
27.10	100

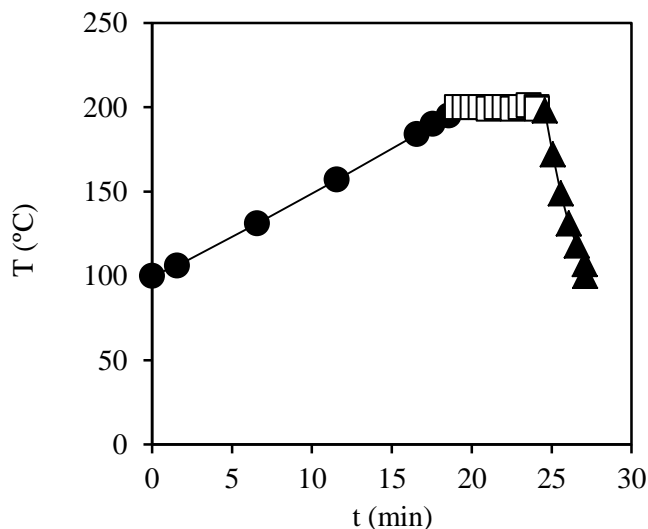


Figura A.3.3 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con agua ($T_{\text{máxima}}$: 205°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min)

Pretratamiento con agua ($T_{\text{máxima}}$: 205°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 0 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 98.093^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0.9989$
$b = 5.2257^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2154$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 205^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 4399$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -84451^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0.9905$
$b = 10020^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 248$
$c = -393.85^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 5.1374^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 6801$	$\log R_0 = 3,83$

A.3.4 Pretratamiento con H₂SO₄ a 200°C mantenidos durante 5 minutos (100 g, 0,020 M (0,0)1

Tabla A.3.4 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con agua $T_{\text{máxima}}: 205^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$	
t , min	T , °C
0.00	100
1.92	109
6.92	135
7.92	141
8.92	145
9.92	150
11.92	160
16.92	185
17.92	190
18.92	196
19.39	200
19.92	200
20.33	200
20.92	200
21.42	201
21.92	200
22.42	200
22.92	201
23.42	200
23.92	197
24.42	198
24.39	198
24.92	199
25.42	171
25.92	149
26.42	133
26.92	120
27.42	109
27.92	101
27.99	100

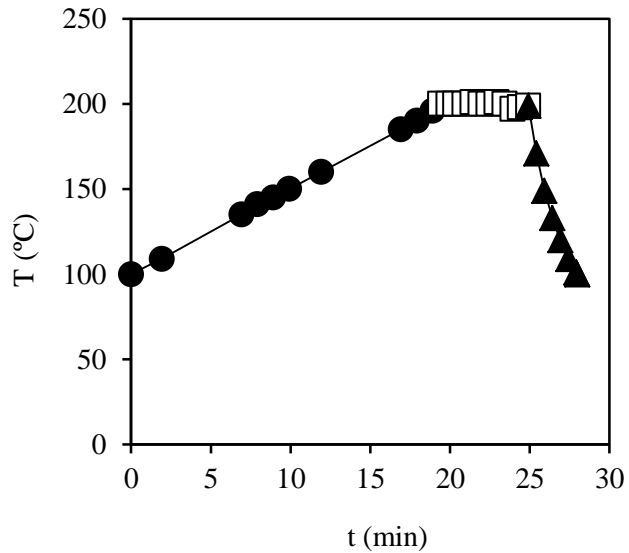


Figura A.3.4 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con agua ($T_{\text{máxima}}: 205^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$)

Pretratamiento con agua ($T_{\text{máxima}}: 205^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99.818^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0.9995$
$b = 5.0728^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2713$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 205^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 4399$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = 34013^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0.9999$
$b = -3584.8^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 265$
$c = 126.87^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = -1.5034^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 7377$	$\log R_0 = 3,87$

A.3.5 Pretratamiento con H₂SO₄ a 200°C mantenidos durante 5 minutos (100 g, 0,020 M (0,0)2

Tabla A.3.5 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con H ₂ SO ₄ $T_{\text{máxima}}: 200^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 5 \text{ min}$	
t , min	T , °C
0.00	100
1.85	110
6.85	132
11.85	160
16.85	187
17.85	192
18.85	197
19.19	200
19.85	201
20.35	199
20.85	199
21.35	201
21.85	199
22.35	199
22.85	200
23.35	200
23.85	201
24.35	199
24.19	199
24.85	186
25.35	162
25.85	143
26.35	125
26.85	111
27.35	101
27.19	100
0.00	100

