



UNIVERSIDAD DE JAÉN

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

TESIS DOCTORAL

**HIDRÓLISIS ÁCIDA Y ENZIMÁTICA DEL
RESIDUO DE PODA DE OLIVO.
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON
*PACHYSOLEN TANNOPHILUS***

**PRESENTADA POR:
M^a INMACULADA ROMERO PULIDO**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. SEBASTIÁN SÁNCHEZ VILLASCLARAS
DR. D. MANUEL MOYA VILAR**

JAÉN, 13 DE NOVIEMBRE DE 2003

ISBN 84-8439-288-0

Nombre y apellidos del autor

M^a INMACULADA ROMERO PULIDO

Título de la Tesis Doctoral

HIDRÓLISIS ÁCIDA Y ENZIMÁTICA DEL RESIDUO DE PODA DE OLIVO.
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON *PACHYSOLEN TANNOPHILUS*

I.S.B.N.

84-8439-288-0

Fecha de Lectura

13 DE NOVIEMBRE DE 2003

Centro y Departamento en que fue realizada la lectura

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
Departamento Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales

Composición del Tribunal/Dirección de la Tesis

Dirección de la Tesis	Dr. D. Sebastián Sánchez Villasclaras Dr. D. Manuel Moya Vilar
Presidente/a del Tribunal	Dr. D. Fernando Camacho Rubio
Vocales	Dr. D. Luis Jiménez Alcaide Dra Dña. M ^a José Núñez García Dr. D. Vicente Bravo Rodríguez
Secretario/a	Dr. D. Eulogio Castro Galiano

Calificación Obtenida

SOBRESALIENTE CUM LAUDE



UNIVERSIDAD DE JAÉN

tesis doctoral

Resumen

Este trabajo forma parte de la línea de investigación aplicada sobre aprovechamiento de residuos lignocelulósicos del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales. La Memoria recoge, en una primera fase, la hidrólisis ácida y enzimática del residuo de poda de olivo y, a continuación, la fermentación de los hidrolizados obtenidos en las condiciones más favorables.

Tras un acondicionamiento del residuo en el que se incluyen las operaciones de molienda y tamizado, se ha llevado a cabo la hidrólisis ácida del residuo con los ácidos sulfúrico y fosfórico. Asimismo, y de forma paralela, se ha hidrolizado el residuo con las enzimas celulasas (de *Trichoderma viride*) y hemicelulasas (de *Aspergillus niger*) tras un pretratamiento con vapor (sobrepresión de 196,2 kPa). Una vez concluido el proceso hidrolítico obtenemos una disolución de azúcares, hidrolizado, que se caracteriza por su contenido en azúcares reductores totales y en D-glucosa, y un residuo sólido que se caracteriza mediante los parámetros de humedad, lignina, celulosa, hemicelulosa y cenizas.

En la hidrólisis ácida se ha determinado la influencia de la naturaleza y concentración de ácido (en el intervalo 0 a 8 N) así como el efecto de la temperatura en los hidrolizados con ácido sulfúrico (en el rango de 333 a 373 K) sobre la conversión fraccional, de hemicelulosa y celulosa, y los rendimientos en azúcares.

En las hidrólisis del residuo con enzimas se ha estudiado la influencia de distintos parámetros (tiempo de pretratamiento, diámetro de partícula, relación enzima/sustrato, relación celulasas/hemicelulasas, pH y temperatura de operación) sobre la conversión de la fracción hemicelulósica y el rendimiento en azúcares.

En los residuos sólidos resultantes de la hidrólisis enzimática sólo la fracción de hemicelulosa resulta atacada en las condiciones ensayadas, alcanzando una conversión del 53% en el experimento realizado en las condiciones óptimas y con el mayor tiempo de pretratamiento, 300 min.

En las hidrólisis en las que el catalizador ha sido una disolución ácida, el ácido fosfórico sólo es capaz de hidrolizar parcialmente la hemicelulosa alcanzando una conversión máxima del 77% en las condiciones más drásticas, $C_A = 8$ N. Sin embargo, el ácido sulfúrico alcanza la conversión total de la hemicelulosa para una concentración 1 N y llega a degradar la celulosa a partir de disoluciones 0,5 N, consiguiendo un 35,9% de conversión celulósica para una concentración de ácido 8 N.

Con respecto a las disoluciones de azúcares obtenidas, en los hidrolizados ácidos y enzimáticos, se han identificado dos fracciones, una de pentosas y otra de hexosas en menor proporción y compuesta fundamentalmente por D-glucosa.

Tras la comparación de los resultados de hidrólisis con los dos ácidos empleados, se deduce que con el ácido fosfórico los rendimientos alcanzados en azúcares son inferiores que con el ácido sulfúrico puesto que para este primer ácido la conversión de la fracción hemicelulósica no llega a ser completa en ninguno de los casos, mientras que el ácido sulfúrico es un catalizador más eficaz de la reacción hidrolítica, aunque puede producir una mayor degradación de los azúcares obtenidos.

En una segunda fase se han fermentado algunos de los hidrolizados obtenidos, ácidos y enzimáticos, con la levadura *Pachysolen tannophilus* (ATCC 32691). En todos los casos se han determinado a lo largo del tiempo las concentraciones de biomasa, D-glucosa, azúcares reductores totales y etanol y xilitol producidos. A partir de estos valores se han calculado los rendimientos en biomasa, etanol y xilitol y las velocidades específicas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol.

Se han realizado cuatro series experimentales de fermentación. En las dos primeras se cultivó *P. tannophilus* en hidrolizados obtenidos con ácido sulfúrico en los que se modificó la concentración y la temperatura del medio de reacción durante la operación de hidrólisis. En una tercera serie se fermentaron hidrolizados procedentes de hidrólisis de ácido fosfórico y por último, se fermentaron los hidrolizados enzimáticos obtenidos en las condiciones óptimas para las enzimas encargadas de hidrolizar el residuo.

En cada experimento la concentración inicial de sustrato ha sido la resultante del proceso de hidrólisis y posterior acondicionamiento del hidrolizado obtenido; el caudal de aire ha sido el suministrado por el vórtice de agitación a 750 rpm, la temperatura fue de 303 K y el pH 3,5 para los hidrolizados ácidos y 4,5 para los enzimáticos, condiciones de operación óptimas que fueron determinadas en trabajos previos (Camacho *et al.*, 1989; Bravo *et al.*, 1993) para la fermentación de disoluciones de D-glucosa y D-xilosa utilizando la levadura *P. tannophilus*.

Los resultados experimentales ponen de manifiesto que con la levadura *P. tannophilus* se produce una utilización secuencial de los azúcares; durante una primera fase, sólo se asimila D-glucosa hasta su consumo total, posteriormente se inicia el consumo del resto de azúcares, mayoritariamente D-xilosa.

En la fermentación de hidrolizados de ácido sulfúrico se observa que no existen grandes variaciones en los valores de la velocidad específica máxima de crecimiento, oscilando entre 0,017 h⁻¹ para el experimento procedente del hidrolizado con ácido sulfúrico 0,5 N y 0,028 h⁻¹ cuando se trata de hidrólisis con ácido sulfúrico 2 N. Al variar la temperatura en estos hidrolizados, se obtienen los máximos valores de la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m^0) y productividad en biomasa (b) para las fermentaciones cuyas hidrólisis fueron realizadas a temperaturas más suaves, 343 y 353 K. Con respecto a la influencia de la concentración de ácido fosfórico sobre el cultivo cabe destacar un aumento de la productividad en biomasa con la concentración, alcanzando su máximo valor en el cultivo del hidrolizado 2 N de ácido fosfórico, 0,007 kg/(m³ h), y bajando para una concentración más elevada, 8 N.

En la fermentación de hidrolizados enzimáticos se observan valores elevados en la velocidad específica máxima de crecimiento comparados con los obtenidos en la fermentación de hidrolizados ácidos, alcanzándose los valores más elevados cuando el proceso enzimático se lleva a cabo sin disolución tampón, con un valor máximo para μ_m^o de $0,13 \text{ h}^{-1}$. Es también en los cultivos de hidrolizados enzimáticos donde se obtienen los valores más elevados de velocidad específica de producción de etanol, q_E , con un valor máximo de $0,19 \text{ kg}/(\text{kg h})$. En general, se observa tanto para los cultivos de hidrolizados ácidos como enzimáticos, que la velocidad específica de producción de etanol disminuye apreciablemente con el tiempo.

En relación a los rendimientos globales en etanol y xilitol, hay que resaltar que se obtienen valores muy similares para hidrolizados ácidos y enzimáticos, del orden de $0,39 \text{ kg}$ de etanol por cada kg de sustrato, mientras que para xilitol se obtienen, en todos los casos, valores inferiores a $0,14 \text{ kg}$ xilitol/ kg sustrato.

Abstract

Acid and enzymatic hydrolysis of olive tree pruning residues. Hydrolysate fermentation by *Pachysolen tannophilus*.

This work deals with acid and enzymatic hydrolysis of olive tree pruning residues and ulterior fermentation, at the most favourable conditions, of the resulting hydrolysates.

After conditioning the residue, acid hydrolysis by sulfuric and phosphoric acids has been performed. At the same time, following steam pretreatment, the residue has been enzymatically hydrolysed by cellulases (from *Trichoderma viride*) and hemicellulases (from *Aspergillus niger*).

The influence of both kind of acids and acid concentration (in the range 0-8 N) and the effect of temperature for sulfuric acid (in the temperature range 333-373 K) on fractional conversion and sugar yields has been determined. Regarding enzymatic hydrolysis, the influence of the main parameters (pretreatment time, particle size, enzyme/substrate ratio, cellulases/hemicellulases ratio, pH and temperature) on hemicellulose conversion and sugar yield has been studied.

Under the operation conditions, just the hemicellulose fraction of the residue is attacked by enzymatic hydrolysis. When using an acid solution as a catalyst, phosphoric acid produces only a partial hydrolysis of hemicellulose, while total hemicellulose conversion is reached for 1 N solutions of sulfuric acid; moreover, a partial cellulose degradation is observed when sulfuric acid at concentrations 0.5 N or above is used. Comparing results, sulfuric acid shows a better hydrolysing performance, although a greater level of sugar degradation may also be possible.

In the second part of the work, some of the acid and enzymatic hydrolysates have been fermented by the yeast *Pachysolen tannophilus* (ATCC 32691). In all cases the time evolution of the concentrations of biomass, D-glucose, total reducing sugars, ethanol and xylitol have been determined. From these results the biomass, ethanol and xylitol yields have been calculated, as well as the specific rates of growth, substrate consumption and ethanol production.

Results show that there is a sequential assimilation of sugars. In the fermentation of enzymatic hydrolysates the values of the maximum specific growth rate are greater than those corresponding to acid hydrolysates. In the same way, the specific ethanol production rate values calculated for enzymatic hydrolysates are the biggest ones, reaching a maximum value of 0.19 kg/(kg h). As a rule, the specific ethanol production rate decreases notably with time both for acid or enzymatic hydrolysates.

As far as bioproducts are concerned, the ethanol and xylitol yields values obtained from either acid or enzymatic hydrolysates are quite similar, 0.39 kg ethanol/kg substrate; however, xylitol yields are always lower than 0.14 kg xylitol/kg substrate.



UNIVERSIDAD DE JAÉN

HIDRÓLISIS ÁCIDA Y ENZIMÁTICA
DEL RESIDUO DE PODA DE OLIVO.
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS
CON *PACHYSOLEN TANNOPHILUS*

M^a INMACULADA ROMERO PULIDO

tesis doctoral

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. D. Sebastián Sánchez Villasclaras por su acertada dirección e inestimable ayuda en la realización de esta memoria, junto con el Dr. D. Manuel Moya Vilar el cual me ha prestado una ayuda incalculable en los aspectos informáticos de este trabajo.

A mi compañera y amiga D^a. Encarnación Ruiz Ramos, quien tan generosamente, me inició en el campo de la fermentación.

A mis compañeros y amigos Dr. D. Eulogio Castro Galiano y Dr. D. Alberto J. Moya López por su apoyo y sus innumerables consejos y aportaciones desde el inicio de este trabajo de investigación y cuyo fruto ha quedado plasmado en el mismo.

A D. Jesús Guzmán Hervás que me ha facilitado la recogida y preparación del residuo de poda de olivo.

Al Dr. D. Rafael Pacheco Reyes, D^a. M^a Dolores La Rubia García, D. Gassan Hodaifa y D^a. M^a Dolores de la Casa que, de una u otra forma, han participado en la elaboración de esta Memoria.

A Isabel y Juan José

A mi familia

Indice

I Resumen	9
II Antecedentes bibliográficos	13
II.1 Energías renovables: biomasa	14
II.1.1 Fuentes de biomasa para fines energéticos	15
II.1.2 Aprovechamiento energético de la biomasa	19
II.1.3 Ventajas e inconvenientes de la biomasa como forma de energía ..	30
II.2 Residuos lignocelulósicos	32
II.2.1 Composición de los residuos lignocelulósicos	33
II.2.2 Aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos	38
II.3 Residuos de poda de olivo	45
II.3.1 Producción	45
II.3.2 Recogida y transporte	47
II.3.3 Características físicas	48
II.3.4 Alternativas para su aplicación	49
II.4 Pretratamiento de residuos lignocelulósicos	52
II.4.1 Pretratamientos físicos	53
II.4.2 Pretratamientos físico-químicos	53
II.4.2.1 Autohidrólisis	53
II.4.2.2 Proceso AFEX	55
II.4.2.3 Explosión con CO ₂	55
II.4.3 Pretratamientos químicos	56
II.4.3.1 Ozonolisis	56
II.4.3.2 Prehidrólisis ácida	56
II.4.3.3 Prehidrólisis alcalina	57
II.4.4 Pretratamientos biológicos	57
II.5 Procesos de transformación de la biomasa lignocelulósica	58
II.5.1 Hidrólisis con ácido concentrado	58

II.5.2 Hidrólisis con ácido diluido	59
II.5.3 Hidrólisis enzimática	69
II.5.3.1 Celulasas	72
II.5.3.2 Influencia de las variables de operación	77
II.5.4 Inhibidores de la fermentación	79
II.5.4.1 Mecanismos	83
II.5.4.2 Desintoxicación de los hidrolizados	87
II.6 Obtención de xilitol	90
II.6.1 Procesos para obtención de xilitol	90
II.6.2 Obtención de xilitol a partir de hidrolizados lignocelulósicos	94
II.7 Obtención de etanol	96
II.7.1 Producción de etanol por fermentación	96
II.7.1.1 Glucólisis	99
II.7.1.2 Obtención de etanol a partir de D-xilosa	102
II.7.1.3 Influencia de las condiciones de operación	105
II.7.2 Obtención de etanol mediante hidrólisis y fermentación simultáneas	106
II.8 Objeto de la investigación	108
III Materiales y métodos	110
III.1 Instalaciones experimentales	111
III.1.1 Equipos de hidrólisis	111
III.1.1.1 Reactor de hidrólisis ácida	111
III.1.1.2 Reactor de hidrólisis enzimática	112
III.1.2 Instalación de fermentación	113
III.2 Procedimiento y desarrollo de los experimentos	115
III.2.1 Características del residuo de poda	115
III.2.1.1 Procedencia y recogida	115
III.2.1.2 Preparación del residuo	115
III.2.2 Proceso de hidrólisis	116

III.2.2.1 H. ácida	116
III.2.2.2 H. enzimática	117
III.2.3 Acondicionamiento de hidrolizados	118
III.2.3.1 Ajuste del pH	118
III.2.3.2 Concentración	119
III.2.3.3 Centrifugación	119
III.2.3.4 Esterilización	120
III.2.4 Proceso de fermentación	120
III.2.4.1 Levadura utilizada	120
III.2.4.2 Precultivo en medio sólido	120
III.2.4.3 Medio de cultivo	121
III.2.4.4 Inóculo líquido	121
III.2.4.5 Preparación y comienzo del bioproceso	122
III.3 Variables de operación	123
III.3.1 Proceso de hidrólisis	123
III.3.1.1 H. ácida	123
III.3.1.2 H. enzimática	123
III.3.2 Proceso de fermentación	124
III.4 Métodos de análisis	125
III.4.1 Caracterización del residuo	125
III.4.2 Sustratos analizados	130
III.4.2.1 D-glucosa	130
III.4.2.2 Azúcares reductores totales	133
III.4.2.3 Determinación de azúcares por HPLC	134
III.4.3 Biomasa formada en el proceso de fermentación	134
III.4.4 Bioproductos formados	135
III.4.4.1 Etanol	135
III.4.4.2 Xilitol	136
III.4.4.3 Ácido acético	138
III.5 Productos utilizados	140

III.5.1 Reactivos químicos	140
III.5.2 Otros materiales	142
IV Resultados experimentales.....	143
IV.1 Hidrólisis ácida	144
IV.1.1 Pretratamientos	145
IV.1.1.1 A presión	145
IV.1.1.2 Con ultrasonidos	149
IV.1.2 Naturaleza y concentración de ácido	153
IV.1.2.1 Ácido sulfúrico	153
IV.1.2.2 Ácido fosfórico	157
IV.1.3 Temperatura de hidrólisis	161
IV.2 Hidrólisis enzimática	164
IV.2.1 Naturaleza de la disolución tampón	164
IV.2.2 Pretratamientos a presión.....	166
IV.2.3 Tamaño de partícula.....	169
IV.2.4 Concentración de enzimas	173
IV.2.4.1 Relación enzima/sustrato	173
IV.2.4.2 Relación celulasas/hemicelulasas	175
IV.2.5 pH de operación	179
IV.2.6 Temperatura de hidrólisis	182
IV.3 Fermentación de hidrolizados	185
IV.3.1 H. ácidos	185
IV.3.1.1 Ácido sulfúrico.....	185
IV.3.1.2 Ácido fosfórico	203
IV.3.2 H. enzimáticos.....	216
V Discusión de resultados	230
V.1 Hidrólisis	231
V.1.1 H. ácida.....	232

V.1.1.1 Influencia de distintos pretratamientos	233
V.1.1.2 Influencia de la concentración de ácido sulfúrico	234
V.1.1.3 Influencia de la concentración de ácido fosfórico	239
V.1.1.4 Efecto de la temperatura	243
V.1.2 H. enzimática	246
V.1.2.1 Disolución tampón	246
V.1.2.2 Pretratamiento a presión	248
V.1.2.3 Tamaño de partícula	250
V.1.2.4 Relación enzima/sustrato	253
V.1.2.5 Relación celulasas/hemicelulasas	257
V.1.2.6 pH de operación	260
V.1.2.7 Temperatura de hidrólisis	264
V.2 Fermentación de hidrolizados con <i>Pachysolen tannophilus</i>	268
V.2.1 F. de hidrolizados de ácido sulfúrico	268
V.2.1.1 Influencia de la concentración de ácido	268
V.2.1.2 Influencia de la temperatura de hidrólisis	288
V.2.2 F. de hidrolizados de ácido fosfórico	299
V.2.3 F. de hidrolizados enzimáticos	310
VI Conclusiones	323
VII Nomenclatura	331
VIII Bibliografía	338

I. Resumen

Este trabajo forma parte de la línea de investigación aplicada sobre aprovechamiento de residuos lignocelulósicos del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales. La Memoria recoge, en una primera fase, la hidrólisis ácida y enzimática del residuo de poda de olivo y, a continuación, la fermentación de los hidrolizados obtenidos en las condiciones más favorables.

Tras un acondicionamiento del residuo en el que se incluyen las operaciones de molienda y tamizado, se ha llevado a cabo la hidrólisis ácida del residuo con los ácidos sulfúrico y fosfórico. Asimismo, y de forma paralela, se ha hidrolizado el residuo con las enzimas celulasas (de *Trichoderma viride*) y hemicelulasas (de *Aspergillus niger*) tras un pretratamiento con vapor (sobrepresión de 196,2 kPa). Una vez concluido el proceso hidrolítico obtenemos una disolución de azúcares, hidrolizado, que se caracteriza por su contenido en azúcares reductores totales y en D-glucosa, y un residuo sólido que se caracteriza mediante los parámetros de humedad, lignina, celulosa, hemicelulosa y cenizas.

En la hidrólisis ácida se ha determinado la influencia de la naturaleza y concentración de ácido (C_A , en el intervalo 0 a 8 N) así como el efecto de la temperatura en los hidrolizados con ácido sulfúrico (T_H , en el rango de 333 a 373 K) sobre la conversión fraccional, de hemicelulosa y celulosa, y los rendimientos en azúcares.

En las hidrólisis del residuo con enzimas se ha estudiado la influencia de distintos parámetros (tiempo de pretratamiento, diámetro de partícula, relación enzima/sustrato, relación celulasas/hemicelulasas, pH y temperatura de operación) sobre la conversión de la fracción hemicelulósica y el rendimiento en azúcares.

Para ambos procesos hidrolíticos y mediante el método diferencial de análisis de datos se ha determinado una ecuación para la velocidad de hidrólisis de las fracciones de celulosa y hemicelulosa, aceptando que la lignina no sufre degradación alguna.