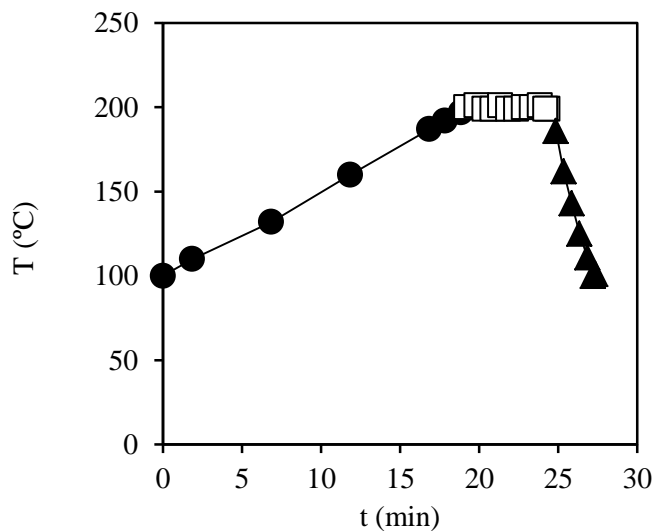


Figura A.3.5 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con H₂SO₄ ($T_{\text{máxima}}: 200^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 5 \text{ min}$)

Pretratamiento con H₂SO₄

($T_{\text{máxima}}: 200^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 5 \text{ min}$)

Región de calentamiento ($T = a + b t$)

$$a = 99.129^{\circ}\text{C}$$

$$r^2 = 0.999$$

$$b = 5.1985^{\circ}\text{C}/\text{min}$$

$$R_0 = 2315$$

Región de mantenimiento ($T = a$)

$$a = 200^{\circ}\text{C}$$

$$R_0 = 4399$$

Región de enfriamiento ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)

$$a = -65244^{\circ}\text{C}$$

$$r^2 = 0.9975$$

$$b = 7724.7^{\circ}\text{C}/\text{min}$$

$$R_0 = 487$$

$$c = -302.51^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$$

$$d = 3.9279^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$$

$$(R_0)_{\text{total}} = 7201$$

$$\log R_0 = 3.86$$

A.3.6 Pretratamiento con H₂SO₄ a 200°C mantenidos durante 5 minutos

100 g, 0,020 M (0,0)3

Tabla A.3.6 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con H ₂ SO ₄ <i>T</i> _{máxima} : 200°C, <i>t</i> _{mantenimiento} : 5 min	
<i>t</i> , min	<i>T</i> , °C
0.00	100
5.00	127
10.00	155
15.00	182
16.00	187
17.00	193
18.00	198
18.23	200
18.50	200
19.00	199
19.50	199
20.00	200
20.50	198
21.00	200
21.50	201
22.00	200
22.50	199
23.00	200
23.23	199
23.50	197
24.00	173
24.50	151
25.00	134
25.50	120
26.00	109
26.50	100

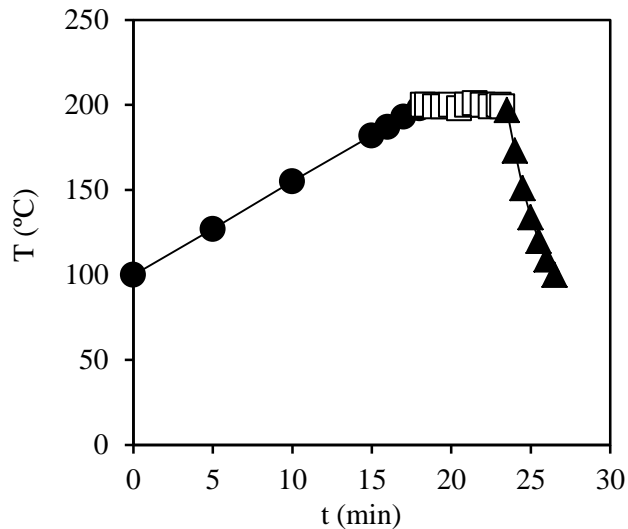


Figura A.3.6 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con H₂SO₄ (*T*_{máxima}: 200°C, *t*_{mantenimiento}: 5min)

Pretratamiento con H₂SO₄ (<i>T</i>_{máxima}: 200°C, <i>t</i>_{mantenimiento}: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99.941^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0.9999$
$b = 5.4668^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2310$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 4399$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -52947^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0.9959$
$b = 6643.8^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 508$
$c = -275.28^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 3.7785^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 7218$	$\log R_0 = 3.86$

A.3.7 Pretratamiento con H₂SO₄ a 200°C mantenidos durante 5 minutos (100 g, 0,034 M (+1,4,0))

Tabla A.3.7 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con H ₂ SO ₄ $T_{\text{máxima}}: 200^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 5 \text{ min}$	
t , min	T , °C
0.00	100
1.75	107
6.75	134
11.75	161
16.75	187
17.75	193
18.75	198
18.95	200
19.25	200
19.75	201
20.25	202
20.75	200
21.25	199
21.75	199
22.25	201
22.75	201
23.25	200
23.75	199
24.25	199
24.75	180
24.98	183
25.25	163
25.75	146
26.25	131
26.75	119
27.25	108
27.32	100