En los residuos sólidos resultantes de la hidrólisis enzimática sólo la fracción de hemicelulosa resulta atacada en las condiciones ensayadas, alcanzando una conversión del 53% en el experimento realizado en las condiciones óptimas y con el mayor tiempo de pretratamiento, 300 min.

En las hidrólisis en las que el catalizador ha sido una disolución ácida, el ácido fosfórico sólo es capaz de hidrolizar parcialmente la hemicelulosa alcanzando una conversión máxima del 77% en las condiciones más drásticas, $C_A = 8$ N. Sin embargo, el ácido sulfúrico alcanza la conversión total de la hemicelulosa para una concentración 1 N y llega a degradar

la celulosa a partir de disoluciones 0,5 N, consiguiendo un 35,9% de conversión celulósica para una concentración de ácido 8 N.

Con respecto a las disoluciones de azúcares obtenidas, en los hidrolizados ácidos y enzimáticos, se han identificado dos fracciones, una de pentosas y otra de hexosas en menor proporción y compuesta fundamentalmente por D-glucosa.

Tras la comparación de los resultados de hidrólisis con los dos ácidos empleados, se deduce que con el ácido fosfórico los rendimientos alcanzados en azúcares son inferiores que con el ácido sulfúrico puesto que para este primer ácido la conversión de la fracción hemicelulósica no llega a ser completa en ninguno de los casos, mientras que el ácido sulfúrico es un catalizador más eficaz de la reacción hidrolítica, aunque puede producir una mayor degradación de los azúcares obtenidos.

En una segunda fase se han fermentado algunos de los hidrolizados obtenidos, ácidos y enzimáticos, con la levadura *Pachysolen tannophilus* (ATCC 32691). En todos los casos se han determinado a lo largo del tiempo las concentraciones de biomasa, D-glucosa, azúcares reductores totales y etanol y xilitol producidos. A partir de estos valores se han calculado los rendimientos en biomasa, etanol y xilitol y las velocidades específicas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol.

Se han realizado cuatro series experimentales de fermentación. En las dos primeras se cultivó *P. tannophilus* en hidrolizados obtenidos con ácido sulfúrico en los que se modificó la concentración y la temperatura del medio de reacción durante la operación de hidrólisis. En una tercera serie se fermentaron hidrolizados procedentes de hidrólisis de ácido fosfórico y por último, se fermentaron los hidrolizados enzimáticos obtenidos en las condiciones óptimas para las enzimas encargadas de hidrolizar el residuo.

En cada experimento la concentración inicial de sustrato ha sido la resultante del proceso de hidrólisis y posterior acondicionamiento del hidrolizado obtenido; el caudal de aire ha sido el suministrado por el vórtice de agitación a 750 rpm, la temperatura fue de 303 K y el pH 3,5 para los hidrolizados ácidos y 4,5 para los enzimáticos, condiciones de operación óptimas que fueron determinadas en trabajos previos (Camacho *et al.*, 1989; Bravo *et al.*, 1993) para la fermentación de disoluciones de D-glucosa y D-xilosa utilizando la levadura *P. tannophilus*.

Los resultados experimentales ponen de manifiesto que con la levadura *P. tannophilus* se produce una utilización secuencial de los azúcares; durante una primera fase, sólo se asimila

D-glucosa hasta su consumo total, posteriormente se inicia el consumo del resto de azúcares, mayoritariamente D-xilosa.

En la fermentación de hidrolizados de ácido sulfúrico se observa que no existen grandes variaciones en los valores de la velocidad específica máxima de crecimiento, oscilando entre $0,017 \text{ h}^{-1}$ para el experimento procedente del hidrolizado con ácido sulfúrico $0,5 \text{ N}$ y $0,028 \text{ h}^{-1}$ cuando se trata de hidrólisis con ácido sulfúrico 2 N . Al variar la temperatura en estos hidrolizados, se obtienen los máximos valores de la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) y productividad en biomasa (b) para las fermentaciones cuyas hidrólisis fueron realizadas a temperaturas más suaves, 343 y 353 K . Con respecto a la influencia de la concentración de ácido fosfórico sobre el cultivo cabe destacar un aumento de la productividad en biomasa con la concentración, alcanzando su máximo valor en el cultivo del hidrolizado 2 N de ácido fosfórico, $0,007 \text{ kg}/(\text{m}^3 \text{ h})$, y bajando para una concentración más elevada, 8 N .

En la fermentación de hidrolizados enzimáticos se observan valores elevados en la velocidad específica máxima de crecimiento comparados con los obtenidos en la fermentación de hidrolizados ácidos, alcanzándose los valores más elevados cuando el proceso enzimático se lleva a cabo sin disolución tampón, con un valor máximo para μ_m de $0,13 \text{ h}^{-1}$.

Es también en los cultivos de hidrolizados enzimáticos donde se obtienen los valores más elevados de velocidad específica de producción de etanol, q_E , con un valor máximo de $0,19 \text{ kg}/(\text{kg h})$. En general, se observa tanto para los cultivos de hidrolizados ácidos como enzimáticos, que la velocidad específica de producción de etanol disminuye apreciablemente con el tiempo.

En relación a los rendimientos en bioproductos, etanol ($Y_{E/s}^G$) y xilitol ($Y_{Xi/s}^G$), hay que resaltar que se obtienen valores muy similares para hidrolizados ácidos y enzimáticos de $Y_{E/s}^G$, del orden de $0,39 \text{ kg}$ de etanol por cada kg de sustrato, mientras que para $Y_{Xi/s}^G$ se obtienen, en todos los casos, valores inferiores a $0,14 \text{ kg}$ xilitol/ kg sustrato.

II. Antecedentes bibliográficos

II.1 ENERGÍAS RENOVABLES: BIOMASA

Actualmente en España, la biomasa representa el 56'2% (3.792 ktep) del consumo en energía primaria de origen renovable incluida toda la hidráulica, y si se excluye esta el 89,1% de todas las renovables, según se recoge en la Tabla II.1. Es de destacar que en estas cifras se contabilizan las energías hidroeléctrica, eólica y fotovoltaica, como energías primarias transformadas en ktep con base en la equivalencia 1 Gwh = 0,086 ktep. Sobre el consumo global de energía primaria en España, 124.281 ktep, la energía aportada por la biomasa representa el 3'1%, y de esta un 94'1% se destina a la producción de calor y el 5'9% a la producción de electricidad (Fernández y Lucas, 2002).

TABLA II.1
CONSUMO DE ENERGÍAS RENOVABLES EN ESPAÑA, AÑO 2000

	Consumo, ktep	% del total	% del parcial
Biomasa	3.792	56,2	89,0
Hidráulica	2.491	36,9	--
Eólica	425	6,3	10,0
Solar	33	0,5	0,8
Geotérmica	8	0,1	0,2

Con la Ley del Sector Eléctrico (Ley 54/1997 de 27 de noviembre) el gobierno español adquirió el compromiso de cubrir en el 2010 el 12% del consumo en energía primaria con fuentes de energía renovable. Para alcanzar este objetivo aprobó el Plan de Fomento de las Energías Renovables, en el que se plasmaron algunas propuestas concretas. El objetivo es alcanzar 16.639 ktep de energía primaria de fuentes de energía renovable en el año 2010 lo que supone un aumento de 9.526 ktep, comparado con el consumo de energía renovable en 1998, de las cuales el 74'4% (7.086 ktep) sería aportado por la biomasa.

Se denomina biomasa al conjunto de materiales orgánicos generados por fotosíntesis o que han sido producidos en la cadena biológica (Fernández, 1980).

De toda la radiación solar que incide sobre la Tierra sólo un 70% atraviesa la capa atmosférica, de esta el 40% es fotosintéticamente activa y el rendimiento de la fotosíntesis es del 30% por lo que resulta que las plantas únicamente absorben alrededor del 8% de la energía solar. Pero, como organismos vivos que son, también consumen energía para vivir por lo que ese valor se reduce hasta, aproximadamente, el 5%. O sea, el medio vegetal sólo transforma

en energía de biomasa el 5% del total de la energía solar que baña la Tierra, pero aún así, realmente sólo el 3% de la energía está en condiciones de ser recuperada (Jarabo y Elortegui, 2000). Según Ortega (2001) todo el proceso de síntesis de un kg de glucosa, por fotosíntesis, consume del orden de 4,4 kwh lo que representa, considerando la eficacia de la fotosíntesis, 88 kwh solares. Si se considera el crecimiento, la disponibilidad de nutrientes, cambios climáticos y las transformaciones que debe sufrir la glucosa para obtener otras moléculas el rendimiento final de la fotosíntesis es sólo de un 0,3%.

Aún así, dada la gran extensión de vegetación que existe en el planeta, considerando agua y tierra, la biomasa permite almacenar alrededor de 8,5 Twh/año; aunque este valor no se encuentra disponible en su totalidad por una serie de consideraciones:

- la biomasa localizada en los océanos es de muy difícil recolección,
- la biomasa terrestre está muy dispersa y los elevados costes de recolección y transporte la hacen inviable y
- la biomasa cultivable está condicionada por las zonas y el tipo de cultivo que es actualmente demandado.

A pesar de los problemas anteriores parece muy interesante emplear la biomasa como una fuente alternativa de energía, aunque para ello se hace necesario un adecuado desarrollo de la tecnología actual.

II.1.1 Fuentes de biomasa para fines energéticos

La biomasa puede ser vegetal o residual. La biomasa vegetal está constituida fundamentalmente por los cultivos energéticos los cuales son empleados, mediante el empleo de diferentes procesos industriales, como fuente de energía. Cuando la biomasa vegetal se emplea para la alimentación del ganado, a la fracción aprovechada para el engorde se denomina biomasa animal y el resto no aprovechado es residual. Por ello, y de forma genérica, se considera biomasa residual todo desecho de materia orgánica proveniente de los seres vivos.

En la Figura II.1 se muestran los diferentes tipos de biomasa que actualmente se distinguen. La biomasa primaria es la producida por la conversión directa de la energía solar en energía de biomasa y es aquella en la que no interviene el hombre en su obtención y si lo hace es con el objetivo final de emplearla como materia prima en posteriores procesos de producción de energía a partir del sol. La biomasa secundaria incluye los residuos de origen

agrícola, forestal y animal, y la biomasa terciaria está constituida por los residuos urbanos e industriales.

Según la definición dada, también se considera biomasa a la de carácter fósil (carbón y petróleo) pero no tiene carácter renovable. De toda la biomasa sólo se va a considerar la de carácter renovable:

- cultivos energéticos y
- residuos.

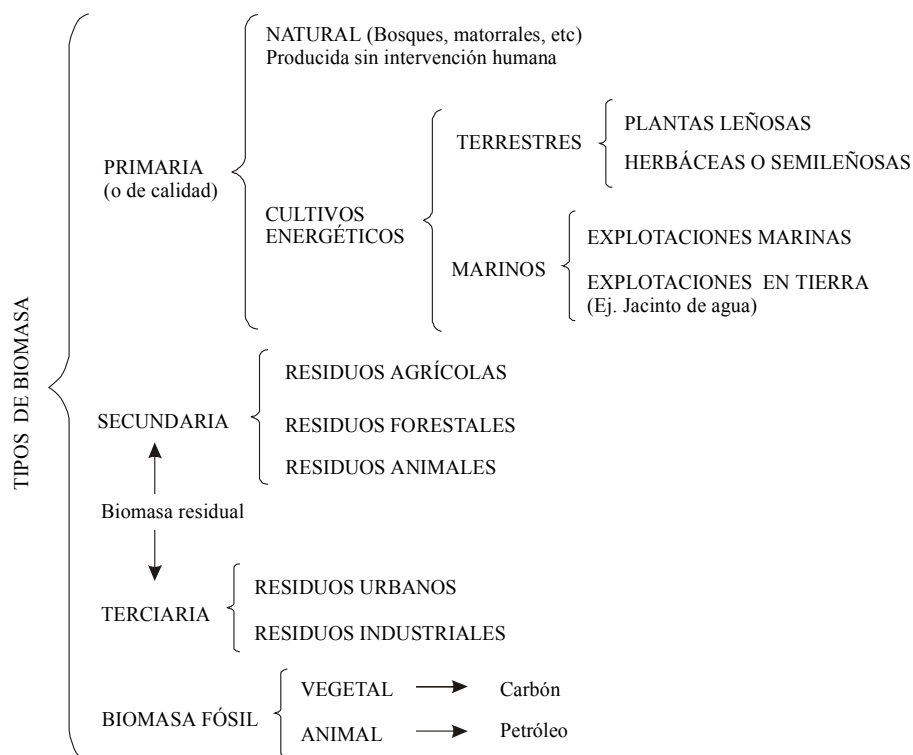


Fig. II.1 Tipos de biomasa

A) Cultivos energéticos como fuente de biomasa

Se denominan cultivos energéticos aquellos que se realizan con el único fin de producir combustibles. Actualmente esta fuente de energía se encuentra en fase de investigación y desarrollo y aún resta algún tiempo para que tenga una rentabilidad económica y energética. Algunos ejemplos de cultivos aprovechables con fines energéticos son:

- Cultivos tradicionales: caña de azúcar, sorgo dulce, remolacha, mandioca, etc.
- Cultivos poco frecuentes: cardos, chumberas, helechos, etc.
- Cultivos acuáticos: macroalgas celulares (*Macrocystis*), microalgas unicelulares (*Chlorella*) y plantas de agua dulce (jacinto de agua).
- Cultivos de plantas productoras de combustibles líquidos: palma africana, tabaiba, jojoba, tártago, etc.

Los biocombustibles presentan la ventaja de que el balance de carbono emitido a la atmósfera es nulo ya que previamente este ha sido absorbido por la planta (Figura II.2) por lo que contribuyen a preservar el medioambiente.

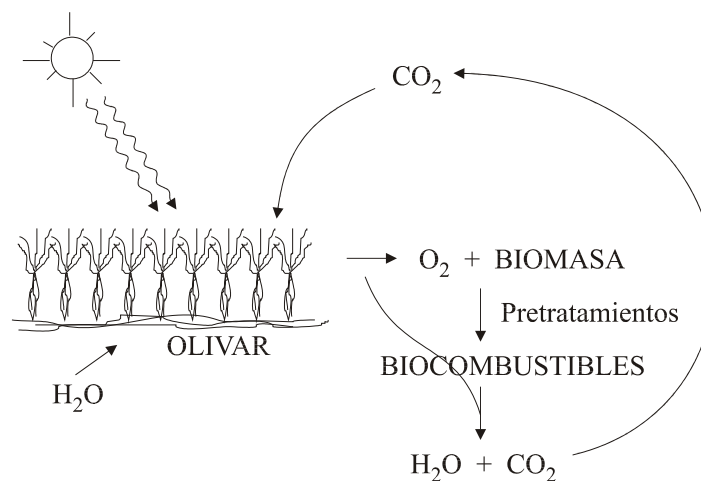


Fig. II.2. Ciclo del carbono

B) Biomasa residual

Se define como residuos aquellos materiales obtenidos a partir de la biomasa vegetal y que no tienen valor económico alguno para su proceso de generación. Dado el continuo desarrollo de la civilización cada vez se genera mayor cantidad de residuos que constituyen un grave problema por su cuantía y por sus consecuencias, fundamentalmente contaminantes. Dado que, mayoritariamente, son de carácter orgánico constituyen la denominada biomasa residual y por consiguiente son susceptibles de ser tratados para extraerles su contenido energético. Se estima que en el año 2000 se producían unos 2.000 kg de residuos por habitante y año con un contenido energético de unos 9.000 kwh/año (Jarabo y Elortegui, 2000). La

biomasa residual es la fuente de energía renovable más importante de España, representa casi el 52% de todas las energías renovables.

Actualmente el tratamiento de los residuos no es rentable, aunque sí presenta algunas ventajas si se realiza en los lugares de generación:

- Al existir previamente los residuos, con su poder contaminante asociado, su eliminación es una tarea necesaria
- Al tratarse donde se generan, los costes de transporte son menores
- A la ventaja de su eliminación se suma el valor añadido de los productos que de ellos se obtengan.

Considerando únicamente la biomasa residual, esta se ha clasificado con base en los diferentes sectores que la producen, Tabla II.2.

TABLA II.2
TIPOS DE RESIDUOS

SECTOR	ACTIVIDAD	RESIDUOS
Primario	Agraria	Agrícolas Forestales Ganaderos
Secundario	Transformación	Industriales
Consumo	Urbana	Residuos sólidos urbanos Lodos de aguas residuales

Los residuos agrícolas están constituidos principalmente por las plantas a las que se les ha retirado el fruto, así se pueden considerar la paja de cereales o la poda de frutales y viñedos. Por residuos forestales se consideran aquellos que se obtienen por el corte y elaboración de la madera o por los tratamientos selvícolas; y como residuos ganaderos se consideran los estiércoles de los animales. Todos estos residuos, fundamentalmente de carácter lignocelulósico, constituyen una materia prima renovable y abundante de aprovechamiento deseable (Tortosa *et al.*, 1992).

Los residuos industriales de naturaleza biomásica son aquellos procedentes de industrias que producen gran cantidad de residuos orgánicos, como son las conserveras, las almazaras, etc.

Se consideran residuos sólidos urbanos aquellos residuos procedentes de operaciones realizadas en el núcleo urbano y como lodos de aguas residuales las procedentes del tratamiento de depuración.

II.1.2 Aprovechamiento energético de la biomasa

Las vías de transformación de los distintos tipos de biomasa son muy variadas y la opción por un procedimiento u otro está condicionada por varios factores, como la naturaleza de la materia prima, el producto a obtener y el grado de desarrollo de la tecnología de que se dispone, Soler *et al.* (1981).

Dado el bajo contenido energético de la biomasa y su elevada humedad, es necesario transformarla en combustibles con mayor poder calorífico. Estos combustibles obtenidos presentan las características favorables de los combustibles fósiles y no sus inconvenientes, así, presentan algunas ventajas adicionales:

- El contenido en azufre es bajo
- No producen cenizas
- Dado su carácter renovable, contribuyen a preservar el medioambiente.

Según Menéndez (1999), la biomasa puede dirigirse a tres formas de energía. Por un lado, puede ser transformada en energía eléctrica en plantas térmicas, y por otro puede ser utilizada como combustible de uso directo en forma sólida o bien en estado líquido.

El uso de la biomasa para obtener electricidad presenta el inconveniente de un rendimiento de operación bajo por lo que su uso no es rentable. En cambio, sí puede ser transformada en combustibles sólidos, para su empleo en combustión u otros usos térmicos, de mayor rendimiento energético. Para este fin suelen utilizarse los residuos leñosos, agrícolas o forestales.

Otro posible uso es la transformación de la biomasa en combustibles líquidos. Las grasas que se obtienen de las semillas oleaginosas pueden esterificarse para obtener biodiesel; el etanol que se obtenga de cereales, caña o de los residuos lignocelulósicos también podría usarse como biocombustible.

En general, los procesos de transformación pueden clasificarse atendiendo al contenido en humedad del residuo en:

- Termoquímicos, para residuos secos.
- Bioquímicos, para residuos húmedos.

En la Figura II.3 se muestran los principales procesos de obtención de energía a partir de la biomasa (Jarabo *et al.*, 2002 y Demirbaş, 2001).

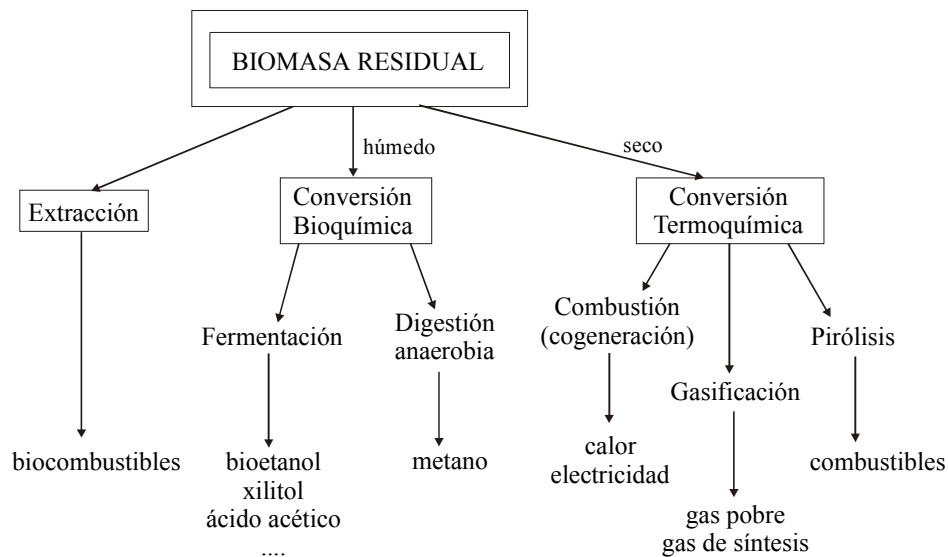


Fig. II.3 Procesos de transformación de la biomasa en energía

Los procesos de extracción están indicados para aquellas especies vegetales que contienen en su estructura hidrocarburos y compuestos de elevado contenido energético, como es el caso de la mayor parte de los cultivos energéticos. Un esquema del proceso se muestra en la Figura II.4 y básicamente consiste en la extracción con hexano y benceno, para obtener los combustibles, y el residuo, rico en hidratos de carbono, se fermenta para obtener etanol (Jarabo y Elortegui, 2000).

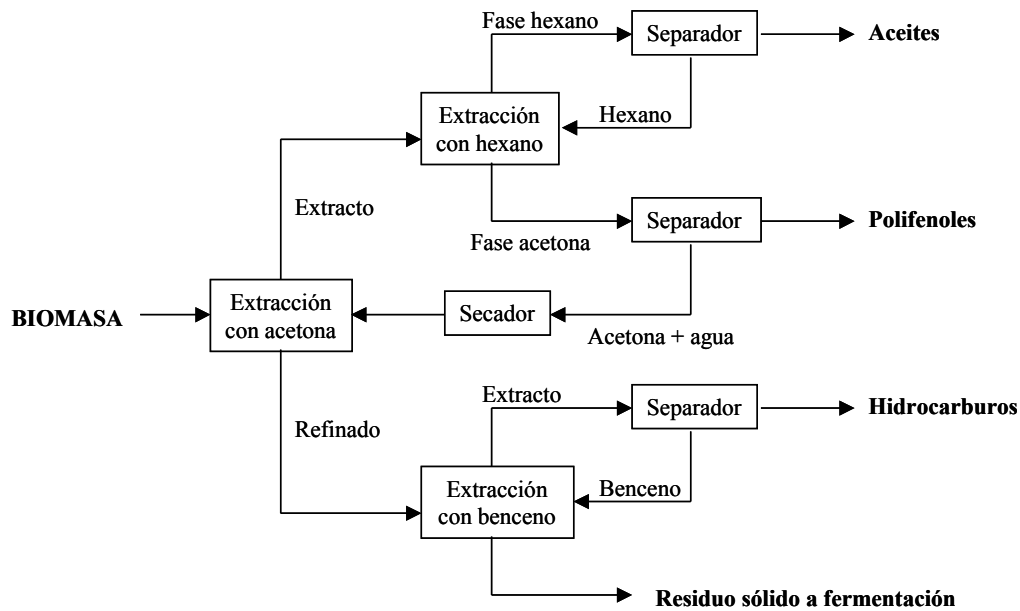


Fig. II.4 Proceso de extracción de biocombustibles

Los procesos termoquímicos consisten en tratar la biomasa a altas temperaturas en atmósferas más o menos oxidantes. Si se emplea un exceso de oxígeno, respecto del estequiométricamente necesario, el proceso se denomina combustión; si el oxígeno está limitado se tiene la gasificación y en ausencia total la pirólisis. Materiales idóneos para este tipo de tratamientos son los de bajo contenido en humedad y alto contenido en fibras (hemicelulosa y celulosa).

Los procesos bioquímicos se realizan con diversos microorganismos que degradan las moléculas complejas de la biomasa a otras más simples con alto contenido energético. Los materiales idóneos son aquellos con alto contenido en humedad.

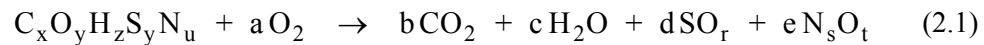
A) Procesos termoquímicos

Combustión

Es el proceso más antiguo de obtención de la energía contenida en la biomasa. Consiste en la oxidación de la biomasa, mediante el oxígeno del aire, es un proceso exotérmico y muy rápido, en el que se produce incremento de la temperatura y hay emisión de luz. Como productos de reacción se obtienen CO₂, H₂O y cenizas. Existen otros

componentes minoritarios en la biomasa como nitrógeno, cloro o azufre. El contenido en azufre de este tipo de materia prima es muy bajo por lo que las emisiones a la atmósfera de SO₂ son casi nulas y no existe corrosión en los equipos de combustión, por formación de H₂SO₄.

Considerando únicamente la composición de la materia orgánica que es oxidada completamente, por el oxígeno, la reacción de oxidación es la siguiente:



con desprendimiento de calor y formación de óxidos de azufre y nitrógeno.

Los factores más importantes a considerar en este proceso son:

- Exceso de O₂: del 20 al 40% al teórico necesario
- Temperatura de operación: entre 600 y 1.300 °C
- Características de la biomasa:
 - * Físicas: su densidad, tamaño y humedad deben ser lo menor posibles
 - * Químicas: bajo contenido en azufre
 - * Térmicas: dependen de las dos características anteriores

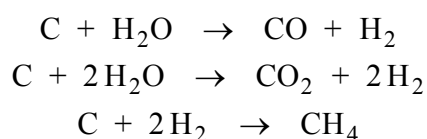
Según Castillo (1999), las características principales de la biomasa como combustible son:

- Heterogeneidad muy alta: tamaño, estacionalidad, etc.
- Poder calorífico muy variable. Depende de la composición (C, H, O, S) y humedad
- Bajo punto de ignición y gran velocidad de combustión
- Bajo contenido en cenizas

Considerando las dos primeras características, debe seleccionarse un sistema de combustión que permita las fluctuaciones de estas sin que se vea afectada la estabilidad de la operación.

Gasificación

Consiste en la oxidación parcial de la biomasa en un medio con falta de oxígeno. Como productos principales se obtienen CO₂, CO, H₂ y CH₄, aunque la relación entre ellos es variable según las condiciones experimentales utilizadas (temperatura, tamaño de partícula, velocidad de calentamiento, tiempo de residencia, presión, O₂, gases que constituyen la atmósfera de reacción, etc.) y de las características y humedad del sustrato utilizado. Las reacciones que tienen lugar son:



El proceso de gasificación de un combustible se divide en dos procesos fundamentales: pirólisis y posterior gasificación. Las condiciones de operación oscilan entre los 900 y 1.400°C y del 20 al 33% de oxígeno respecto del estequiométrico (García y Otero, 2000). Un esquema del proceso se muestra en la Figura II.5.

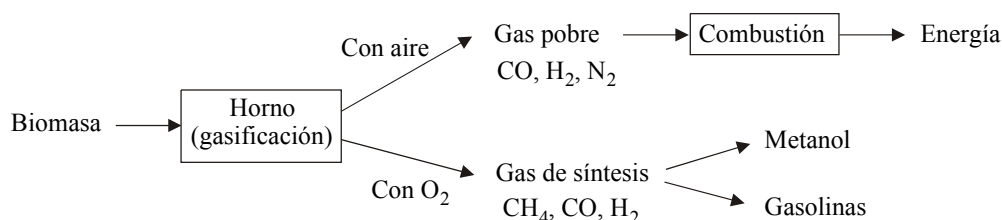


Fig. II.5 Gasificación de la biomasa

El gas pobre, como su nombre indica, tiene un bajo poder calorífico, entre 800 y 1.300 kcal/m³ y se obtiene con biomasa seca y una pequeña cantidad de aire.

Respecto del gas de síntesis, su poder calorífico es ligeramente superior al gas pobre, entre 1.200 y 2.600 kcal/m³, por lo que su utilización como combustible no es su principal uso sino que se emplea para la síntesis de combustibles líquidos. Se obtiene gasificando la biomasa con oxígeno y vapor de agua.

Son numerosos los estudios que tratan de obtener productos químicos y combustibles de alto poder calorífico y pequeña densidad a partir de residuos lignocelulósicos por procesos de pirólisis y gasificación, Bueno *et al.* (1985), Corella *et al.* (1985), Bilbao *et al.* (1985), Font

et al. (1985), Arias *et al.* (1985), Bain *et al.* (1998), Marcos (1999), Sanches (2002), Miles (2002), etc. Estos estudios parecen coincidir en utilizar un lecho fluidizado como el más adecuado para los procesos de pirólisis, siendo necesario mezclar los residuos con arena o algún componente inerte y pesado, para conseguir una buena fluidización, Corella *et al.* (1985) y Font *et al.* (1985). Minkova *et al.* (2000) estudian la pirólisis y gasificación simultánea de diferentes tipos de biomasa con vapor y con vapor + CO₂, e indican que pueden obtener gases de elevado contenido energético y carbón activado.

Pirólisis

Es el proceso mediante el cual se descompone la biomasa por efecto de la temperatura y en ausencia de oxígeno. Las temperaturas de operación suelen oscilar alrededor de los 450 °C y se obtienen como productos:

- Gases: H₂, CO_x e hidrocarburos
- Líquidos: hidrocarburos con oxígeno en la molécula
- Residuos sólidos: carbón, alquitrán y cenizas.

La composición de estos productos varía por la composición de la materia prima y por la temperatura y presión de operación.

Una modificación de este proceso, denominada licuefacción, incrementa el rendimiento en combustible líquido. En este proceso se adiciona un gas reductor a temperaturas entre 300 y 500 °C y a alta presión.

Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es la degradación de la materia orgánica mediante microorganismos en un ambiente de ausencia total de oxígeno, obteniéndose una mezcla gaseosa (biogás) de composición variable según sea el origen de la materia orgánica a biodegradar y un residuo sólido con elevado contenido en humedad (lodo). La composición del biogás oscila entre los límites siguientes (Ortega, 2001):

- Metano: entre el 50 y el 70%
- Dióxido de carbono: entre el 30 y el 40%
- Sulfuro de hidrógeno, hidrógeno y otros gases: <5%

Aunque el poder calorífico del biogás, así obtenido, depende de su contenido en metano, este oscila alrededor de las 5.000 kcal/m³.

Por otra parte, el lodo que se obtiene como residuo sólido, con un alto contenido en sales minerales de N₂, P₂, K, Ca y Mg, proteínas, grasas, celulosa, lignina, etc., puede utilizarse como fertilizante o para alimentación animal; realizándole, la mayoría de las veces, una degradación aerobia previa para reducirle el contenido en materia orgánica sin degradar.

Como materia prima puede emplearse cualquier tipo de biomasa, con la única salvedad de que el proceso debe realizarse en medio acuoso, máximo un 10% de sólidos. De cualquier forma, no todas las biomásas sirven por igual pues, ya que es un proceso microbiológico, la composición y el contenido en nutrientes son muy importantes. Por este motivo, la biomasa residual, especialmente la de origen animal o la urbana, es la más idónea para la digestión anaerobia. En la Figura II.6 se muestra un esquema del proceso.

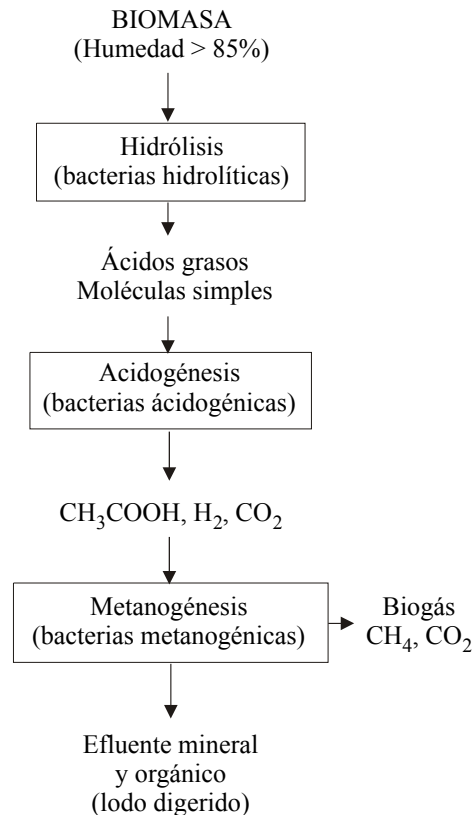


Fig. II.6 Digestión anaerobia

En la primera etapa de hidrólisis ciertas cepas de bacterias hidrolíticas degradan las macromoléculas de la biomasa (hidratos de carbono, grasas, proteínas, etc.) a ácidos grasos, polisacáridos y otros productos neutros.

En la segunda etapa, acidogénesis, un grupo de bacterias acidogénicas generan ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono, que servirán de alimento a las bacterias metanogénicas.

En la tercera etapa, las bacterias metanogénicas generan el metano a partir de los productos de las etapas anteriores. Estas bacterias, estrictamente anaerobias, poseen una velocidad específica de crecimiento muy baja y necesitan condiciones óptimas por lo que la producción final de metano está muy condicionada por esta población.

Aunque puede realizarse la digestión anaerobia a diferentes temperaturas, por cuestiones de rentabilidad y control del proceso se suele trabajar entre 32 y 35 °C, dentro del rango de las bacterias mesofílicas, y a un pH de 7.

B) Procesos bioquímicos

Fermentación

Las plantas almacenan la energía del sol en forma de carbohidratos, macromoléculas formadas por otras más pequeñas denominadas sacáridos o azúcares. Estos polisacáridos no son fermentables por las levaduras y por tanto deben someterse a procesos previos de degradación para que liberen los monosacáridos, que sí son fermentables, Figura II.7.

El proceso global de obtención de bioalcohol, fundamentalmente etanol, se realiza normalmente en las cuatro etapas siguientes:

- Pretratamiento
- Hidrólisis
- Fermentación
- Separación y purificación del alcohol obtenido.

La hidrólisis tiene como objetivo romper las macromoléculas (polisacáridos), difícilmente fermentables, en otras más pequeñas (mono y disacáridos), fácilmente fermentables en medio acuoso. El proceso de hidrólisis puede realizarse mediante el empleo de ácidos (hidrólisis ácida) o mediante la utilización de enzimas (hidrólisis enzimática) capaces de romper los enlaces glucosídicos. Normalmente la hidrólisis enzimática está precedida de un tratamiento químico en medio básico que ataca la lignina y esponja las cadenas de celulosa por lo que se facilita el acceso de los enzimas a los centros de reacción. Actualmente está en consideración otra alternativa que es la hidrólisis en condiciones hidrotérmicas. Existen otros tratamientos químicos en medio básico que tienen como objetivo eliminar lignina y romper las cadenas de hemicelulosa y celulosa.

Obtenido el jugo fermentable, al que se hace mención en la Figura II.7, se procede a la fermentación alcohólica, mediante levaduras que transforman los azúcares presentes en etanol y xilitol, fundamentalmente. El rendimiento de la conversión de glucosa en etanol es como máximo de alrededor del 51% (Ortega, 2001) pero en la práctica este valor es menor dado

que la levadura emplea una fracción en la producción de nuevas células y otros compuestos de su metabolismo.

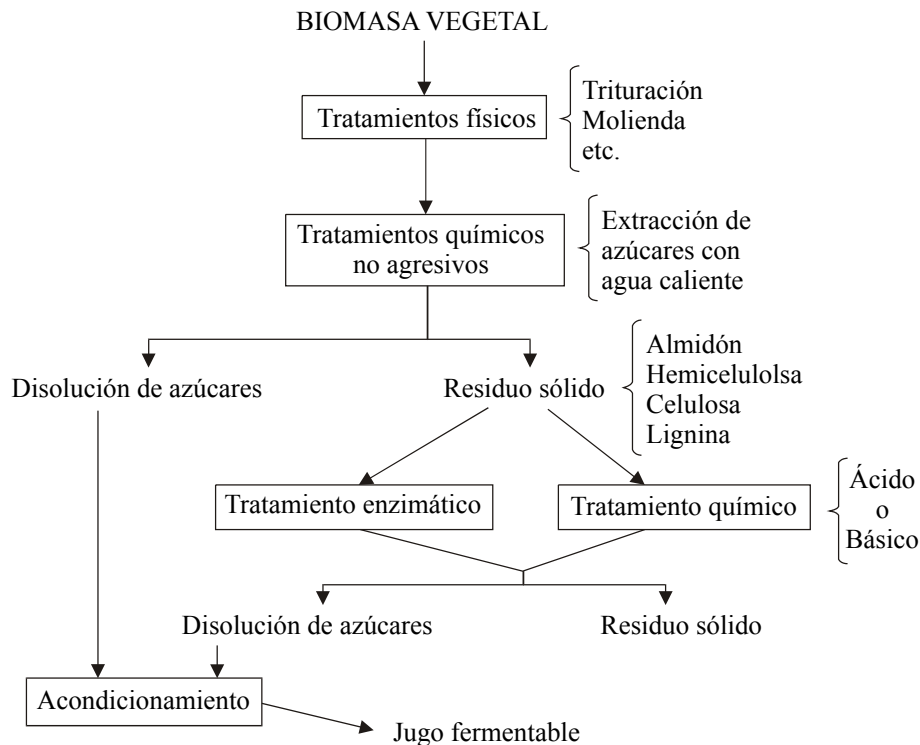


Fig. II.7 Pretratamiento e hidrólisis de la biomasa residual

Aunque los factores que afectan al proceso de fermentación son dependientes de la cepa de levadura empleada estos suelen oscilar alrededor de los valores que se muestran:

- Temperatura: normalmente, el valor óptimo oscila entre los 30 y los 40 °C
- pH: el valor límite inferior es 3,5 y el superior 5,5
- Concentración de azúcares: debe ser inferior al 22%. Valores superiores pueden inhibir el crecimiento celular.
- Concentración de etanol: valores superiores al 14% pueden provocar la muerte de las levaduras.

La fermentación es un proceso exotérmico por lo que debe controlarse la temperatura de operación. Igualmente, durante el proceso se forman ácidos por lo que también debe controlarse el pH del medio.

Tras la fermentación debe separarse el etanol del resto del medio y para ello se emplea la diferencia de temperaturas de ebullición en la operación básica unitaria de destilación. Otra alternativa es la separación simultánea mediante el uso de un sistema de un sistema de membranas.

El etanol que se utiliza hoy día proviene, en su mayoría, de las industrias del petróleo y del gas natural, aunque una fracción importante se obtiene por fermentación de los bagazos de las fábricas azucareras y la materia vegetal rica en hidratos de carbono. Su uso principal es como materia prima de la industria química y farmacéutica, pero también puede ser usado como sustituto parcial o total de la gasolina, formando parte de los denominados biocombustibles.

Los biocombustibles líquidos, también denominados biocarburantes, son productos que se emplean como sustitutivos de la gasolina y del gasóleo de vehículos y son obtenidos a partir de materias primas de origen agrícola (Calle, 2002). Existen dos tipos de biocarburantes:

- Bioetanol (o bioalcohol): es el alcohol obtenido por fermentación.
- Biodiesel (biogasóleo o diéster): son metilésteres de los aceites vegetales obtenidos por reacción de los mismos con metanol con producción de glicerina como producto secundario. Los metilésteres de los aceites vegetales poseen características físicas y físico-químicas muy parecidas al gasóleo con el que pueden mezclarse en cualquier proporción y utilizarse en los vehículos diesel convencionales sin necesidad de introducir modificaciones en el diseño básico del motor.

A diferencia del etanol, las mezclas con biodiesel no modifican significativamente gran parte de las propiedades físicas y fisicoquímicas del gasóleo, tal como su poder calorífico.

Considerados los diferentes procesos de aprovechamiento energético de la biomasa, en la Tabla II.3 se muestra un resumen de cuales son los procesos de transformación más recomendados, según diferentes autores, para cada tipo de biomasa, así como los bioproductos que se obtienen.

TABLA II.3
 PROCESOS DE TRANSFORMACIÓN MÁS ADECUADOS
 PARA DISTINTOS TIPOS DE BIOMASA

Tipos de biomasa	Procesos termoquímicos	Procesos bioquímicos	Productos obtenidos	Referencias
Cultivos energéticos acuáticos y terrestres		- Biometanación	- Metano, metanol	- Chapman (1978)
Residuos agrícolas y forestales; especies leñosas y semileñosas	- Combustión		- Calor, combustibles	- Jiménez <i>et al.</i> (1987) - Litzen <i>et al.</i> (1990)
	- Pirólisis		- Carbón, aceites	- Bridgwater (1990) - Rodríguez <i>et al.</i> (1989)
	- Gasificación		- Metanol y gases	- Corella <i>et al.</i> (1990) - Elórtogui <i>et al.</i> (1985)
	- Licuefacción		- Combustibles líquidos	- Levy-Lambert (1980) - Chaparro (1989)
Residuos animales		- Biometanación	- Metano	- Paris <i>et al.</i> (1990)
Residuos sólidos urbanos	- Combustión		- Calor, combustibles	- Hewstock (1978)
	- Gasificación			
	- Licuefacción			
	- Pirólisis		- Combustibles líquidos	- Helt y Agrawal (1988) - Lago <i>et al.</i> (1987) - Chaparro (1989)
Especies herbáceas		- Hidrólisis y fermentación	- Etanol	- Fanta <i>et al.</i> (1984)

II.1.3 Ventajas e inconvenientes de la biomasa como forma de energía

El uso energético de la biomasa presenta una serie de ventajas interesantes: su carácter renovable, su capacidad de almacenar la energía solar en forma de energía reutilizable y, sobre todo, su capacidad de reducir la contaminación atmosférica.

La combustión de la biomasa y de sus derivados produce menores cantidades de óxidos de nitrógeno y de azufre y desprende menores cantidades de CO₂ que cualquier otro combustible. Además, la producción de biomasa contribuye a la fijación del CO₂ y, por tanto, a la corrección del efecto invernadero.