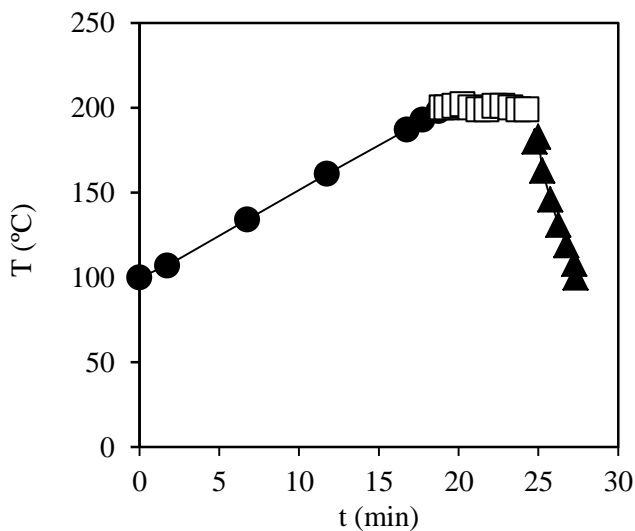


Figura A.3.7 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con H₂SO₄ ($T_{\text{máxima}}: 200^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 5 \text{ min}$)

Pretratamiento con H₂SO₄ ($T_{\text{máxima}}: 200^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 5 \text{ min}$)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 98.762^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0.9997$
$b = 5.2922^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2560$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 4399$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -379917^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0.9891$
$b = 4584.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 385$
$c = -182.12^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 2.3927^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 7344$	$\log R_0 = 3.87$

A.3.8 Pretratamiento con H₂SO₄ a 200°C mantenidos durante 5 minutos (150 g, 0,010 M (-1,+1))

Tabla A.3.8 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con agua $T_{\text{máxima}}: 205^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$	
t , min	T , °C
0.00	100
0.97	104
5.97	131
10.97	157
15.97	182
16.97	187
17.97	192
18.97	196
19.38	200
19.97	201
20.47	199
20.97	197
21.47	198
21.97	200
22.47	201
22.97	199
23.47	198
23.97	200
24.47	201
24.38	200
24.97	200
25.47	194
25.97	172
26.47	154
26.97	144
27.47	135
27.97	126
28.47	119
28.97	113
29.27	106
29.97	100

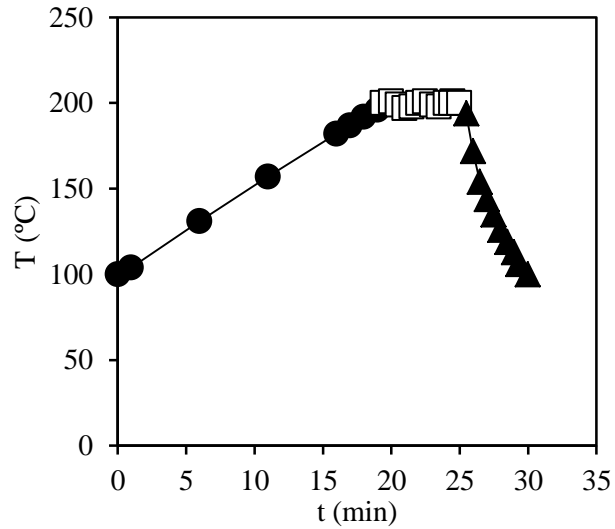


Figura A.3.8 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con agua ($T_{\text{máxima}}: 205^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$)

Pretratamiento con agua ($T_{\text{máxima}}: 205^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99.871^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0.9997$
$b = 5.1335^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2420$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 205^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 4399$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -12695^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0.984$
$b = 1502.7^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 867$
$c = -57.56^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 0.7229^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 7686$	$\log R_0 = 3,89$

A.3.9 Pretratamiento con H₂SO₄ a 200°C mantenidos durante 5 minutos (150 g, 0,030 M (+1,+1))

Tabla A.3.9 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con agua $T_{\text{máxima}}: 205^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$	
t , min	T , °C
0.00	100
1.54	107
6.54	134
11.54	159
16.54	183
17.54	189
18.54	194
19.54	199
19.65	200
20.04	200
20.54	200
21.04	201
21.54	201
22.04	200
22.54	200
23.04	200
23.54	200
24.04	200
24.54	199
24.65	200
25.04	193
25.54	168
26.04	150
26.54	135
27.04	122
27.54	111
27.84	105
28.04	100