Considerando la sustitución de los combustibles fósiles por la biomasa, de origen herbáceo o leñoso, y el aumento de la superficie de los bosques como sumideros del CO₂, el balance de CO₂ desprendido se hace claramente negativo. Por otra parte, el impacto ambiental de los biocombustibles es inferior a los de las industrias petroquímicas, nucleares o de carbón, al ser los residuos de baja o nula toxicidad y fácilmente degradables.

Al utilizar la biomasa residual, agrícola e industrial, para producir energía se evita tener que quemarla *in situ* y con ello el riesgo de incendios y la consecuente contaminación atmosférica y degradación del suelo. Retirar los residuos forestales de los montes protege el suelo y el entorno y como consecuencia, se consigue una mejor regeneración natural de la masa forestal, mejor crecimiento del arbolado y la calidad de éste, menor peligro de plagas e incendios y más facilidad para realizar otras operaciones selvícolas.

A todas las ventajas medioambientales deben sumarse las de carácter social: se mantienen los niveles de trabajo y se aumenta la renta per cápita, se evita el desplazamiento de la población y el abandono de las tierras de cultivo y se disminuye la dependencia energética del exterior.

Sin embargo, con el empleo de la biomasa no todo son ventajas, también existen algunos inconvenientes, los principales son: bajo rendimiento de conversión y necesidad de gran superficie de cultivo (se necesitan 50 Ha de bosque para captar la misma energía que captaría 1 Ha de paneles solares). Tiene un elevado coste de producción y procesado (triturar, moler, secar, compactar, etc.). Su producción es estacional, especialmente los residuos agrícolas. Se encuentra muy dispersa en el espacio y ocupa un gran volumen en estado fresco, con los inconvenientes de recolección, transporte y almacenamiento que ello supone.

Finalmente, para que la biomasa pueda contribuir a cubrir la demanda energética, es de primordial importancia incrementar el cultivo de los bosques, crear plantaciones de apoyo, promover el aprovechamiento integral de las plantas y hacer un aprovechamiento racional de los residuos. Además, debe desarrollarse la tecnología de aprovechamiento y debe promocionarse, por parte de las autoridades competentes, la utilización de los biocombustibles (Alonso, 2002 y Carrasco, 2001).

II.2 RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Los residuos de carácter lignocelulósico constituyen una materia prima renovable y abundante, cuyo aprovechamiento es deseable. Estos, constituidos por la madera y los residuos forestales y agrícolas, continúan siendo la principal fuente de energía primaria para más de 2.000 millones de personas, principalmente en el tercer mundo, que la utilizan para la producción de calor por combustión directa.

En la Figura II.8 se muestran los principales constituyentes de los residuos lignocelulósicos, siendo los componentes mayoritarios celulosa, hemicelulosa y lignina.

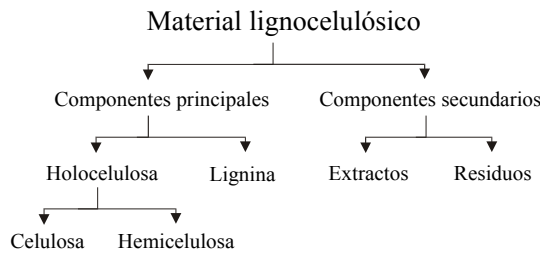


Fig. II.8 Principales componentes de la biomasa lignocelulósica

McGinnis *et al.* (1983b) indican los valores que se muestran en la Tabla II.4 para diversos tipos de biomasa residual de carácter lignocelulósico, datos que son coincidentes con los propuestos por U.S.Department of Energy (2002). Estos porcentajes corresponden a maderas a las que se les ha eliminado los extractos y las cenizas y están expresados en base seca.

TABLA II.4
COMPOSICIÓN DE ALGUNOS RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Tipo de material	Celulosa, %	Hemicelulosa, %	Lignina, %
Maderas blandas	45-50	25-35	25-35
Maderas duras	40-55	24-40	18-25
Forrajes, paja de cereales, caña de azúcar	25-40	25-50	10-30
Basuras urbanas ⁽¹⁾	61	2	9

⁽¹⁾ Después de eliminar plásticos y metales

Los residuos lignocelulósicos se caracterizan por ser estacionales en cuanto a su producción, se generan de forma muy dispersa, su tamaño es muy heterogéneo y, sobre todo, se trata de sólidos de densidad muy pequeña.

II.2.1 Composición de los residuos lignocelulósicos

Celulosa

Es la sustancia orgánica más abundante en la naturaleza y el componente mayoritario de la pared celular de los vegetales, es la forma más común de encontrar el carbono de la biomasa, tiene gran capacidad para absorber el agua y es un polisacárido de 200 moléculas, como mínimo, de D-glucosa, de cadena lineal, altamente orientado y cristalino. En la madera puede llegar a tener de 7.000 a 10.000 unidades de D-glucosa, según Bhat y Hazlewood (2001) el grado de polimerización puede variar entre 500 y 14.000.

Los monómeros de D-glucosa, en la forma piranosa, se enlazan fuertemente mediante enlaces β -1,4-glucosídicos formando cadenas muy estables, que a su vez se unen con las adyacentes mediante enlaces de hidrógeno, por lo que el conjunto es muy resistente al ataque químico. Las cadenas individuales son flexibles pero unidas con las adyacentes adquieren bastante rigidez. En la Figura II.9 se muestra la cadena de celulosa y el enlace que existe entre moléculas consecutivas de D-glucosa. El disacárido de D-glucosa se denomina celobiosa (entre paréntesis).

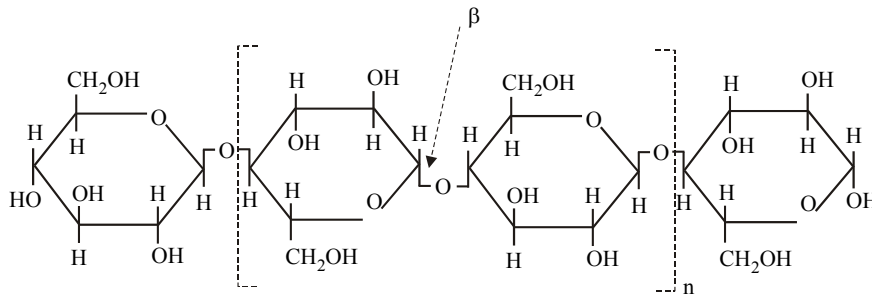


Fig. II.9 Molécula de celulosa

En algunas zonas las cadenas de celulosa son muy ordenadas y los enlaces de hidrógeno fuertes por lo que su estructura es cristalina, pero en otras zonas el alineamiento no es bueno y los enlaces de hidrógeno son pocos y débiles, resultando una estructura amorfa. Por tanto, existen dos tipos de celulosa, una muy cristalina denominada α -celulosa y otra amorfa, la β -celulosa (Figura II.10). La conversión del tipo α al β se puede conseguir mediante álcalis. El grado de cristalinidad de

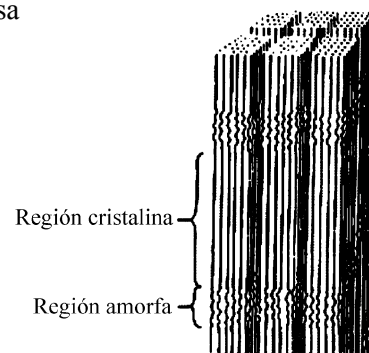


Fig. II.10 Tipos de celulosa

una celulosa depende del residuo que se considere. Las regiones cristalinas son difícilmente atacables por ácidos y enzimas mientras las zonas amorfas sí se hidrolizan con facilidad.

La celulosa es insoluble en agua fría y caliente y en disolventes orgánicos tales como etanol, benceno, éter, cloroformo y tetracloruro de carbono. Es muy poco soluble en disoluciones diluidas de ácidos y álcalis. Sin embargo, es muy soluble en ácido sulfúrico del 72% y en ácido clorhídrico del 44%. Su degradación, aunque importante, es menos notoria en ácido fosfórico del 85%.

Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo componente estructural de la materia lignocelulósica más abundante y junto con la celulosa, forma parte de las paredes celulares de las plantas y se extrae fácilmente con álcalis. La hemicelulosa está constituida por polisacáridos lineales altamente ramificados con pentosas y hexosas en su estructura. La estructura química y composición varían según la especie vegetal que se considere. Dependiendo de los principales azúcares que formen las cadenas de hemicelulosa, estos polisacáridos pueden llamarse xilanos, glucomanos, galactanos y arabinanos, siendo los componentes más importantes de las hemicelulosas, los xilanos y los glucomanos.

Los xilanos de plantas anuales son más heterogéneos que los de plantas perennes y se denominan arabinoxilanos. Hay dos tipos de arabinoxilanos, uno muy ramificado y sin ácido urónico, que se encuentran principalmente en la paja de cereales, y otro muy poco ramificado, con ácido urónico y con galactosa que se encuentra en los tejidos lignificados. En la Figura II.11 se muestra una cadena típica de arabinoxilano (Bhat y Hazlewood, 2001). El principal componente de la hemicelulosa es el acetato de 4-O-metilglucorano xilano y está constituido por una parte de ácido 4-O-metil- α -D-glucorónico, 10 partes de β -D-xilosa y siete partes de O-acetil- β -D-xilosa (Wright, 1987).

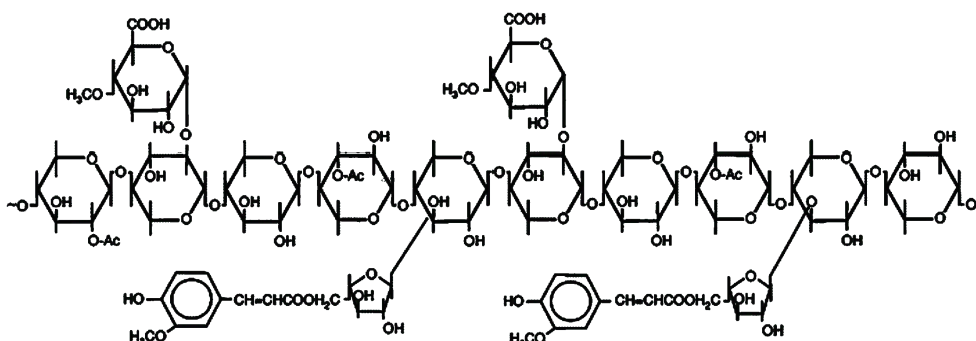


Fig. II.11 Hemicelulosa (acetato de 4-O-metilglucorano xilano)

El grado de polimerización de las cadenas de hemicelulosa es variable entre 100 y 200 unidades de azúcar. La hemicelulosa contiene, como azúcares constituyentes, D-xilosa, D-xilulosa y L-arabinosa de 5 carbonos (pentosas) y D-glucosa, D-galactosa y D-manosa de 6 carbonos (hexosas) además de ácido urónico; si el contenido de este es alto, la hemicelulosa se denominará ácida, y neutra, si no es así. A veces, los azúcares son sustituidos por ácido acético. El contenido en D-xilosa de las hemicelulosas de maderas duras es mayor que el correspondiente a maderas blandas y su estructura es amorfa por lo que, con ácidos, se hidroliza fácilmente a sus azúcares individuales. La acción de los ácidos deshidrata fácilmente las pentosas a furfural.

Lignina

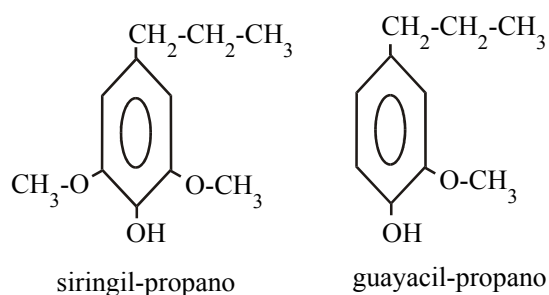


Fig. II.12 Algunos componentes de la lignina

La naturaleza específica de la lignina de la madera varía con la procedencia de esta, pero esencialmente es un polímero aromático tridimensional, de estructura muy grande y ramificada, de fenilpropano con grupos fenólicos, siendo sus unidades fundamentales guayacil-propano y siringil-propano, Figura II.12, (Chang y Sarkanen, 1973).

Deacon (1997) indica que la molécula de lignina está formada por las tres principales unidades de fenilpropano unidas por diferentes tipos de enlaces, que se muestran en la Figura II.13 de forma muy simplificada, aunque en realidad, no se conoce la estructura exacta de la lignina.

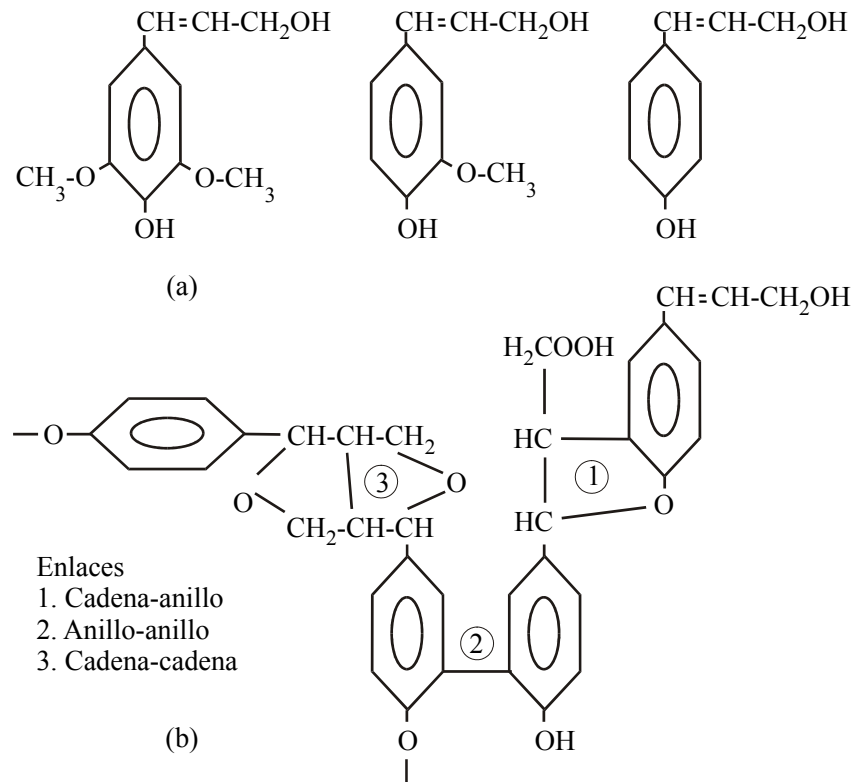


Fig. II.13 a) Principales componentes en la lignina y
 b) Principales tipos de enlaces

La lignina da consistencia a la madera seca, su misión es cementar las fibras de madera, proporcionar rigidez a las mismas y actuar como barrera contra la degradación enzimática de la pared celular. Actúa como un cemento entre las fibras de celulosa y es un endurecedor de estas. Su peso molecular es superior a 10.000 g/mol. Debido al alto contenido de los compuestos aromáticos fenólicos, las ligninas presentan color oscuro y son fácilmente oxidadas. Son relativamente estables en medios ácidos minerales acuosos, pero son solubles en bases acuosas y en bisulfito caliente.

La lignina queda como residuo tras los procesos de hidrólisis por lo que puede ser utilizada como combustible, pero puede incrementarse su valor añadido si se depolimeriza y los productos obtenidos se emplean como aditivos de alto octanaje para combustibles.

Es un compuesto muy difícil de degradar, aunque puede realizarse, enzimáticamente, por transferencia de electrones a la molécula y posterior reacción en cadena hasta que se obtienen los componentes individuales (combustión enzimática). Los microorganismos que logran atacarla producen varios tipos de enzimas:

- Lignina peroxidasa (lignanasa): contiene hierro en su molécula, opera aceptando un par de electrones del H₂O₂ y después los traspasa a la lignina.
- Manganeso peroxidasa: opera de forma similar a la lignanasa.
- Lacasa: es una fenol oxidasa que oxida directamente la lignina.
- Enzimas generadoras de H₂O₂: como la glucosa oxidasa, que es capaz de generar el peróxido de hidrógeno a partir de glucosa.

Extractos

Otros componentes que existen, en menor proporción, en los materiales lignocelulósicos son compuestos orgánicos, extraíbles mediante diversos disolventes, denominados extractos. Los extractos, componentes no estructurales, están constituidos principalmente por terpenos y ceras; y en general son pectinas, grasas, terpenos, fenoles, taninos, etc.; aunque también puede haber ácidos orgánicos como el urónico.

- Pectinas: están formadas por un polisacárido vegetal constituido en su mayor parte por ácido galacturónico. Debido a sus enlaces cruzados adopta forma de gel y es soluble en agua caliente. Su estructura puede estar formada hasta por 1.000 monosacáridos.
- Gomas: son polisacáridos complejos que forman sustancias viscosas y son segregadas por algunos vegetales como respuesta a las agresiones. Son solubles y su estructura está constituida por largas cadenas de ácido urónico, D-xilosa, D- manosa o L-arabinosa.
- Mucílagos: los pentosanos, los hexosanos, el ácido urónico, etc. son elementos que, en contacto con el agua, forman disoluciones viscosas e incluso pueden hincharse para formar una pseudo disolución gelatinosa; son solubles y pueden considerarse como hemicelulosas neutras.

Cenizas

Los restos que quedan tras la incineración de la biomasa lignocelulósica, sales minerales, se denominan cenizas.

II.2.2 Aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos

Dado que los residuos lignocelulósicos en su mayor parte están constituidos por polisacáridos (celulosa, hemicelulosa, etc.), cuando son completamente hidrolizados se obtiene una disolución rica en azúcares (hidrolizado), a partir de la cual puede determinarse el potencial máximo de azúcares del residuo. Así, en la Tabla II.5 se indican rangos de contenido en azúcares, de 5 y 6 carbonos, de diversos materiales y se complementa con el contenido en lignina y cenizas (U.S. Department of Energy, 2002).

TABLA II.5
COMPOSICIÓN EN AZÚCARES, LIGNINA Y CENIZAS
DE ALGUNOS MATERIALES

Tipo de material	Hexosas, %	Pentosas, %	Lignina, %	Cenizas, %
Maderas blandas	41-57	8-12	24-27	0,1-0,4
Maderas duras	39-50	18-28	15-28	0,3-1,0
Residuos agrícolas	30-42	12-39	11-29	2-18

Para incrementar la baja rentabilidad de los procesos de hidrólisis de los residuos lignocelulósicos se recurre al aprovechamiento integral de cada uno de sus componentes. Así, en la Tabla II.6 se muestran los productos y aplicaciones que pueden obtenerse de las diferentes fracciones (González *et al.*, 1990).

A los residuos lignocelulósicos, como biomasa residual, pueden aplicarse los mismos procesos que ya se han indicado en la Figura II.3. Camacho *et al.* (1985) indican como vías más prometedoras para el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos las basadas en procesos bioquímicos y fundamentalmente aquellas que conducen a la obtención de etanol y a la producción de biomasa (SCP), aunque también deben considerarse aquellas cuyo objeto

es obtener combustibles de alto poder calorífico, como son la pirólisis y la gasificación, Figura II.14.

TABLA II.6
PRINCIPALES PRODUCTOS Y APLICACIONES DE CADA UNA DE LAS
FRACCIONES DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

Xilosa	<ul style="list-style-type: none"> - Xilitol (edulcorante) - Proteína unicelular (alimentación) - Etanol - Productos de fermentación de alto valor añadido
Glucosa	<ul style="list-style-type: none"> - Fructosa (edulcorante) - Etanol - Productos de fermentación de alto valor añadido (aminoácidos, enzimas, etc.) - Proteína unicelular (alimentación)
Lignina y derivados	
Vainillina	- Combustible para hornos
Mezclas fenólicas	- Aditivos para estabilizantes o dispersantes
Ácido ferúlico	- Colas formofenólicas
Lignosulfonatos	
Etanol	<ul style="list-style-type: none"> - Disolvente - Síntesis petroquímica (vía etileno) - Diluyente para gasolinas - Alimentación

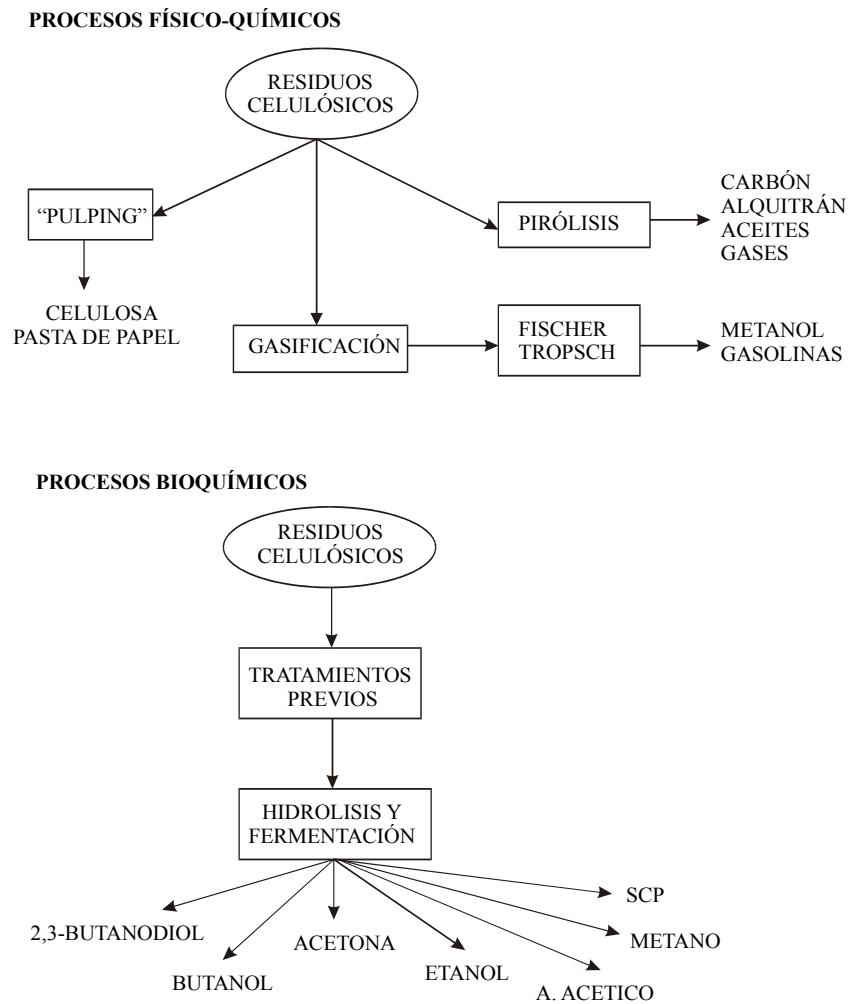


Fig. II.14 Principales vías de aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos (Camacho *et al.*, 1985)

A) Procesos físico-químicos

Los más importantes son los procesos de "pulping" (obtención de celulosa y pasta de papel) (Jiménez y Sánchez, 1989) y los de pirólisis y gasificación.

Mediante los procesos de pirólisis y gasificación, los productos obtenidos son diversos y en cantidades muy variables según las condiciones experimentales utilizadas (temperatura, tamaño de partícula, velocidad de calentamiento, tiempo de residencia, presión,

gases que constituyen la atmósfera de reacción, etc) y el sustrato utilizado (Corella *et al.*, 1985 y Font *et al.*, 1985). La pirólisis de los residuos empieza a unos 200°C con la degradación de las hemicelulosas. La celulosa se degrada entre 240°C y 300°C (Bilbao *et al.*, 1985) produciéndose siempre una mezcla de CO y CO₂, compuestos volátiles, hidrocarburos de cadenas cortas, furfural y un residuo sólido carbonoso. A medida que aumenta la temperatura desciende el rendimiento en líquidos y aumenta el de gases, (Font *et al.*, 1985). A temperaturas superiores a 900°C se obtienen productos de alto contenido en H₂, CO₂, CO, CH₄ y C₂H₄.

También de la fracción lignínica es posible obtener productos químicos de gran interés como CO, CO₂, CH₄, C₂H₄, C₃H₆ y carbón con tiempos de residencia de 2-3 segundos (Antal, 1983).

La obtención de hidrocarburos de cadena corta, CO e H₂ mediante un proceso de gasificación, seguido de la síntesis de Fisher-Tropsch produce hidrocarburos alifáticos de cadena lineal (gasolinas) y derivados oxigenados (metanol).

Existen otras posibilidades de aprovechamiento físico-químico de los residuos como es la oxidación húmeda de la madera a altas temperaturas (170-280°C) para la obtención de productos orgánicos, fundamentalmente ácido fórmico, ácido acético y metanol. (McGinnis *et al.*, 1983a).

B) Procesos bioquímicos

La conversión bioquímica consiste en la transformación de los polisacáridos en sus constituyentes individuales y a continuación son transformados biológicamente, según el proceso, en el producto elegido. Para llegar a obtener los monómeros se realiza previamente un pretratamiento a los residuos celulósicos, mediante el cual se facilita el acceso de los agentes hidrolíticos a los lugares de reacción, los enlaces β-1, 4-glucosídicos. Los objetivos de los pretratamientos son dos: eliminar la barrera de lignina que protege las fibras y reducir la cristalinidad de la celulosa (Carrasco *et al.*, 1992a).

Si se realiza la hidrólisis enzimática de los residuos el pretratamiento facilita el acceso de los enzimas hasta las fibras de hidratos de carbono, y si la hidrólisis es ácida, aunque no es necesario, un pretratamiento incrementa la velocidad de hidrólisis. Con la

posterior fermentación pueden obtenerse distintos productos químicos como butanol, acetona, ácido acético, metano, etanol, SCP (single cell protein), etc.

De todos los procesos, los que sin duda han recibido mayor atención son la producción de metano (biogás), que se obtiene por digestión anaerobia con microorganismos adecuados, y sobre todo, la producción de etanol y SCP.

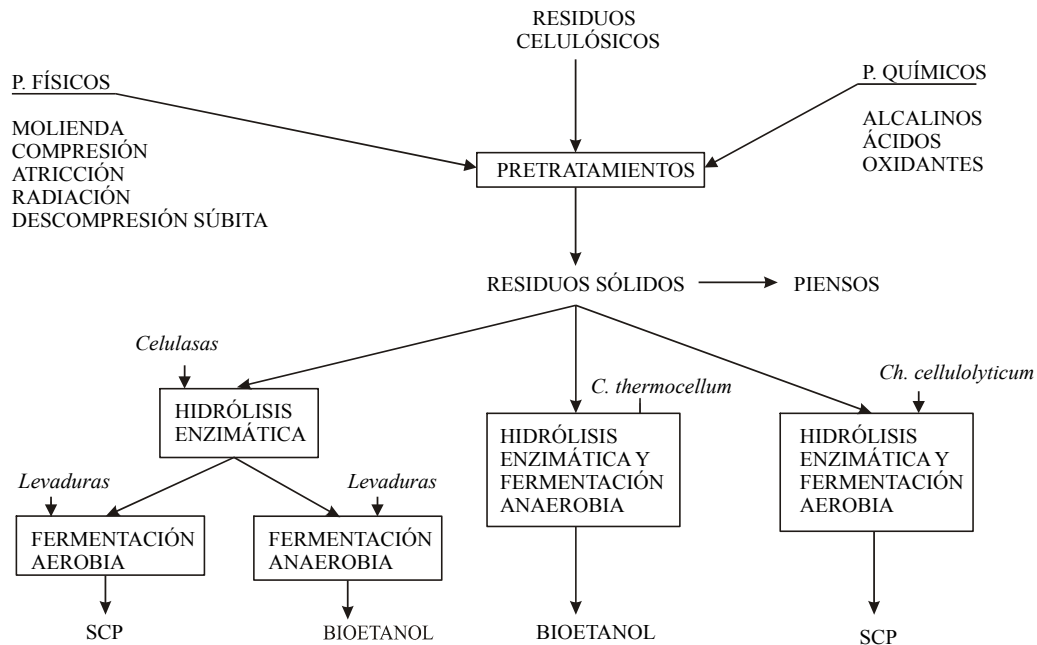
Producción de SCP

Los residuos lignocelulósicos se caracterizan por su bajo contenido en proteínas, baja digestibilidad, pobre palatabilidad y gran densidad aparente, por lo que su utilización directa en alimentación animal es poco recomendable; en todo caso, aquellos residuos cuyo contenido en proteína bruta sea inferior al 8% no son recomendables como pienso.

Así pues, la posible utilización de estos residuos como piensos implica aumentar al menos su contenido en proteínas y su digestibilidad. Lo segundo se consigue mediante pretratamientos adecuados y lo primero mediante la utilización de hongos y levaduras capaces de aprovechar estos sustratos para su nutrición y crecimiento.

Mediante los pretratamientos tan sólo se consigue aumentar la digestibilidad ya que al disminuir la cristalinidad y eliminar, en parte, la barrera física que supone la lignina, la celulosa es más fácilmente atacable por el rumen del jugo intestinal o por los microorganismos celulolíticos que se utilizan en la producción de SCP. Estos pretratamientos pueden ser tan sencillos como, por ejemplo, molturar los residuos o bien macerarlos con disoluciones diluidas de NaOH.

Como se muestra en la Figura II.15, la obtención de SCP se realiza en primer lugar mediante una hidrólisis enzimática con celulasas, para liberar los azúcares de las cadenas de celulosa, seguida de una fermentación aerobia. También se pueden utilizar microorganismos que permiten realizar ambos procesos (hidrólisis y fermentación) de forma simultánea (ej.: *C. thermocellum*, *C. thermohydrosulfuricum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida acidothermophilum*, etc.), (Lee, 1997; Sun y Cheng, 2002).

Fig. II.15 Obtención de etanol y SCP (Camacho *et al.*, 1985)

Obtención de etanol

La vía del etanol es interesante debido a las ventajas que en principio presenta esta sustancia como materia prima básica para la Industria Química y por su posible utilización como combustible en motores de explosión (Yu y Miller, 1980).

Los métodos utilizados para la obtención de etanol, al igual que con la producción de SCP, se dividen en dos grandes grupos según que la hidrólisis y la fermentación se realicen secuencial o simultáneamente en el mismo reactor, Figura II.15, (Wilke *et al.*, 1983 y Pye y Humphrey, 1979).

La conversión secuencial, la más desarrollada, consta de dos procesos: hidrólisis de la hemicelulosa y celulosa y fermentación de los monosacáridos obtenidos. Por hidrólisis se considera, normalmente, el proceso mediante el cual se liberan los azúcares reductores de las cadenas de hemicelulosa y celulosa. Este proceso, normalmente se realiza mediante tratamiento enzimático aunque también pueden aplicarse ácidos para tal fin. Por fermentación

se considera el proceso de transformación de los azúcares en etanol o xilitol mediante hongos o bacterias que los metabolizan.

Las dificultades más importantes que se presentan en los procesos de hidrólisis enzimática son debidas a la baja actividad de las celulasas (que además resultan ser excesivamente caras), a la inexistencia de microorganismos capaces de realizar eficientemente la hidrólisis y fermentación simultáneas y, sobre todo, a la propia estructura de los sustratos.

Desde el punto de vista fisico-químico las dificultades son inherentes al sustrato, es decir, son las debidas a la porosidad que presenta el residuo, a la estructura cristalina de la celulosa y a la barrera física que supone la lignina. La lignina, y en parte también la hemicelulosa, impide el acceso de las celulasas a las cadenas de fibras, con lo que reducen la eficiencia de la hidrólisis. La cristalinidad de la celulosa afecta notablemente a la velocidad del ataque enzimático.

Comparado con la celulosa, la hemicelulosa es fácilmente hidrolizable, debido a su estructura amorfa, tanto por ácidos como por enzimas. La presencia de esta incrementa el rendimiento de la hidrólisis pero presenta el inconveniente de que aporta a la disolución azucarada (hidrolizado) pentosas y sus productos de degradación.

Al objeto de eliminar, total o parcialmente, la lignina, reducir la cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad, se hace necesario someter al residuo a diferentes pretratamientos que favorezcan la hidrólisis posterior.

II.3 RESIDUOS DE PODA DE OLIVO

La poda del olivar supone un gran volumen de biomasa residual en España, Andalucía y muy especialmente en la provincia de Jaén y provincias limítrofes, y como tal es objeto de estudio e investigación, pues al igual que el resto de los residuos lignocelulósicos constituye una materia prima renovable y abundante.

La biomasa procedente de la poda del olivar resulta de la operación que se aplica a los árboles tras la recolección de la aceituna, normalmente se realiza cada dos años, para contribuir a mantener las copas de los árboles perfectamente aireadas e iluminadas.

La poda es una operación absolutamente necesaria dada la organización, la fisiología y la longevidad del olivo y tiene por finalidad mejorar la producción y conservar la vitalidad del árbol. Se trata de una operación necesaria si se quiere mantener el equilibrio entre las funciones vegetativas y reproductivas del olivo.

II.3.1 Producción

Según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, la superficie dedicada al cultivo del olivar en España en el año 2000 fue de 2,4 millones de hectáreas. Si se considera el ratio propuesto por Sansoucy (1985), respecto de la superficie de olivar cultivada en España y en el resto del mundo, de 0,329 se puede calcular una superficie de olivar, para ese mismo año 2000, en el mundo de 7,3 millones de hectáreas.

En la Tabla II.7 puede observarse que la superficie dedicada al cultivo del olivar está concentrada, básicamente, en Andalucía con 1,45 millones Ha, lo que supone un 61,5% de la superficie total a nivel nacional; por tanto, los ramones de olivo están repartidos muy desigualmente por la geografía española. Según el último Censo Agrario, realizado en 1999 por el Instituto Nacional de Estadística, el número de explotaciones de olivar en España es de 602.250, de las cuales 243.867 se encuentran en Andalucía.

Datos más recientes, de mayo de 2003, para la Comunidad Autónoma Andaluza y la provincia de Jaén son los recogidos en la Tabla II.8 en la cual se muestra la superficie ocupada por el cultivo del olivar, distinguiendo entre la producción de olivar empleada para aceituna de mesa o de almazara. Como puede apreciarse, sólo la provincia de Jaén representa

casi el 40% de la superficie total destinada al olivar en Andalucía, provincia en la que esencialmente se produce aceituna de almazara.

TABLA II.7
SUPERFICIE DE CULTIVO Y PRODUCCIÓN DE RESIDUO DE
PODA DE OLIVO EN LAS DIFERENTES CC.AA.
(Año 1999)

Comunidades autónomas	Superficie Miles Ha	Producción
		Residuo de poda Millones kg
Andalucía	1.454,6	2.545,6
Aragón	56,7	99,2
Asturias (Principado de)	--	--
Baleares (Islas)	8,2	14,4
Canarias (Islas)	--	--
Cantabria	--	--
Castilla-La Mancha	310,6	543,6
Castilla y León	9,0	15,8
Cataluña	128,1	224,2
C. Valenciana	97,0	169,8
Extremadura	252,3	441,5
Galicia	--	--
Madrid (Comunidad de)	21,7	38,0
Región de Murcia	20,5	35,9
Navarra (Comunidad Foral de)	2,9	5,1
País Vasco	0,1	0,2
Rioja (La)	2,8	4,9
Ceuta	s.d.	s.d.
Melilla	s.d.	s.d.
ESPAÑA	2.364,5	4.137,9

s.d.: sin dato

Fuente: MAPA. Subdirección General de Estadística Agroalimentaria.

TABLA II.8
SUPERFICIE OCUPADA POR EL CULTIVO
DEL OLIVAR, Ha

	Jaén	Andalucía
Olivar de aceitunas de mesa	1.388	97.506
Olivar de aceitunas de almazara	589.532	1.406.385
Total	590.920	1.503.891

Humanes (1994) diferencia el residuo de poda de olivo entre madera (cuando el diámetro es superior a 5 cm) y ramón (ramas con un diámetro de tronco inferior a 5 cm más la hoja que porten). Dado que la producción media de ramón y de leña, por un olivar de secano, está muy relacionada con la capacidad productiva del olivar, en plantaciones de tipo medio de las provincias de Jaén y Córdoba las producciones medias por hectárea se situarían en 1.250 kg de ramón y 500 kg de leña cada año, CIFA “Alameda del Obispo” (2003). Por tanto, se puede estimar que la producción total anual media de este tipo de residuo es superior a los 2.631,8 millones de kg en Andalucía, de los cuales 1.034,1 se generan en la provincia de Jaén.

II.3.2 Recogida y transporte

En la actualidad existen en el mercado diferentes tipos de maquinaria para la trituración de leñas y ramones de poda. Por un lado se dispone de las máquinas trituradoras de martillos, se trata esencialmente de martillos de acero de alta resistencia dispuestos alrededor de un eje horizontal, paralelo al suelo y perpendicular al sentido de avance del tractor; este eje es accionado por la toma de fuerza del tractor, desplazándose la máquina a lo largo de las calles del olivar, en las que operarios previamente han colocando las ramas en forma ordenada y formando un cordón del que se autoalimenta la máquina. Los martillos golpean la leña, triturándola y desastillándola, produciendo trozos de diferentes tamaños, de forma aleatoria según el diámetro de las ramas. Estas máquinas, en función del ancho de trabajo y del diámetro de las ramas a triturar, necesitan tractores con unos 80-100 CV de potencia y se desplazan a una velocidad de 0,2 m/s sobre el terreno, por lo que tienen un reducido rendimiento horario.

Existen, igualmente, máquinas trituradoras alimentadas manualmente a través de una gran boca de alimentación, estos equipos constan esencialmente de un gran volante de inercia provisto de cuchillas de corte y de unos rodillos dentados de alimentación en los que se embocan, sin trocear, las ramas de poda. El conjunto de volante y cuchillas giran a una cierta velocidad accionados por la toma de fuerza del tractor. El material picado es distribuido sobre la superficie del suelo por un rastrillo incorporado a la propia máquina. La potencia del tractor ha de ser de al menos 70-80 CV, y se necesitan 2 o 3 operarios para conseguir un adecuado rendimiento horario aunque resulta igualmente bajo.

Según un estudio realizado por Sánchez *et al.* (2002a), con respecto a las operaciones de recogida y transporte del residuo de poda de olivar, se determinó un coste próximo a 0,02 euros/kg de ramón picado y de 0,03 euros/kg de leña a pie de almacén, incluyendo en el cálculo el pago de jornales, la amortización, el alquiler de máquinas y el mantenimiento, y teniendo en cuenta que:

- El ramón se distribuye en hileras de forma mecánica
- El coste del escamujado se repercute en la leña
- El almacén se encuentra a una distancia menor de 10 km; es decir, aquella para la que un tractor con remolque cargado tarda aproximadamente una hora en descargar y volver, lo que coincide con el tiempo que la astilladora tarda en llenar el siguiente remolque
- Producción de biomasa: 3.000 kg/(Ha año).
- Proporciones de las distintas fracciones: 50% astilla y 50% hoja.

II.3.3 Características físicas

Los residuos obtenidos tras la operación de poda están constituidos por troncos de madera, ramas (ó varetas) y hojas. A esta composición también debería añadirse, fundamentalmente en los olivares viejos y dependiendo del tipo de poda que se realice, los grandes bloques de madera, obtenidos del tronco del árbol, que se cortan con el objeto de que el olivo no se haga muy grande y esté constituido fundamentalmente por troncos y tallos jóvenes ya que son los más productivos.

Por otra parte, se estima que del total del residuo de poda de olivo el 50% corresponde aproximadamente a madera y el resto a ramones. De todo esto se deduce que este residuo se caracteriza por su heterogeneidad, ya que comprende fracciones muy

diferenciables, y a la vez puede variar mucho en función de la zona de cultivo, tipo de olivar, clima, etc.

Este residuo agrícola representa elevados valores para las solubilidades en agua fría (14% sobre base seca), agua caliente (17%), hidróxido cálcico al 1% (35%) y sustancias extraíbles en etanol-benceno (12%) comparados con los de maderas coníferas y frondosas, Jiménez *et al.* (1990a).

Los contenidos medios del residuo de poda del olivar en celulosa, hemicelulosa y lignina oscilan alrededor del 36,6, 19,7 y 20,8% sobre base seca, respectivamente, Sánchez *et al.* (2002). Las dimensiones de las fibras de la madera y del ramón son las que se indican en la Tabla II.9, Jiménez *et al.* (1990b).

TABLA II.9
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS
DEL RESIDUO DE PODA DE OLIVO

	Longitud, mm	Diámetro, μm
Madera	0,92	14,0
Ramones	0,63	11,0

II.3.4 Alternativas para su aplicación

El residuo de poda de olivo, al igual que ocurre con la mayoría de los residuos agrícolas, está actualmente infrutilizado ante la escasa viabilidad económica que presentan las distintas alternativas de aprovechamiento existentes. Sin embargo, la potencialidad de este residuo como fuente renovable de la que pueden obtenerse productos químicos, biológicos o combustibles es algo incuestionable.

Dada la elevada producción de este residuo lignocelulósico, resulta de interés su empleo como biomasa residual de la cual obtener energía mediante distintos tratamientos. Los diferentes procesos que se emplean para la obtención de la energía contenida en la biomasa residual requieren previamente un tratamiento físico del residuo que lo adapte a las

características de los equipos donde se va a tratar, y básicamente estos procesos consisten en una conversión termoquímica o conversión bioquímica (Figura II.3).