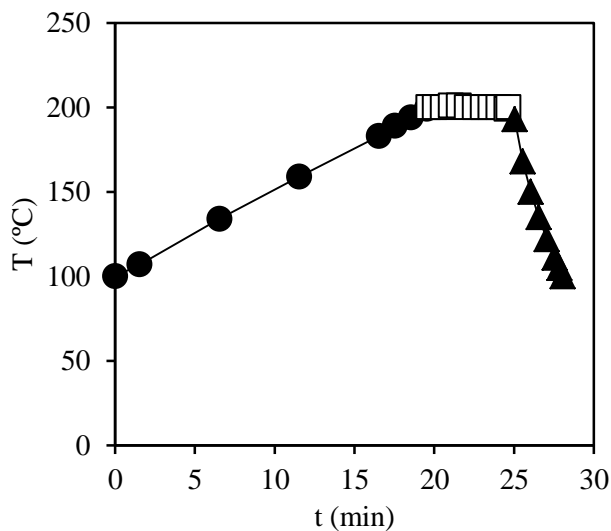


Figura A.3.9 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con agua ($T_{\text{máxima}}: 205^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 0 \text{ min}$)

Pretratamiento con agua ($T_{\text{máxima}}: 200^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mantenimiento}}: 5 \text{ min}$)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99.943^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0.9998$
$b = 5.075^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2500$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 205^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 4399$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -11080^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0.9963$
$b = 1436.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 396$
$c = -59.315^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 0.7957^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 7294$	$\log R_0 = 3,86$

A.3.10 Pretratamiento con H₂SO₄ a 200°C mantenidos durante 5 minutos (170,7 g, 0,020 M (0,+1,4))

Tabla A.3.10 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con H ₂ SO ₄ <i>T</i> _{máxima} : 200°C, <i>t</i> _{mantenimiento} : 5 min	
<i>t</i> , min	<i>T</i> , °C
0.00	100
1.42	106
6.42	134
11.42	159
16.42	184
17.42	189
18.42	193
19.42	198
19.63	200
19.92	200
20.42	199
20.92	198
21.42	200
21.92	199
22.42	199
22.92	200
23.42	201
23.92	200
24.42	199
24.65	200
24.92	200
25.42	170
25.92	157
26.42	145
26.92	135
27.42	126
27.92	116
28.42	107
28.92	100

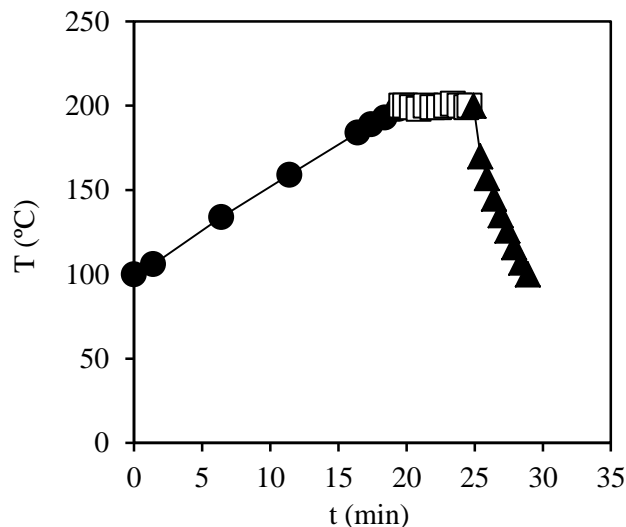


Figura A.3.10 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con H₂SO₄ (*T*_{máxima}: 200°C, *t*_{mantenimiento}: 5min)

Pretratamiento con H₂SO₄ (<i>T</i>_{máxima}: 200°C, <i>t</i>_{mantenimiento}: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 100.16^\circ\text{C}$	$r^2 = 0.9995$
$b = 5.0688/\text{min}$	$R_0 = 2764$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^\circ\text{C}$	$R_0 = 4399$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = 55125^\circ\text{C}$	$r^2 = 0.9966$
$b = -6030.9^\circ\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 224$
$c = 221.02^\circ\text{C}/\text{min}^2$	
$d = -2.7071^\circ\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 7387$	$\log R_0 = 3.87$

A.4 Pretratamientos previos a las hidrólisis enzimáticas de la serie HE2

A.4.1 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 190 °C mantenidos durante 5 minutos (1/3)

Tabla A.4.1 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 195°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
2,78	115
7,78	144
12,78	172
13,78	177
14,78	182
15,08	184
15,78	187
16,08	189
16,10	190
16,78	191
17,08	191
17,78	190
18,08	189
18,78	190
19,08	191
19,78	191
20,08	189
20,78	189
21,08	190
21,10	190
21,78	181
22,08	160
22,78	143
23,08	128
23,78	116
24,08	106
24,68	100