Los procesos de conversión termoquímica más habituales para esta biomasa de tipo lignocelulósico son la combustión, la gasificación y la pirólisis. De esas alternativas la más tradicional es la incineración *in situ*, lo que supone problemas medioambientales: emisiones incontroladas de gases contaminantes, peligro de incendios en las explotaciones agrarias, riesgo en la circulación en carreteras y caminos cercanos, etc. Por el contrario, la pirólisis es la menos aplicada mientras que la gasificación es una tecnología relativamente conocida en el caso del carbón, pero en el caso de la poda del olivar aún está en fase de investigación y parece ser la que comporta mayores ventajas:

- Produce un menor volumen de gases residuales y los contaminantes se encuentran más concentrados lo cual supone una mayor eficacia en los sistemas de depuración necesarios.
- El combustible obtenido es muy versátil, con una amplia gama de aplicaciones y con posibilidad de ser transportado lejos de los puntos de generación.
- Los rendimientos termodinámicos son superiores si lo que se pretende es utilizar el gas obtenido en el proceso y expandirlo en motores de combustión interna y turbinas aprovechando el calor de los gases de escape.
- Se trata de una técnica más desarrollada que la pirólisis, a nivel de operación industrial, y tanto el diseño de los equipos como su aplicación es más sencilla.

La conversión térmica del residuo de poda de olivar mediante el proceso de gasificación constituye, en la actualidad, la tecnología más prometedora aunque aún se encuentra en fase de desarrollo.

Con respecto a la conversión bioquímica, hay que destacar el proceso de fermentación alcohólica mediante el cual la biomasa residual y natural se transforma en etanol; se trata de un proceso en tres etapas: obtención de la biomasa en el campo, conversión de esta a una forma fermentable (azúcares) y fermentación con levaduras para obtener una disolución diluida de etanol. El residuo de poda, previo a la fermentación, debe ser sometido a una serie de operaciones para liberar los azúcares: trituración o molienda e hidrólisis ácida o enzimática.

Una vía alternativa en el aprovechamiento de este residuo es la producción de pastas celulósicas ya que los grandes incrementos del consumo de papel y de las importaciones de

pasta celulósica y la escasez creciente de materias primas madereras ha llevado a intentar la fabricación de pasta celulósica a partir de residuos agrícolas, muy abundantes en España, entre ellos la poda de olivo.

Sin embargo, la preparación de la materia prima conlleva la formación de grandes cantidades de aguas contaminantes, especialmente las que se producen en procesos que implican tratamientos con sulfitos o sulfatos. Una posible solución a este problema es separar fibras y lignina del residuo de poda mediante el empleo de disolventes orgánicos apropiados, que aunque se trata de una práctica conocida desde antiguo, su aplicación a planta piloto y a escala industrial con este residuo es algo reciente (Jiménez *et al.* 2001).

Tradicionalmente los restos de poda del olivar se han destruido por quema de los mismos en el propio campo, con la finalidad de evitar la plaga denominada barrenillo, escarabajo que necesita leña gruesa para su reproducción y, que una vez avivado, ejerce una fuerte acción depresiva sobre las plantaciones del olivar. Sin embargo, en la actualidad se extiende otra técnica de aprovechamiento que es la incorporación de las ramas finas al suelo tras su picado. La finalidad de esta práctica es doble: por un lado, se eleva el nivel de materia orgánica en el suelo, mejorando así las características estructurales del suelo y su fertilidad al liberar elementos nutritivos tras un lento proceso de mineralización y por otro lado, se evitan pérdidas de humedad del terreno.

Estudios de campo realizados sobre el aprovechamiento de los restos de poda triturados como cubierta vegetal ponen de manifiesto que la incorporación continuada al suelo de estos restos modifica notablemente las características físico-químicas del mismo, con un incremento de la materia orgánica así como en la fertilidad del suelo con incrementos en la concentración de P y K en el horizonte más superficial; esto determina una mejora de su estructura y por tanto, una mejor infiltración y una previsible reducción de las pérdidas de suelo por erosión. Sin embargo, esta técnica cuenta con detractores debido a que puede impedir la mecanización de otras labores, ya que la descomposición es muy lenta, su presencia en el suelo es muy prolongada, puede aumentar algunos problemas fitosanitarios y, sobre todo, tiene un coste mayor que la incineración.

II.4 PRETRATAMIENTO DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

En la Tabla II.10 se muestran los rangos de variación del contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina de diferentes residuos agrícolas (Sun y Cheng, 2002).

TABLA II.10
CONTENIDO EN CELULOSA, HEMICELULOSA Y LIGNINA
DE DIFERENTES RESIDUOS

Residuo	Celulosa, %	Hemicelulosa, %	Lignina, %
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera blanda	45-50	25-35	25-35
Cáscara de nuez	25-30	25-30	30-40
Mazorca de maíz	45	35	15
Pasto (hierba)	25-40	35-50	10-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Algodón	80-95	5-20	0
Periódicos	40-55	25-40	18-30
Sólidos de aguas residuales	8-15		24-29

Los pretratamientos a que se van a someter los residuos lignocelulósicos deben cumplir los siguientes requerimientos:

- Mejorar la obtención de azúcares o la disponibilidad de los polímeros para la hidrólisis posterior
- Evitar la degradación de los hidratos de carbono
- Evitar la formación de productos inhibidores de los procesos de hidrólisis y fermentación
- Tener un bajo coste.

Los diferentes pretratamientos se pueden clasificar en: físicos, físico-químicos, químicos y biológicos.

II.4.1 Pretratamientos físicos

El primero en considerarse es la molturación, mediante el cual se produce la reducción de tamaño del residuo y con ello la cristalinidad de la celulosa, a la vez que se incrementa la superficie de ataque hidrolítico. Mediante este proceso se consigue incrementar la digestibilidad de la biomasa pero conlleva un consumo de energía que es tanto mayor cuanto más dura es la madera y más pequeño el tamaño final.

La pirólisis también se ha utilizado como pretratamiento, al calentar el residuo a temperaturas mayores de 300 °C se producen gases combustibles y un residuo carbonoso, pero a temperaturas inferiores la descomposición es menor y el residuo puede ser tratado con ácido diluido y condiciones no muy severas, alcanzándose conversiones cercanas al 100%. El proceso de pirólisis puede mejorarse si se añaden $ZnCl_2$ o Na_2CO_3 .

II.4.2 Pretratamientos físico-químicos

II.4.2.1 Autohidrólisis

Por autohidrólisis se considera la hidrólisis del residuo mediante agua a alta presión y temperatura y descompresión súbita, el agua puede utilizarse como líquido o en estado vapor (“steam explosion”), (Ballesteros *et al.*, 2002 y Sun y Cheng, 2002). El proceso “steam explosion” es uno de los métodos más usados actualmente para el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos. En este método, la biomasa molturada es tratada con vapor saturado a alta presión durante un tiempo prefijado y posteriormente se produce la descompresión súbita, con lo que se produce la explosión de las fibras del material lignocelulósico. Las temperaturas y tiempos de trabajo típicos oscilan entre 160 y 260 °C y desde unos pocos segundos hasta varios minutos, respectivamente.

Este tratamiento produce la degradación de la hemicelulosa y la transformación de la lignina debido a la alta temperatura de trabajo. Considerando únicamente la solubilización de la hemicelulosa pueden utilizarse tanto temperaturas elevadas y tiempos de contacto bajos como temperaturas bajas y tiempos elevados. Según Sun y Cheng (2002), estas últimas condiciones de operación son más favorables y proponen como valores 190 °C y 10 minutos para la temperatura y tiempo óptimos, aunque estos valores son variables dependiendo del tipo de biomasa utilizada. Si al proceso se adiciona SO_2 o CO_2 se mejora la hidrólisis

enzimática posterior, se disminuye el contenido de inhibidores y se favorece la solubilización de la hemicelulosa.

Las ventajas del proceso “steam explosion” son:

- Menor consumo energético que cualquier método mecánico, para obtener resultados similares
- No produce desechos que tengan carácter peligroso para el medio ambiente.

Y como inconvenientes:

- Destrucción parcial de los xilanos de la hemicelulosa
- No consigue romper completamente la estructura formada por la lignina y la celulosa
- Puede generar productos inhibidores para la posterior hidrólisis y fermentación.

Con este proceso se solubiliza casi la totalidad de la hemicelulosa en sus azúcares simples, fundamentalmente D-xilosa, que pueden ser fermentados, previa eliminación de los inhibidores, a xilitol o etanol. Además, se enriquece el residuo sólido en celulosa que es, ahora, fácilmente atacable por las enzimas celulolíticas, obteniéndose hidrolizados con mayores concentraciones de D-glucosa cuya recuperación o utilización para la producción de etanol, u otros productos químicos, es más rentable.

El proceso de autohidrólisis se considera como el más efectivo y de menor coste relativo para el tratamiento de maderas duras y residuos agrícolas aunque es menos efectivo para maderas blandas.

Laser *et al.* (2002) realizan el pretratamiento del bagazo de caña de azúcar, para su fermentación a etanol. Aplican el proceso “steam explosion” y lo comparan con otro donde el agua presente está en forma líquida. En ambos casos aplican temperaturas entre 170 y 230 °C y tiempo de tratamiento de 1 a 46 minutos. El porcentaje de sólidos mezclados con el agua o el vapor es del 1 al 8% en el primero y mayor del 50% para el segundo. Estos autores indican que el proceso de autohidrólisis con agua líquida como reactivo es más eficiente que el “steam explosion” dado que se obtienen mejores resultados de disolución de hemicelulosa y además no se producen inhibidores de la fermentación, también indican que el proceso con agua caliente a presión tiene un efecto similar a utilizar un ácido débil pero sin necesidad de neutralizar. Este pretratamiento permite recuperar la totalidad de xilanos y consigue una conversión mayor del 90% en el proceso posterior de hidrólisis y fermentación simultáneas,

el cual lo realizan con una mezcla de celulasas de *Trichoderma reesei* suplementadas con β -glucosidasas y como microorganismo fermentador *Saccharomyces cerevisiae*.

II.4.2.2 Proceso AFEX

En este pretratamiento el material lignocelulósico se somete a una disolución de amoníaco a alta presión y temperatura durante un tiempo prefijado y posteriormente se despresuriza súbitamente. El proceso AFEX puede ser utilizado casi con cualquier residuo lignocelulósico y tiene la ventaja de que prácticamente no solubiliza la hemicelulosa, al contrario que el “steam explosion”, por lo que queda para su posterior hidrólisis en el residuo sólido. El material lignocelulósico pretratado tiene prácticamente la misma composición que su residuo de partida, pero es muy fácilmente hidrolizable.

No produce inhibidores de la hidrólisis y fermentación por lo que no es necesario lavar el residuo sólido. Este tratamiento tiene el inconveniente de que cuanto mayor es el contenido en lignina del residuo menos efectivo es el proceso; además, para reducir costes y proteger el medio ambiente es necesario recuperar el amoníaco y reciclarlo al proceso.

II.4.2.3 Explosión con CO₂

Este proceso es similar a los dos anteriores y se basa en que el CO₂ puede formar H₂CO₃ mientras que la descompresión súbita realiza su labor de romper la estructura cristalina y con ello incrementar la velocidad de la hidrólisis posterior. Este proceso es menos efectivo que los dos anteriores pero es más rentable que el proceso AFEX y no produce inhibidores como ocurre con el “steam explosion”.

II.4.3 Pretratamientos químicos

II.4.3.1 Ozonolisis

El ozono se emplea para oxidar la lignina de los diferentes materiales lignocelulósicos y es capaz de eliminar la mayor parte de la lignina aunque también ataca levemente a la hemicelulosa. Este proceso tiene las siguientes ventajas e inconvenientes:

- Elimina lignina
- No origina productos inhibidores de la hidrólisis y fermentación
- El proceso tiene lugar a presión y temperatura ambiente
- Se requiere una gran cantidad de ozono, lo que encarece el proceso.

También pueden deslignificarse los residuos por oxidación de la lignina con otros agentes oxidantes o mediante enzimas ligninolíticas.

II.4.3.2 Prehidrólisis ácida

En ocasiones, previo a la hidrólisis enzimática, se realiza una hidrólisis ácida que se considera como pretratamiento.

Los ácidos sulfúrico y clorhídrico, en disoluciones concentradas, son muy efectivos para el tratamiento de los residuos lignocelulósicos pero son peligrosos y deben ser recuperados para hacer el proceso rentable y proteger el medio ambiente.

La utilización de estos ácidos concentrados a bajas temperaturas conlleva altas conversiones de las fibras en sus azúcares individuales pero se obtienen bajas concentraciones de estos porque son degradados por acción del ácido, por ello es más efectivo el tratamiento con disoluciones diluidas y altas temperaturas.

Cuando sólo se desea disolver la hemicelulosa se emplean disoluciones diluidas y condiciones suaves. Los pretratamientos con ácidos diluidos pueden ser de dos tipos: alta temperatura (mayor de 160 °C) en procesos continuos y contenido de sólidos entre el 5 y el 10% y baja temperatura (menor de 160 °C) en procesos discontinuos y contenido de sólidos entre el 10 y el 40%.

El proceso de prehidrólisis ácida tiene una rentabilidad menor que los pretratamientos físico-químicos anteriores y requiere neutralizar el ácido.

Rivas *et al.* (2002) realizan dos tratamientos distintos a la mazorca de maíz, un primero consistente en la autohidrólisis en agua líquida a 202 °C, con una relación de agua a residuo sólido seco de 8, y a continuación someten el líquido obtenido por filtración a posthidrólisis con H₂SO₄ al 0,5% ($\approx 0,1$ N), tiempo de 165 minutos y temperatura de 125 °C, al objeto de romper todos los oligosacáridos presentes en el líquido. El otro tratamiento que realizan a este residuo es una hidrólisis con H₂SO₄ al 2% (≈ 2 N) a 130 °C durante 15 minutos. Los hidrolizados de ambos procesos son neutralizados con CaCO₃ hasta pH de 6,5 porque presenta la ventaja de eliminar productos inhibidores en disolución. Como conclusión, estos autores indican que autohidrólisis y posthidrólisis es el mejor método y consigue incrementar la producción en un 18% respecto del otro procedimiento.

Como pretratamiento químico, también pueden usarse mezclas de disolventes orgánicos con disoluciones ácidas diluidas.

II.4.3.3 Prehidrólisis alcalina

Algunos álcalis, NaOH fundamentalmente, pueden usarse para el pretratamiento de residuos lignocelulósicos aunque cuanto mayor es el contenido en lignina menos efectivos resultan estos procedimientos.

Sun y Cheng (2002) indican que el álcali actúa saponificando los enlaces éster existentes entre los xilanos y entre estos y la lignina, con lo que se consigue incrementar la porosidad del residuo. Así, el empleo de disoluciones diluidas de NaOH provoca en el residuo hinchazón, incremento del área superficial interna, descenso del grado de polimerización, descenso de la cristalinidad, separación entre la lignina y la celulosa y ruptura de la estructura cristalina.

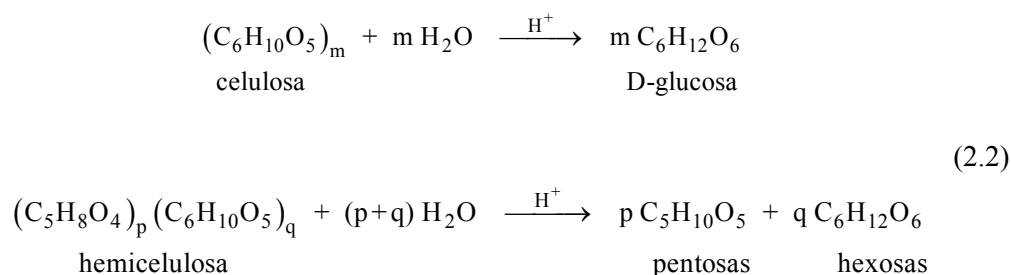
II.4.4 Pretratamientos biológicos

Existen hongos capaces de degradar la lignina y la celulosa obteniendo sus constituyentes individuales, así se pueden mencionar: *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete sordida*, *Pycnoporus cinnabarinus*, etc. que logran degradar el residuo lignocelulósico en pocas semanas. Este tratamiento presenta la ventaja de que requiere muy poco consumo de energía y que es limpio con el medio ambiente, pero tiene el inconveniente de actuar con una velocidad muy baja.

II.5 PROCESOS DE TRANSFORMACIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Básicamente, sólo existen tres técnicas de conversión de la biomasa lignocelulósica para obtener etanol, xilitol o la mezcla de ambos. Estas son: hidrólisis con ácido concentrado, prehidrólisis e hidrólisis con ácido diluido y pretratamiento e hidrólisis enzimática.

De forma simplificada, las reacciones que expresan la hidrólisis de la celulosa y de la hemicelulosa se muestran en la ecuación (2.2) (Carrasco *et al.*, 1992b).



Durante la hidrólisis, los azúcares se degradan a distintos compuestos tóxicos por la influencia de diferentes variables entre las que deben destacarse la temperatura y la concentración de ácido.

II.5.1 Hidrólisis con ácido concentrado

Los procesos que utilizan ácidos concentrados fueron los primeros en desarrollarse dado que son capaces de romper la estructura cristalina de la celulosa empleando bajas temperaturas y cortos tiempos de contacto (Rabbani, 1989).

En la hidrólisis con ácido concentrado se suelen emplear disoluciones de ácidos minerales, tales como el sulfúrico, clorhídrico, etc., de alta concentración a temperaturas inferiores a 100 °C. Con estas condiciones se logra disolver la celulosa junto con la hemicelulosa en forma de sus sacáridos simples. Este método tiene el grave inconveniente de que las disoluciones son muy corrosivas y por ello el material a utilizar, de acero inoxidable con alta capacidad anticorrosiva, tiene un precio elevado. Como la hemicelulosa se hidroliza mucho más rápidamente que la celulosa sus monosacáridos están expuestos a la acción del ácido más tiempo y por ello son mayoritariamente degradados. Además, es necesario

recuperar el ácido por imperativos medioambientales y para intentar hacer el proceso más económico, Figura II.16.

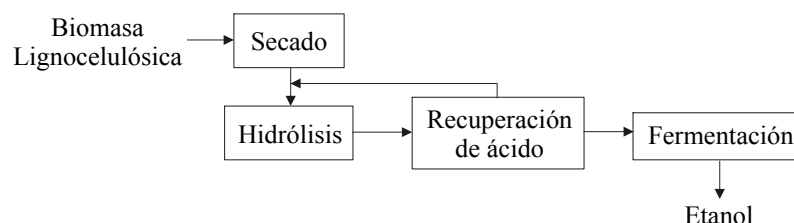


Fig. II.16 Hidrólisis con ácido concentrado

El proceso Arkenol (Arkenol, 2002), desarrollado a nivel de planta piloto, emplea ácido sulfúrico concentrado para hidrolizar tanto hemicelulosa como celulosa a sus azúcares constituyentes. Las temperaturas y presiones de trabajo son bajas y suficientes para la hidrólisis, pero no lo suficientemente altas como para degradar los azúcares o la lignina. Tras la hidrólisis la mezcla se filtra a presión para retirar el residuo sólido, lignina fundamentalmente. Como se emplea ácido concentrado, para neutralizar la disolución se necesita gran cantidad de base por lo que los costes, tanto del ácido como de la base, son elevados y el proceso no será rentable económicamente. Esto puede remediarse empleando una columna de separación cromatográfica que consigue eliminar, en continuo, todo el ácido en forma diluida y posteriormente se concentra y se recicla al proceso. La disolución de azúcares a la salida del separador es tratada con cal, para neutralizarla, y se retira yeso sólido. La disolución final de azúcares, neutralizada y libre de inhibidores, ya puede ser fermentada en condiciones casi óptimas de inhibidores.

II.5.2 Hidrólisis con ácido diluido

Mientras con ácido concentrado se rompe fácilmente la estructura cristalina de la celulosa aún a bajas temperaturas, cuando el ácido es diluido esta fracción no resulta atacada a no ser a temperaturas muy elevadas, en las que los azúcares generados se degradan con mucha facilidad. Cuando se emplea ácido diluido se persigue hidrolizar las porciones de biomasa cuya estructura es amorfa, celulosa amorfa y, fundamentalmente, hemicelulosa. Los residuos cuya hemicelulosa ha sido eliminada son más fácilmente digeribles por los animales, presentan altas velocidades de reacción en un proceso enzimático y menor consumo de ácido en la hidrólisis ácida (Esteghlalian *et al.*, 1997).

En el proceso de hidrólisis con ácido diluido se hidrolizan de forma separada la hemicelulosa y la celulosa. En la primera etapa se hidroliza la hemicelulosa, en condiciones suaves y temperaturas inferiores a los 100 °C, y en la segunda la celulosa, donde las temperaturas empleadas son próximas a los 200 °C. La elevada temperatura de esta segunda etapa de hidrólisis provoca que se obtengan productos de degradación tanto de la celulosa como de la lignina, Figura II.17.