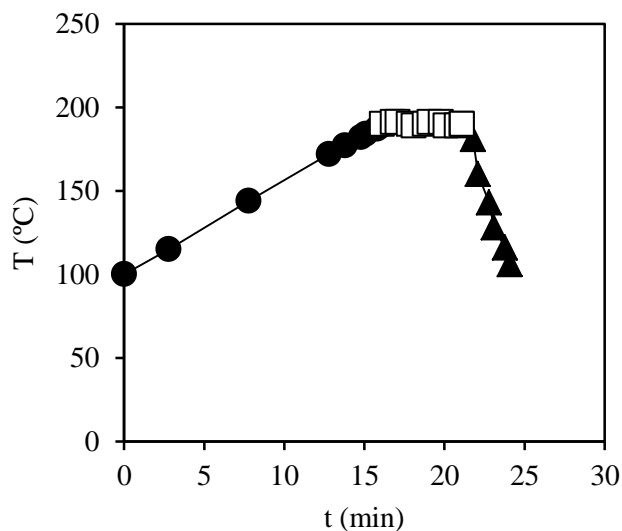


Figura A.4.1 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 190°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 190°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Región de calentamiento ($T = a + b t$)

$$a = 100,08 \text{ °C}$$

$$r^2 = 0,9997$$

$$b = 5,5616 \text{ °C/min}$$

$$R_0 = 1154$$

Región de mantenimiento ($T = a$)

$$a = 190 \text{ °C}$$

$$R_0 = 2233$$

Región de enfriamiento ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)

$$a = -25908 \text{ °C}$$

$$r^2 = 0,9874$$

$$b = 3536,9 \text{ °C/min}$$

$$R_0 = 259$$

$$c = -158,47 \text{ °C/min}^2$$

$$d = 2,3443 \text{ °C/min}^3$$

$$(R_0)_{\text{total}} = 3647$$

$$\log R_0 = 3,56$$

A.4.2 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 195 °C mantenidos durante 5 minutos (1/3)

Tabla A.4.2 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{m\acute{a}xima}$: 195°C, $t_{mantenimiento}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
1,48	108
6,48	133
11,48	159
16,48	185
16,78	188
17,48	190
17,78	193
18,01	195
18,48	195
18,78	195
19,48	195
19,78	195
20,48	196
20,78	196
21,48	193
21,78	192
22,48	193
22,78	195
23,01	196
23,48	196
23,78	170
24,48	146
24,78	128
25,48	114
25,78	103
26,04	100

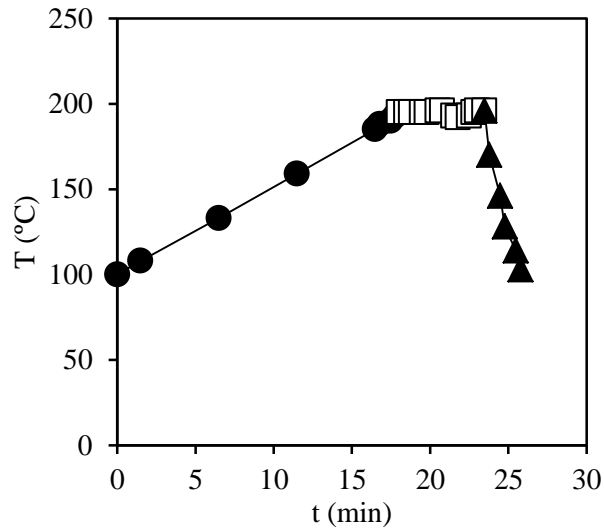


Figura A.4.2 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{m\acute{a}xima}$: 195°C, $t_{mantenimiento}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico
($T_{m\acute{a}xima}$: 195°C, $t_{mantenimiento}$: 5 min)

Región de calentamiento ($T = a + b t$)

$a = 99,781 \text{ } ^\circ\text{C}$ $r^2 = 0,9996$
 $b = 5,2182 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}$ $R_0 = 1629$

Región de mantenimiento ($T = a$)

$a = 195^\circ\text{C}$ $R_0 = 3134$

Región de enfriamiento ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)

$a = -73561 \text{ } ^\circ\text{C}$ $r^2 = 0,9836$
 $b = 9179,2 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}$ $R_0 = 497$
 $c = -379,14 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}^2$
 $d = 5,1949 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}^3$

$(R_0)_{total} = 5260$

$\log R_0 = 3,72$

A.4.3 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 200 °C mantenidos durante 5 minutos (1/3)

Tabla A.4.3 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
0,74	104
5,74	130
10,74	156
15,74	182
16,74	187
17,74	193
18,04	195
18,74	198
18,96	200
19,04	200
19,74	201
20,04	199
20,74	199
21,04	201
21,74	199
22,04	200
22,74	201
23,04	201
23,74	200
23,96	200
24,04	200
24,74	173
25,04	150
25,74	128
26,04	118
26,74	107
26,97	100

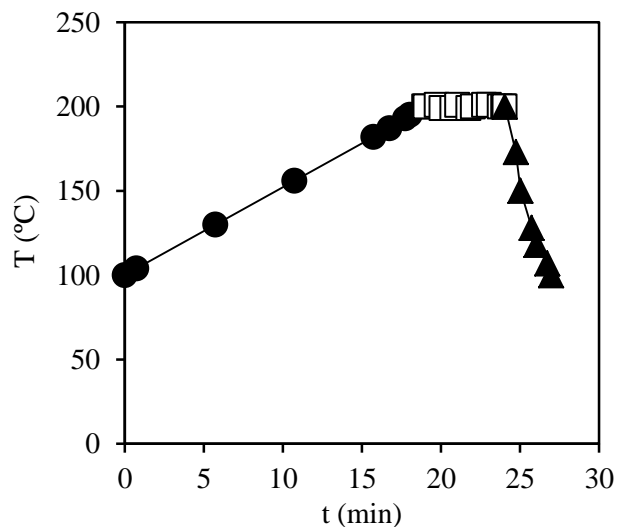


Figura A.4.3 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,988^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9999$
$b = 5,2304^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 2167$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 4399$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -95992^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9925$
$b = 11608^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 597$
$c = -465,26^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 6,1913^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 7163$	$\log R_0 = 3,86$

A.4.4 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 205 °C mantenidos durante 5 minutos (1/3)

Tabla A.4.4 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 205°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
5,00	125
10,00	152
15,00	178
20,00	203
20,26	205
21,00	206
21,30	205
22,00	205
22,30	205
23,00	205
23,30	204
24,00	204
24,30	206
25,00	206
25,26	205
25,30	204
26,00	188
26,30	166
27,00	147
27,30	132
28,00	119
28,30	109
29,00	100

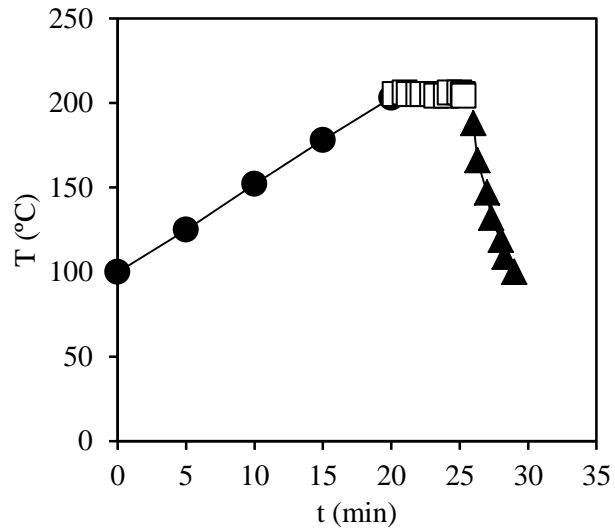


Figura A.4.4 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 205°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 205°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,767^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9999$
$b = 5,1864^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 3475$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 200^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 6174$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -28594^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9929$
$b = 3336,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 590$
$c = -127,59^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 1,609^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 10238$	$\log R_0 = 4,01$

A.4.5 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 210 °C mantenidos durante 5 minutos (1/3)

Tabla A.4.5 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 210°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
0,40	102
5,40	127
10,40	152
15,40	178
16,40	184
17,40	189
18,40	194
19,40	199
20,40	204
21,40	209
21,50	210
21,70	210
22,40	208
22,70	209
23,40	210
23,70	212
24,40	212
24,70	210
25,40	209
25,70	210
26,40	211
26,50	210
26,70	200
27,40	168
27,70	147
28,40	128
28,70	118
29,40	105
29,59	100

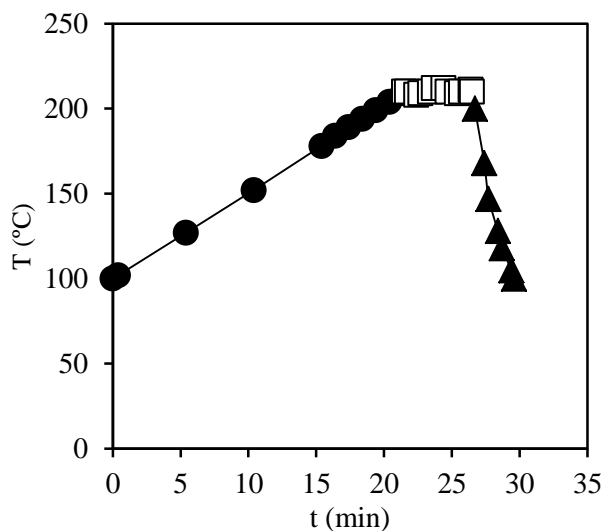


Figura A.4.5 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 210°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 210°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 99,659^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9999$
$b = 5,1177^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 4891$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 210^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 8665$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = 7268^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9968$
$b = -486,52^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 547$
$c = -8,7668^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = -0,0172^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 14103$	$\log R_0 = 4,15$