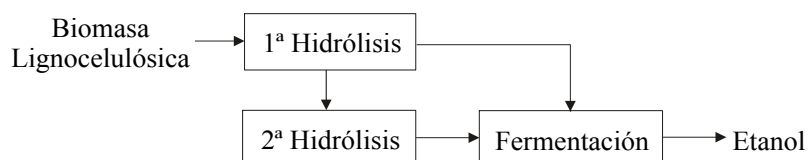
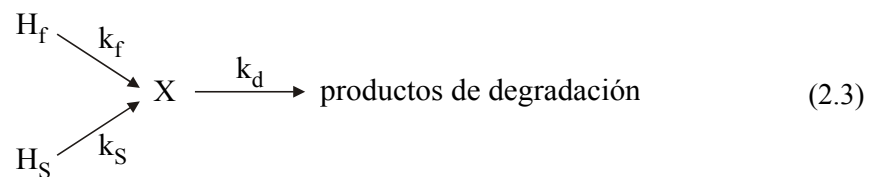


Fig. II.17 Hidrólisis con ácido diluido

Fanta *et al.* (1984) hidrolizan paja de trigo con disoluciones diluidas de ácido trifluoroacético a la temperatura de 99-100 °C (a reflujo). En estas condiciones de operación se obtiene una alta conversión de la hemicelulosa, se solubiliza aproximadamente un 10 % de la lignina y no se toca la celulosa; de forma apreciable, no se descomponen los azúcares y no se liberan inhibidores. Pero tiene el inconveniente de su alta peligrosidad y toxicidad pues puede producir lesiones o incluso la muerte por inhalación, ingestión o contacto con la piel (Office of Hazardous Materials Safety, 2002). Por este motivo se emplean ácidos menos peligrosos como el sulfúrico o el clorhídrico pese al poder corrosivo que tengan.

Esteghlalian *et al.* (1997), Eken-Saraçoğlu *et al.* (1998) y Lavarack *et al.* (2000) indican que la hidrólisis de hemicelulosa por ácido no es más que la ruptura aleatoria de la estructura del polímero. Aunque la composición de la hemicelulosa varía de unos residuos a otros, lo que impide generalizar los resultados experimentales, sí se ha confirmado que el componente mayoritario es el xilano. Para estudiar el proceso cinético de hidrólisis, determinan, por cromatografía líquida, el contenido máximo de los distintos azúcares que se pueden obtener por hidrólisis total del residuo y a ellos se refieren todos los resultados de análisis posteriores. Dado que el monosacárido mayoritario en la hidrólisis de la hemicelulosa es D-xilosa, y que la celulosa, formada por cadenas de D-glucosa, se hidroliza difícilmente y sólo en condiciones muy severas, se considerará la hidrólisis de los xilanos para modelar este proceso; aunque como ya se ha indicado existen otros componentes minoritarios de la hemicelulosa como glucanos, arabinanos, mananos, etc. En condiciones suaves de hidrólisis (baja temperatura y concentración de ácido) se acepta que la celulosa no sufre ningún ataque y que toda la D-glucosa que se obtiene procede de la hemicelulosa, donde se encuentra

formando los glucanos. Estos autores suponen, en el proceso de hidrólisis con ácidos minerales diluidos, que el xilano se hidroliza a D-xilosa según una reacción de primer orden y que esta se degrada a furfural (mayoritariamente), hidroximetilfurfural y furanos. Pero, igualmente, indican que esta interpretación es insuficiente para predecir la descomposición de los xilanos dado que en primer lugar se forman xilo-oligosacáridos a partir de los polímeros y posteriormente se descomponen en D-xilosa. Para el propósito de cálculo suponen que el xilano está formado por dos fracciones que se hidrolizan a distinta velocidad y en paralelo según reacciones de primer orden. Considerando H_f como la fracción de xilano que se hidroliza rápidamente y H_S la que lo hace lentamente proponen el siguiente modelo de reacción,



en la que también se ha considerado que la D-xilosa generada se degrada a sus productos de descomposición según una reacción de orden uno, donde k_f , k_S y k_d son las constantes cinéticas de la reacción correspondiente y X la fracción de D-xilosa en disolución respecto de la máxima que podría obtenerse si hubiese hidrólisis total y no degradación de azúcares. Planteando las ecuaciones diferenciales individuales,

$$\frac{dH_f}{dt} = -k_f H_f \quad (2.4)$$

$$\frac{dH_S}{dt} = -k_S H_S \quad (2.5)$$

$$\frac{dX}{dt} = k_f H_f + k_S H_S - \phi k_d X \quad (2.6)$$

donde ϕ representa la relación sólido/líquido (g/g) puesta inicialmente en el reactor de hidrólisis. Suponiendo que no hay degradación de la D-xilosa, pueden integrarse las ecuaciones (2.4) y (2.5) obteniéndose,

$$X_R = H_f + H_S = H_{f0} \cdot e^{-k_f t} + H_{S0} \cdot e^{-k_S t} = H_{f0} \cdot e^{-k_f t} + (1 - H_{f0}) \cdot e^{-k_S t} \quad (2.7)$$

donde X_R es la fracción de D-xilosa equivalente que aún queda en el residuo sólido relativa al total de D-xilosa equivalente en el sustrato y H_{f0} la fracción inicial de xilano que reacciona rápidamente.

De la ecuación (2.7) se deduce que existe una proporcionalidad constante entre el contenido de hemicelulosa que se va hidrolizando y la concentración de D-xilosa en el hidrolizado. Así, se define la concentración potencial de xilosa, $C_{X,m}$, (Parajó *et al.*, 1993) como la máxima que se obtendría por hidrólisis total de la hemicelulosa, siempre que no hubiese degradación del monosacárido y se mantenga la relación residuo inicial seco a disolución de hidrólisis.

Según lo indicado en el párrafo anterior, H_{f0} también representa la fracción de D-xilosa equivalente inicial presente en el residuo sólido y que rápidamente se disuelve por reacción del xilano rápido. Para modificar la ecuación (2.7) y referirla a concentraciones (g/L) debe considerarse la definición dada de $C_{X,m}$, obteniéndose,

$$X_R = \frac{C_{X,m} - C_X}{C_{X,m}} = H_{f0} \cdot e^{-k_r t} + (1 - H_{f0}) \cdot e^{-k_s t} \quad (2.8)$$

donde C_X representa la concentración de D-xilosa en el hidrolizado. Despejando queda,

$$C_X = C_{X,m} \left[1 - H_{f0} \cdot e^{-k_r t} - (1 - H_{f0}) \cdot e^{-k_s t} \right] \quad (2.9)$$

ecuación que permite determinar las constantes cinéticas de hidrólisis de xilano, rápido y lento, y la fracción de este que lo hace rápidamente, conocida la variación de C_X en el tiempo y $C_{X,m}$. En la Tabla II.11 se indican algunos valores de la fracción de xilano que se hidroliza rápidamente, para algunos residuos lignocelulósicos (Esteghlalian *et al.*, 1997). Eken-Saraçoğlu *et al.* (1998) proporcionan los valores de 0,838 y 0,860 para las hidrólisis de mazorca de maíz y cáscara de pipa de girasol, respectivamente. Para madera de eucalipto Parajó *et al.* (1993) dan valores que oscilan entre 0,588 y 0,668 dependiendo de la concentración de ácido empleada y Lavarack *et al.* (2000) dan distintos valores para el bagazo de caña de azúcar dependiendo de qué fracción del residuo se considere, pero como término medio oscila entre 0,55 y 0,60.

TABLA II.11
FRACCIÓN DE XILANO DE REACCIÓN RÁPIDA EN
DIFERENTES RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Material inicial	H ₁₀
Roble rojo	0,721
Abedul	0,700
Arce rojo	0,803
Álamo	0,760
Olmo americano	0,843
Paja de trigo	0,670
Residuos de maíz	0,644
Chopo	0,838

Para las constantes cinéticas k_f y k_s determinadas con la ecuación (2.9) se acepta una dependencia con la temperatura según una ecuación tipo Arrhenius, donde, además, la constante pre-exponencial k_0 se ha determinado que varía según una ecuación potencial con respecto a la concentración de ácido empleado. De tal forma que con ambas consideraciones la ecuación genérica de k tiene la forma de la ecuación (2.10).

$$k = k_0 e^{-\left(\frac{E_a}{RT}\right)} = a' C_A^n e^{-\left(\frac{E_a}{RT}\right)} \quad (2.10)$$

donde E_a es la energía de activación y C_A la concentración inicial de ácido empleado, modificada al considerar la capacidad de neutralización de la biomasa (CNB).

$$C_A = C_{A0} - \left(\frac{\text{kg biomasa seca}}{\text{m}^3 \text{ disolución}} \right) (\text{capacidad neutralización biomasa}) \quad (2.11)$$

donde C_{A0} es la concentración inicial de la disolución preparada para hidrólisis. La capacidad de neutralización de la biomasa debe ser determinada experimentalmente para cada residuo, como los moles de ácido que son neutralizados por gramo de biomasa seca, ya que varía según su origen. Así, Esteghlalian *et al.* (1997) proporcionan los valores de la Tabla II. 12 para las prehidrólisis con H_2SO_4 de diferentes tipos de biomasa y deducen que la capacidad de

neutralización es debida a los diferentes contenidos en ceniza de cada residuo, destacando que los residuos herbáceos tienen menos ceniza que los madereros.

TABLA II.12
CAPACIDAD DE NEUTRALIZACIÓN DE LA BIOMASA

Material	CNB·10 ⁴ , kmol H ₂ SO ₄ /kg biomasa seca
Residuos de maíz	4,46
Pasto	2,63
Chopo	1,70
Roble rojo	0,87
Abedul	0,36

Parajó *et al.* (1993) determinan el contenido de los distintos componentes e indican que D-glucosa, D-xilosa y L-arabinosa varían de forma similar con el tiempo de hidrólisis por lo que deducen que no existe hidrólisis de la celulosa y que toda la glucosa que tienen en disolución proviene de la fracción de glucano de la hemicelulosa. Las condiciones de operación utilizadas fueron: relación residuo seco/disolución = 1/10, concentración de ácido sulfúrico de 3,5% a 10% en peso, tiempo de hidrólisis 11 horas y temperatura la correspondiente a la ebullición de la mezcla empleando reflujo.

Por otra parte, parece que a concentraciones bajas de ácido inicial, y sobre todo a temperaturas inferiores a la de ebullición de la disolución, la degradación de los azúcares es prácticamente despreciable; así, Parajó *et al.* (1993) indican que para mayores concentraciones de ácido se incrementa la degradación de los azúcares.

Para el caso donde sea necesario considerar la degradación de la D-xilosa habrá que integrar la ecuación (2.6), quedando

$$X = \left[\frac{k_f H_{f0}}{\varphi k_d - k_f} \right] \left[e^{-k_f t} - e^{-\varphi k_d t} \right] + \left[\frac{k_s (1 - H_{f0})}{\varphi k_d - k_s} \right] \left[e^{-k_s t} - e^{-\varphi k_d t} \right] \quad (2.12)$$

donde X es la fracción de D-xilosa en disolución en relación a la máxima posible que podría obtenerse. k_d , como constante cinética de velocidad, varía según una ecuación similar a la

(2.10). Considerando la composición de xilosa en disolución en unidades de g/L la ecuación (2.12) queda en la forma

$$C_X = C_{X,m} \left\{ \left[\frac{k_f H_{f0}}{\varphi k_d - k_f} \right] \left[e^{-k_f t} - e^{-\varphi k_d t} \right] + \left[\frac{k_S (1 - H_{f0})}{\varphi k_d - k_S} \right] \left[e^{-k_S t} - e^{-\varphi k_d t} \right] \right\} \quad (2.13)$$

Los parámetros de la ecuación (2.10) obtenidos por varios autores para las constantes cinéticas k_f , k_S y k_d de diferentes sustratos se muestran en la Tabla II.13 (Esteghlalian *et al.*, 1997 y Eken-Saraçoğlu *et al.*, 1998), en la que la concentración de ácido se ha expresado como % en peso o como normalidad (fondo oscuro) y se ha considerado la relación sólido/líquido (φ), para modificar la constante cinética de descomposición obtenida.

Lavarack *et al.* (2000) dan una energía de activación para la reacción de descomposición de D-xilosa a furfural de 140,5 kJ/mol y la determinan, para el modelo propuesto (ecuación (2.3)), obteniendo unos resultados próximos a 120 kJ/mol de media para el conjunto del bagazo de caña de azúcar. Estos autores con este modelo proporcionan, para el mismo conjunto, una energía de activación media de descomposición para la fracción rápida de xilanos de 108 kJ/mol, e indican que la velocidad de hidrólisis de la fracción lenta es cero por lo que parece ser que esta fracción no se hidroliza. Respecto de la formación y degradación de la D-glucosa suponen que sigue un mecanismo similar al de la ecuación (2.3) pero sin que la hidrólisis de los glucanos se produzca en dos reacciones paralelas sino sólo en una única reacción de formación de D-glucosa, de orden uno. Simplificando la ecuación (2.3) para considerar una única reacción de hidrólisis e integrando se obtendrá una ecuación similar a la (2.13) en la que k_f y k_S son la misma variable, k_h .

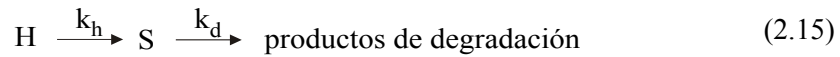
$$C_X = C_{X,m} \left[\frac{k_h}{\varphi k_d - k_h} \right] \left[e^{-k_h t} - e^{-\varphi k_d t} \right] \quad (2.14)$$

Con esta ecuación han determinado unas energías de activación de la reacción de formación y degradación de la glucosa de 114 y 135 kJ/mol de media para el conjunto del bagazo de caña de azúcar.

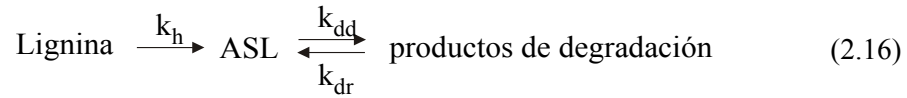
TABLA II.13
PARÁMETROS DE LA ECUACIÓN (2.10),
PARA LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE LAS REACCIONES (2.3)

		a° , min ⁻¹	n	E _a , kJ/mol
Paja de trigo		---	---	50,2
Álamo		---	---	117,2
Roble rojo		1,04 10 ¹⁴	1,54	120,1
Abedul		2,67 10 ¹⁶	1,0	126,6
Pasto	k _f	1,9 10 ²¹	0,4	169,0
Chopo		3,3 10 ²¹	0,4	176,7
Residuos de maíz		6,7 10 ¹⁶	1,5	129,8
Mazorca de maíz		1,486 10 ¹⁰	1,21	80,34
Cáscara de pipa de girasol		9,642 10 ¹⁰	1,55	92,31
Paja de trigo		---	---	104,6
Álamo		---	---	154,8
Roble rojo		6,0 10 ¹²	1,19	118,0
Abedul		16,0 10 ¹⁹	1,0	156,5
Pasto	k _s	4,2 10 ²³	2,0	210,7
Chopo		3,3 10 ²²	1,5	192,0
Residuos de maíz		6,9 10 ¹⁹	1,6	167,6
Mazorca de maíz		2,00 10 ¹⁰	1,86	85,67
Cáscara de pipa de girasol		4,32 10 ⁹	1,39	78,35
Pasto		3,8 10 ¹¹	0,45	99,5
Chopo		8,5 10 ¹¹	0,55	102,0
Residuos de maíz	k _d	3,7 10 ¹¹	0,50	98,4
D-Xilosa		6,344 10 ¹⁴	0,78	133,7

Lavarack *et al.* (2002) también hidrolizan bagazo de caña de azúcar pero emplean tanto ácido sulfúrico como ácido clorhídrico y diferentes condiciones de operación. En este trabajo estudian la hidrólisis de formación y degradación de D-xilosa, D-glucosa, L-arabinosa, furfural y lignina soluble en ácido (ASL). Deducen que el modelo que mejor se ajusta a los resultados es el propuesto por Saeman (1945), el mismo ya indicado para D-glucosa en el párrafo anterior, menos para ASL porque en este caso la degradación ha resultado ajustarse mejor a una reacción reversible.



y



La integración de la ecuación (2.15) conduce a

$$C_S = C_{S,m} \left[\frac{k_h}{\varphi k_d - k_h} \right] \left[e^{-k_h t} - e^{-\varphi k_d t} \right] \quad (2.17)$$

donde dependiendo del componente considerado sólo se debe sustituir el subíndice correspondiente. En cambio, para la lignina la expresión integrada es la siguiente.

$$\begin{aligned} \frac{C_{ASL}}{C_L} = & \left[\frac{k_h - \varphi k_{dr}}{\varphi k_{dr} + \varphi k_{dd} - k_h} \right] e^{-k_h t} + \frac{k_{dr}}{k_{dr} + k_{dd}} - \\ & - \left[\frac{k_{dr}}{k_{dr} + k_{dd}} + \frac{k_h - \varphi k_{dr}}{\varphi k_{dr} + \varphi k_{dd} - k_h} \right] e^{-\varphi(k_{dr} + k_{dd}) t} \end{aligned} \quad (2.18)$$

donde C_{ASL} es la concentración de ASL en g/g de sólido seco y C_L la concentración de lignina total en g/g de sólido seco o bien ambos en g/L de disolución.

Para aplicar la ecuación (2.17) para D-xilosa, D-glucosa y L-arabinosa es necesario conocer previamente $C_{S,m}$ por lo que en primer lugar determinan los pentosanos (T 223 cm-84) que tiene la hemicelulosa y por proporciones en la concentración de D-xilosa y L-arabinosa al evolucionar a tiempos altos fijan los valores máximos de cada una de ellas. Igualmente, para determinar la glucosa máxima también aplican proporciones a tiempos altos entre D-xilosa y D-glucosa. De esta forma obtienen que para bagazo de caña de azúcar la concentración máxima de D-xilosa posible es 0,274 g/g de residuo seco, de L-arabinosa 0,030 y D-glucosa 0,041 g/g de residuo seco. Conocida $C_{S,m}$ y aplicando las ecuaciones (2.17) y (2.10) Lavarack *et al.* (2002) obtienen los resultados de la Tabla II.14, en la que se ha empleado la concentración de ácido como % en peso de líquido.

TABLA II.14
PARÁMETROS CINÉTICOS DE LAS REACCIONES (2.15) Y (2.16)

	D-Xilosa		D-Glucosa		L-Arabinosa		ASL
	H ₂ SO ₄	HCl	H ₂ SO ₄	HCl	H ₂ SO ₄	HCl	H ₂ SO ₄
a_h^i, s^{-1}	21,6 10 ⁶	2,3 10 ⁶	18,0 10 ⁹	18,0 10 ⁹	17,1 10 ⁶	0,604	2,16 10 ⁶
$E_{a,h}, kJ/mol$	82,8	74,5	107,3	105,0	84,1	21,3	85,2
a_d^i, a_{dd}^i, s^{-1}	2,66 10 ¹²	6,81 10 ¹¹	2,66 10 ¹²	6,65 10 ¹¹	1,51 10 ⁸	4,41 10 ¹³	1,23 10 ⁹
$E_{a,d}, E_{a,dd}, kJ/mol$	118,9	114,8	125,5	117,6	87,9	135,1	95,7
a_{dr}^i, s^{-1}	---	---	---	---	---	---	4,54 10 ⁴
$E_{a,dr}, kJ/mol$	---	---	---	---	---	---	64,4
n	0,82	0,93	1,01	1,24	0,49	0,63	0,39

Como conclusiones indican que:

- La velocidad de hidrólisis del residuo se ve muy poco afectada por el tamaño de partícula aunque siempre existe difusión en el interior de esta.
- Debido a la presencia de ácido y temperaturas elevadas existe degradación de los azúcares. El ácido sulfúrico degrada más rápidamente que el ácido clorhídrico y en mayor extensión. La temperatura tiene gran influencia en la degradación de azúcares.
- A mayor relación sólido/líquido mayor es la concentración de azúcares en disolución y por ello la velocidad de degradación es mayor.
- En el bagazo de caña de azúcar, la fracción de lignina soluble representa el 20% del total de la lignina. Aunque, en los diferentes experimentos y en función de las condiciones de operación se solubiliza sólo una fracción de ese porcentaje. La solubilización de la lignina se produce en los primeros momentos de hidrólisis.
- En las condiciones de operación (temperatura entre 80 y 200°C y concentración de ácido entre 0,25 y 8 % en peso) la celulosa no resulta atacada.

Téllez-Luis *et al.* (2002) y Herrera *et al.* (2003) para el tratamiento de la paja de sorgo con distintas concentraciones de ácido sulfúrico y de ácido clorhídrico, respectivamente, diluidos y a la temperatura de 122 °C también emplean como modelo de hidrólisis el de Saeman (1945), ecuación (2.15), y en su forma integrada ecuación (2.17). Esta ecuación la

han utilizado para obtener el modelo de variación de la concentración de D-xilosa, D-glucosa y ácido acético. En la Tabla II.15 se muestran los valores de los parámetros obtenidos para las constantes cinéticas de las ecuaciones (2.17) y (2.18).