A.4.6 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 215 °C mantenidos durante 5 minutos (1/3)

Tabla A.4.6 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 215°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
1,35	107
6,35	134
11,35	160
16,35	186
21,35	211
21,65	213
21,79	215
22,35	215
22,65	214
23,35	213
23,65	215
24,35	216
24,65	216
25,35	216
25,65	216
26,35	216
26,65	214
26,79	214
27,35	209
27,65	178
28,35	155
28,65	138
29,35	125
29,65	114
30,35	106
30,61	100

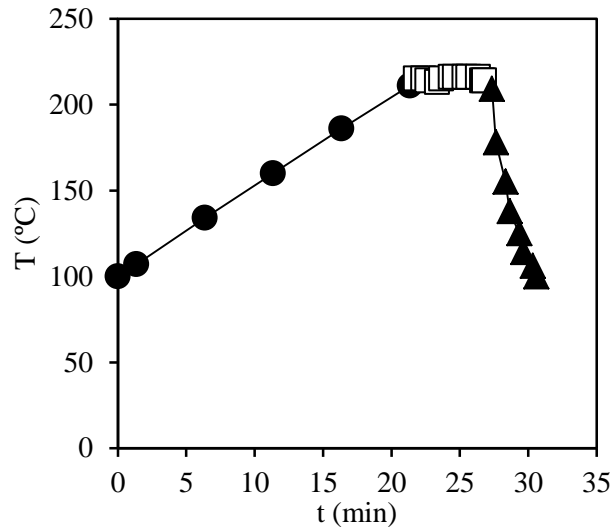


Figura A.4.6 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 215°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 210°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 100,28^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9999$
$b = 5,2276^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 6496$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 215^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 12162$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -34784^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9811$
$b = 3867,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 1041$
$c = -141,04^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 1,6963^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 19699$	$\log R_0 = 4,29$

A.5 Pretratamientos previos a las hidrólisis enzimáticas de la serie HE4

A.5.1 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,01 M) a 200 °C mantenidos durante 5 minutos (OPT-PT2)

Tabla A.5.1 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,01 M) $T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
2,86	116
7,86	146
12,86	176
17,36	202
18,36	201
18,86	201
19,36	201
19,86	201
20,36	201
20,86	200
21,36	200
21,86	201
22,06	201
22,36	198
22,86	167
23,36	152
23,86	132
24,36	123
24,86	115
25,36	110
25,86	106
26,36	102
26,69	100

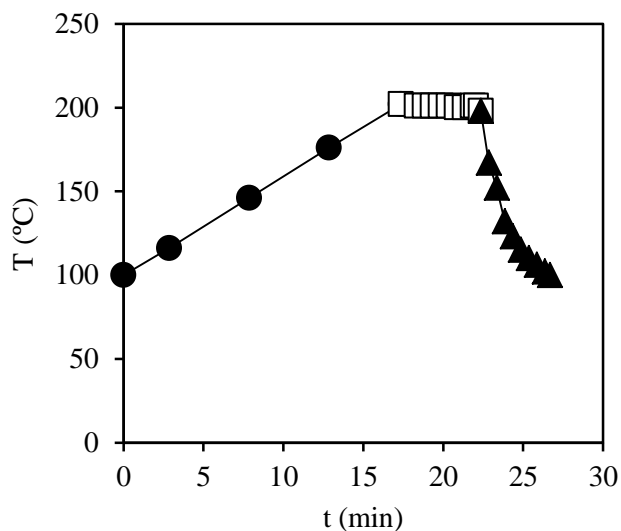


Figura A.5.1 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico

($T_{\text{máxima}}$: 200°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Región de calentamiento ($T = a + b t$)

$$a = 99,631^{\circ}\text{C}$$

$$r^2 = 0,9999$$

$$b = 5,9073^{\circ}\text{C}/\text{min}$$

$$R_0 = 2547$$

Región de mantenimiento ($T = a$)

$$a = 200^{\circ}\text{C}$$

$$R_0 = 4399$$

Región de enfriamiento ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)

$$a = 24675^{\circ}\text{C}$$

$$r^2 = 0,9978$$

$$b = -2821,9^{\circ}\text{C}/\text{min}$$

$$R_0 = 199$$

$$c = 108,3^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$$

$$d = -1,389^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$$

$$(R_0)_{\text{total}} = 7144$$

$$\log R_0 = 3,85$$

A.5.2 Pretratamiento con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) a 195 °C mantenidos durante 5 minutos (OPT-PT3)

Tabla A.5.2 Evolución de temperaturas Huesos de aceituna pretratados con disolución diluida de ácido sulfúrico (0,025 M) $T_{\text{máxima}}$: 195°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min	
t , min	T , °C
0,00	100
0,40	102
5,40	131
10,40	160
15,40	188
16,40	193
16,60	195
17,40	197
17,90	196
18,40	196
18,90	196
19,40	196
19,90	194
20,40	194
20,90	194
21,40	195
21,60	196
21,90	194
22,40	175
22,90	167
23,40	152
24,40	132
24,90	123
25,40	115
25,90	110
26,40	106
26,90	102
27,40	101
27,65	100

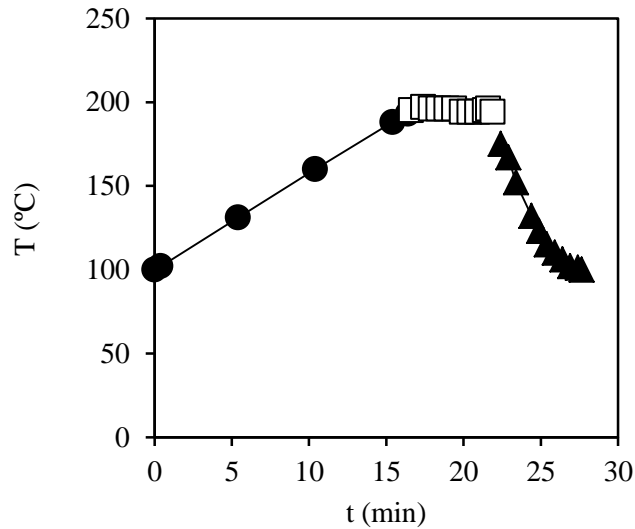


Figura A.5.2 Evolución de temperaturas en el tratamiento de huesos de aceituna con disolución diluida de ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 195°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)

Pretratamiento con ácido sulfúrico ($T_{\text{máxima}}$: 195°C, $t_{\text{mantenimiento}}$: 5 min)	
<u>Región de calentamiento</u> ($T = a + b t$)	
$a = 100,02^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9999$
$b = 5,7099^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 1598$
<u>Región de mantenimiento</u> ($T = a$)	
$a = 195^{\circ}\text{C}$	$R_0 = 3134$
<u>Región de enfriamiento</u> ($T = d t^3 + c t^2 + b t + a$)	
$a = -638,22^{\circ}\text{C}$	$r^2 = 0,9979$
$b = 186,53^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$R_0 = 473$
$c = -10,637^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$	
$d = 0,1757^{\circ}\text{C}/\text{min}^3$	
$(R_0)_{\text{total}} = 5205$	$\log R_0 = 3,72$

9.CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

Tesis de doctorado
Tratamientos a presión e hidrólisis del hueso de aceituna.
*Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen tannophilus**

Los resultados que se incluyen en esta Tesis Doctoral han sido usados en la elaboración de varias contribuciones a congresos, así como en la preparación de capítulos de libro y de un artículo científico.

9.1 Artículo

Título: Valorization of olive stones for chemicals from dilute acid hydrolysis: A response surface analysis

Autores: Marwa Saleh, Manuel Cuevas, Juan F. García, Sebastián Sánchez

Revista: Biochemical Engineering Journal (enviado y en revisión)

Editorial: Elsevier

ISSN: 1369-703X

9.2 Capítulos de libros

9.2.1 *Autores:* Manuel Cuevas, Sebastián Sánchez, Juan F. García, Jessica Olivencia, Marwa Saleh

Título: D-xylose production from endocarp of olive fruit: Optimization of dilute sulphuric acid hydrolysis

Referencia: European Biomass Conference and Exhibition Proceedings (20th European Biomass Conference). Eds. B. Krautkremer, H. Ossenbrink, D. Baxter J.F. Dallemand A. Grassi, P. Helm. ETA-Florence Renewable Energies, Florencia (Italia), p. 1692-1696, 2012.

ISBN: 978-88-89407-54-7

9.2.2 *Autores:* Manuel Cuevas, Sebastián Sánchez, Marwa Saleh, Juan F. García

Título: Sugars production from endocarps of olive fruit by dilute sulphuric acid hydrolysis and enzymatic hydrolysis

Referencia: European Biomass Conference and Exhibition Proceedings (21st European Biomass Conference). Eds. A. Eldrup, D. Baxter, A. Grassi, P. Helm. ETA-Florence Renewable Energies, Florencia (Italia), p. 291-294, 2013.

ISBN: 978-88-89407-53-0

9.3 Comunicaciones a congresos internacionales

Título: Tratamiento del hueso de aceituna a alta temperatura con agua y ácidos sulfúrico y nítrico

Autores: Manuel Cuevas, Marwa Saleh, Juan F. García, Nicolás Cruz, Vicente Bravo, Sebastián Sánchez

Tipo de participación: Póster

Congreso: XV Simposium Científico Técnico EXPOLIVA (Feria Internacional del Aceite de Oliva e Industrias Afines)

Lugar y fecha: Jaén, 2011

ISBN: 978-84-938900-0-1