TABLA II.15
CONSTANTES CINÉTICAS DE LA ECUACIÓN (2.17)

	Producto	k_h, min^{-1}	k_d, min^{-1}
Téllez- Luis <i>et al.</i> (2002)	D-Xilosa	$0,04809 C_A^{0,39}$	$0,0003 C_A^{1,31}$
	D-Glucosa	$0,03257 C_A^{0,64}$	≈ 0
	Ácido acético	$0,04939 C_A^{0,53}$	0
Herrera <i>et al.</i> (2003)	D-Xilosa	$0,00261 C_A^{1,41}$	$0,0009 C_A^{0,93}$
	D-Glucosa	$0,00702 C_A^{0,59}$	0
	Ácido acético	$0,00037 C_A^{3,51}$	0

C_A en % peso de líquido

II.5.3 Hidrólisis enzimática

En el proceso de hidrólisis enzimática la biomasa debe ser pretratada, en primer lugar, para favorecer el acceso de los enzimas a los centros de reacción. Uno de los procesos más utilizados consiste en la prehidrólisis del residuo con ácido diluido y posteriormente la hidrólisis enzimática, Figura II.18. Este proceso es similar a la hidrólisis con ácidos diluidos y en una segunda etapa se realiza la hidrólisis de la celulosa con enzimas (celulasas). Como las condiciones de operación son muy suaves, en este proceso no se forman productos de degradación y la fermentación posterior no se encuentra inhibida. El único inconveniente radica en que se necesitan grandes cantidades de celulasas que encarecen el proceso, e incluso su obtención puede ser la etapa limitante.

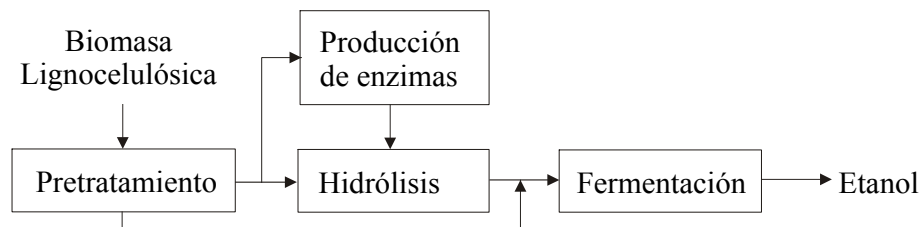


Fig. II.18 Hidrólisis enzimática

La acción enzimática se caracteriza por la formación de un complejo que representa el estado de transición y la posterior recuperación del enzima con la obtención del producto.



El sustrato se une al enzima a través de numerosas interacciones débiles como son: puentes de hidrógeno, electrostáticas, hidrófobas, etc, en un lugar específico, el centro activo. Este centro es una pequeña porción del enzima, constituido por una serie de aminoácidos que interaccionan con el sustrato.

La hidrólisis enzimática de los residuos lignocelulósicos produce azúcares reductores que sirven como fuente de energía y de alimentos. El coste de la hidrólisis enzimática es bajo comparado con la hidrólisis ácida dado que para la enzimática se emplean condiciones suaves (pH de 4,5 a 5 y temperatura de 45 a 50°C) y no tiene problemas de corrosión (Sun y Cheng, 2002). Sin embargo, el empleo comercial de este tratamiento no es viable dado que al alto coste de los enzimas hay que unir una baja velocidad de reacción y la falta de diseño de un reactor que favorezca la reacción en un medio heterogéneo (Gan *et al.*, 2003).

La hemicelulosa junto con la lignina forma una barrera que impide el ataque químico y biológico de la celulosa. Mayoritariamente, la estructura de la celulosa es cristalina, aunque suele existir una fracción amorfa que oscila entre 10 y 40% del total.

El área superficial y la cristalinidad de la celulosa son las dos características más importantes que afectan a la hidrólisis enzimática. Los materiales celulósicos son insolubles y están constituidos por diferentes compuestos resistentes a la acción enzimática, por lo que es necesario el empleo de diferentes métodos o pretratamientos que faciliten el acceso de los enzimas a la celulosa.

Los métodos indicados anteriormente pueden ser físicos, químicos o incluso biológicos. Entre los físicos se puede emplear la reducción de tamaño y el tratamiento con vapor a alta presión. Como químicos el tratamiento con bases (NaOH y NH₄OH) que disminuyen la cristalinidad de la celulosa y eliminan parcialmente la barrera que supone la lignina (Camacho *et al.*, 1987) y la oxidación de la lignina en medio básico fuerte. Y como métodos biológicos se suelen emplear enzimas ligninolíticas que oxidan la lignina y dejan libre el camino para el ataque de las celulasas a la estructura de la celulosa. El objeto de los pretratamientos es solubilizar la hemicelulosa, abrir la estructura cristalina y favorecer el ataque enzimático de la celulosa. Tras el pretratamiento y para fermentar el residuo sólido que queda es necesario el empleo de complejos celulolíticos, los cuales están constituidos por diferentes celulasas que interactúan entre sí produciendo un efecto sinérgico sobre la acción enzimática, la actividad combinada de las enzimas es mayor que la suma de los componentes individuales (Galbe y Zacchi, 2002).

La hidrólisis enzimática, al contrario que la hidrólisis ácida, no produce otros compuestos que los monosacáridos, por lo que no se forman productos tóxicos. Pero, como para favorecer el tratamiento enzimático el residuo debe someterse a un pretratamiento, es en esta etapa en la que se forman los compuestos inhibidores de la posterior fermentación.

El mecanismo de la hidrólisis enzimática es muy complejo y está sujeto a una serie de factores a considerar:

- Las celulasas son proteínas que liberan los microorganismos para una acción específica. Por ello, las enzimas, aunque para una misma tarea, al ser de orígenes diferentes pueden tener actividades y formas de actuación distintas e interactuar entre ellas de forma diferente.
- Un mismo material celulósico puede variar su composición dependiendo de una serie de factores como pueden ser la localización geográfica y las condiciones meteorológicas. Además, hay que considerar que este puede tener diferentes orígenes por lo que la composición y estructura cristalina pueden variar aún más.
- Los enzimas forman un complejo intermedio con el sustrato para realizar su acción catalítica, por ello la adsorción y desorción y la formación del complejo enzima-sustrato son importantes.
- Los diferentes enzimas son inhibidos por los productos de la acción enzimática o por otros factores, disminuyendo su actividad.
- Como los enzimas deben alcanzar los centros reactivos de la estructura de la celulosa, deben considerarse los impedimentos espaciales y las resistencias a la transferencia

de materia tanto en el exterior de la partícula sólida como la difusión en el interior de los poros.

II.5.3.1 Celulasas

Las celulasas, enzimas capaces de atacar y degradar la celulosa a D-glucosa, pueden obtenerse a partir de bacterias y de hongos. Estos microorganismos pueden ser aerobios o anaerobios y termofílicos o mesofílicos. Los géneros de bacterias de las cuales se pueden obtener celulasas son: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* y *Streptomyces*. Aunque todas las bacterias producen enzimas de alta actividad, las derivadas de las bacterias anaerobias *Clostridium thermocellum* y *Bacteriodes cellulosolvens* tienen mayor actividad específica pero no se obtienen en grandes volúmenes. La baja capacidad de producción de enzimas y la necesidad de condiciones anaerobias de estas bacterias ha orientado la investigación a la obtención de celulasas a partir de hongos. Entre la gran variedad de especies activas de hongos, los más usados son los correspondientes a *Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Galbe y Zacchi, 2002). Otros hongos, capaces de producir celulasas, empleados son *Sclerotium rolfisii* y *Pachysolen chrysosporium* y el género *Schizophyllum*. De todos ellos, *Trichoderma* es el género más efectivo para hidrolizar celulosa y la más ampliamente empleada para obtener celulasas.

Las celulasas son, normalmente, una mezcla de varios enzimas capaces de degradar la celulosa a D-glucosa. El complejo celulolítico suele estar constituido por 4 enzimas: endo-1,4- β -glucanohidrolasa (endoglucanasa, EC 3.2.1.4), exo-1,4- β -glucanohidrolasa (exoglucanasa, celobiohidrolasa, EC 3.2.1.91), exo-1,4- β -glucosidasa y β -glucosidasa (celobiasa, EC 3.2.1.21). La exo-1,4- β -glucosidasa, que puede no estar presente en algunos preparados celulolíticos tiene la capacidad de producir D-glucosa sin que sea necesario obtener previamente celobiosa. Aparte de estos enzimas celulolíticos existen otros que atacan a la hemicelulosa, tales como: glucoronidasa, acetilestearasa, xylanasa, β -xylosidasa, galactomananasa y glucomananasa.

Las β -glucanasas hidrolizan la celulosa hasta celobiosa atacando las cadenas en los enlaces β -1,4 mientras la β -glucosidasa hidroliza la celobiosa a glucosa. La endo-glucanasa hidroliza los enlaces β -1,4 de forma aleatoria por lo que corta las cadenas de celulosa en otras de menor longitud. La exo-glucanasa ataca los finales no reductores de las cadenas de celulosa liberando moléculas de celobiosa.

Las glucanasas son inhibidas por la celobiosa mientras la glucosa inhibe a β -glucosidasa (inhibición de producto). Para reducir este tipo de inhibición se emplean varios métodos: alta concentración de enzimas, incrementar el contenido de β -glucosidasas y eliminar los azúcares durante la hidrólisis, ya sea por ultrafiltración o por hidrólisis y fermentación simultáneas, proceso SSF (Sun y Cheng, 2002). En la Figura II.19 se muestra la forma secuencial de actuar de estas enzimas. Estrictamente, la β -glucosidasa no es una celulasa porque su función sólo es romper los dímeros de la glucosa (celobiosa) que se encuentran en disolución y no ataca al sólido, pero su papel es muy importante porque al retirar la celobiosa de la disolución minimiza el efecto inhibitorio que esta tiene sobre la mayoría de las celulasas.

Como se observa en la Figura II.19, la eficiencia de la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos depende de la presencia de todas las enzimas que forman el complejo celulolítico y de que estas estén en su justa proporción. Así, cuando se emplean individualmente, la velocidad de producción de azúcar es baja, mientras que si se usa la combinación de enzimas que produce un mismo microorganismo se incrementa bastante dicha producción. Se dice entonces que existe un efecto sinérgico entre las distintas celulasas. A veces, un solo microorganismo no es capaz de hidrolizar la estructura, altamente cristalina, de la celulosa y es necesario mezclar los complejos celulolíticos de varios microorganismos, con lo que se incrementa el efecto sinérgico de cada complejo. Así, si se adiciona β -glucosidasa al complejo celulolítico de un microorganismo, como por ejemplo de *T. reesei*, se mejora la sacarificación del sistema respecto a si no se le agrega ya que a la mayor velocidad de obtención de glucosa se suma el descenso del efecto inhibitorio de la celobiosa. Por otra parte, también suele existir un incremento importante de la velocidad de hidrólisis cuando se mezclan pectinasas (hemicelulasas) con celulasas.

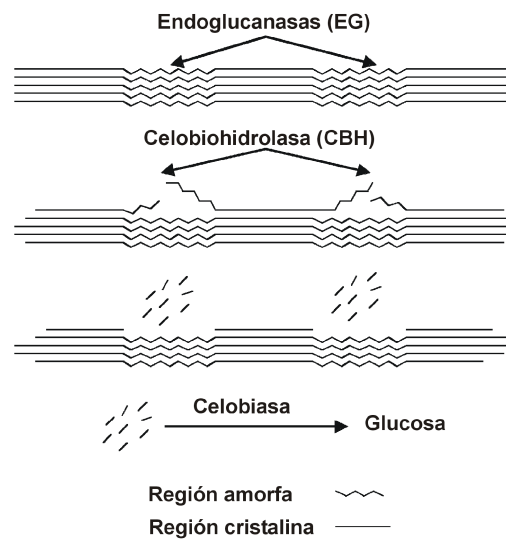


Fig. II.19 Efecto de las celulasas en la hidrólisis de la celulosa

El grado de sinergismo varía con la concentración, así, este aumenta hasta pasar por un máximo que suele corresponder a concentraciones de enzima previas a la saturación. Los valores de sinergismo bajos se corresponden con pequeños avances de la conversión por falta de enzima; o bien, cuando la concentración de celulasas es alta, a la saturación de los puntos de reacción por adsorción de celobiohidrolasa (enzima que se adsorbe preferentemente).

En todo caso, con el fin de mejorar la hidrólisis enzimática y dado que la celulosa de origen vegetal presenta una alta cristalinidad y un limitado número de enlaces activos, debe considerarse el someter al residuo a algún pretratamiento que disminuya la cristalinidad e incremente los centros de reacción.

Para que exista hidrólisis de los residuos lignocelulósicos de alguna forma debe formarse un intermedio de reacción muy activo formado por enzimas y cadenas de celulosa, pero existe el inconveniente de que el residuo se encuentra en medio sólido mientras el enzima está en disolución acuosa por lo que es necesario que lleguen a ponerse en contacto en los centros activos de reacción. Para ello debe considerarse la difusión tanto externa (exterior del residuo) como interna (en los poros internos del residuo), la adsorción del enzima en los centros activos, reacción, desorción y posterior difusión a otros centros de reacción. Respecto de la desorción y migración del enzima a otros centros de reacción, o la

desorción y reacción sobre los centros contiguos de la celulosa existen divergencias en la bibliografía. La adsorción y la formación del complejo enzima-sustrato se consideran como las etapas críticas en la hidrólisis enzimática de la celulosa. Según van Wyk (1997a) el pretratamiento más efectivo para mejorar la velocidad de adsorción de los enzimas y la sacarificación de los residuos lignocelulósicos es una combinación de molturación y homogeneización, ultrasonidos y finalmente un tratamiento con NaOH al 10% (p/v). Otro aspecto a considerar es el hecho de que la D-glucosa inhibe a celobiasa (β -glucosidasa) y la celobiasa inhibe a endo-glucanasa y exo-glucanasa (celobiohidrolasa), mientras parece ser que exo- β -glucosidasa no es inhibida por ninguno de los productos.

La desactivación de los enzimas también es un problema que puede aparecer, así la agitación puede causar un efecto de cizalla en los centros de reacción y desnaturalizar los enzimas; en estos casos, cuanto mayor es la agitación mayor es la desactivación. Si además los enzimas se exponen a la interfase aire-líquido el problema se agrava. La desactivación en esta interfase parece ser debida a un desdoblamiento de las proteínas, con la consiguiente desnaturalización. Cuando el líquido está sin agitación las enzimas en la interfase son minoritarias y el efecto de desactivación se minimiza, pero la presencia de agitación y la consiguiente renovación superficial incrementan el problema.

La agitación es fundamental para minimizar los efectos de la transferencia de materia de los enzimas de unas zonas a otras de reacción, esta transferencia es muy importante en la capa estática de líquido que rodea a las partículas sólidas, así como la difusión de los enzimas en el interior de la estructura cristalina del sustrato. En reactores discontinuos se suele considerar la velocidad inicial de reacción como la secuencia de los tres procesos siguientes:

- velocidad de transferencia de materia de los enzimas en la película estática de líquido que rodea al sustrato sólido
- velocidad de adsorción del enzima en la superficie del residuo
- velocidad de catálisis de la celulasa

pero una vez transcurridos los primeros instantes de reacción debe también considerarse la penetración y difusión del enzima en una estructura cristalina que cambia conforme avanza el proceso hidrolítico.

La gran mayoría de los estudios indican que la transferencia de materia es un proceso rápido comparado con la lentitud de la reacción catalítica y que sólo debe considerarse dentro del ciclo difusión \Rightarrow adsorción \Rightarrow catálisis \Rightarrow desorción \Rightarrow difusión a otros lugares. En este

proceso dinámico se pueden producir barreras a la transferencia de materia causadas por la película estancada de líquido y por los cambios que ocurren en la cristalinidad de la celulosa. Por otra parte, al igual que deben difundirse los enzimas también deben difundirse los productos (celobiosa y D-glucosa); la concentración local de estos causa inhibición de la actividad enzimática, por lo que la velocidad de hidrólisis se ve afectada por la eficiencia de la transferencia de materia en el reactor. La agitación, por tanto, debe ser suficiente para mantener las partículas sólidas en suspensión, pero no es conveniente incrementarla porque esto tiene poco efecto sobre la velocidad de hidrólisis y en cambio facilita la desnaturalización enzimática.

Los bajos valores de la cinética enzimática después de los instantes iniciales es indicativo de los problemas que tienen los enzimas para difundirse y atacar al sustrato, además, dada su naturaleza de macromolécula (proteínas) aparece impedimento estérico para difundirse por el interior de los pequeños poros de la estructura de la celulosa.

Igualmente, las enzimas al degradar las regiones amorfas incrementan la cristalinidad de la celulosa y, al ser incapaces de atacarla, incrementan la resistencia al proceso hidrolítico y afectan a la cinética de la reacción.

Finalmente, los factores que afectan a la cinética de la reacción de hidrólisis son:

- Reducción de la actividad de las celulasas por
 - desactivación mecánica e inhibición de producto
 - formación de enlaces no productivos
 - reducción de la adsorbabilidad de los enzimas
- Reducción de la calidad del sustrato por
 - cambio de la estructura e incremento de la cristalinidad de la celulosa
 - incremento de la superficie de zonas no hidrolizables
 - disminución de las zonas reactivas del sustrato
- Incremento de la resistencia interna a la transferencia de materia por
 - reducción de la accesibilidad de los enzimas por cambios estructurales del sustrato
 - incremento de la resistencia a la difusión interna por la degradación inicial de la celulosa amorfa de la superficie.

II.5.3.2 Influencia de las variables de operación

Tamaño de partícula

Al ser una reacción heterogénea de un sólido que se disuelve en un líquido que contiene un catalizador de la reacción es necesario que exista una interfase sólido-líquido (sustrato-agua) para que se puedan formar los enlaces entre los enzimas y el sustrato a hidrolizar. Por ello, cuanto mayor sea la superficie mayor será el número de contactos y la velocidad de hidrólisis; pero esto sólo se verifica a tiempos de hidrólisis bajos y en poca medida, pues a tiempos altos, por encima de unas 10 horas de tiempo de reacción, la influencia del tamaño de las partículas de sustrato sobre la velocidad de hidrólisis es insignificante (Gan *et al.*, 2003).

Esto puede justificarse porque los enzimas, de elevado tamaño, no se pueden difundir por el interior de los poros del sólido y sólo se unen a los centros activos de la superficie. De esta forma se entiende que al comienzo de la reacción la velocidad de hidrólisis sí se vea afectada por el tamaño de partícula, pero con el transcurso del tiempo y de la reacción las partículas van degradándose y su calidad superficial va disminuyendo por lo que la influencia del tamaño cada vez es menor.

Composición y estructura cristalina del sustrato

La estructura y composición únicamente deben ser considerados al inicio de la reacción donde sí tienen bastante influencia, pero con el transcurso de la hidrólisis los cambios que se operan en la cristalinidad del sustrato dejan de tener una influencia apreciable. Los sustratos cuya fracción de estructura inerte sea muy elevada deben ser sometidos a un pretratamiento que, aún sin romper la estructura cristalina, la esponjen e incrementen los centros activos.

Respecto de la composición de sustratos vegetales, también influye sobre la velocidad de hidrólisis el contenido en lignina, ya que esta bloquea el acceso de las celulasas a la celulosa y forma enlaces irreversibles con las enzimas hidrolíticas, forma intermedios no reactivos. Por ello, la eliminación de la lignina mejora enormemente la velocidad de hidrólisis.

Concentración de sustrato

La concentración de sustrato es uno de los factores más importantes que influyen sobre la velocidad inicial de la reacción. El empleo de elevadas concentraciones tiene dos ventajas inmediatas:

- Altas velocidades de reacción iniciales
- Alta producción de azúcares reductores totales

pero tiene los inconvenientes,

- A mayor concentración de sustrato menor es su conversión
- Puede aparecer inhibición de sustrato y, por tanto, disminución de la velocidad de reacción

Estas características, derivadas de la concentración, influyen directamente sobre el volumen de reactor a emplear y sobre el rendimiento del proceso hidrolítico. De cualquier forma, si se pudieran retirar los azúcares reductores totales, y por tanto su poder inhibitorio, podrían obtenerse conversiones mayores del sustrato y a las ventajas de elevada velocidad de reacción se sumaría la de mayores ratios de conversión.

Concentración total de enzima

Con el incremento de la concentración de celulasas mejora la velocidad de reacción del proceso, pero también se incrementa significativamente el coste. Dependiendo del tipo y concentración del sustrato usado se emplean concentraciones de enzima que varían entre los 7 y los 33 FPU/g de sustrato (Sun y Cheng, 2002). Por FPU (filter paper units) se considera la actividad enzimática de 1 cm³ de disolución de enzima sin diluir que en un minuto es capaz de generar 1 μmol de azúcares reductores totales como D-glucosa (Adney y Baker, 1996).

Según Gan *et al.* (2003), tras un período inicial (entre 6 y 10 horas) de intensa actividad catalítica, caracterizada por fuertes interacciones enzima-sustrato, alrededor del 20% del enzima se encuentra libre en disolución, pero únicamente el 40% de esta muestra actividad catalítica. El 60% restante, no activo, corresponde a enzimas cuantificables, cara a la concentración en disolución, pero desactivados. Tras este rápido descenso inicial de la

concentración libre de enzimas y de la actividad, la cuantificación enzimática permanece prácticamente constante mientras la actividad catalítica progresivamente va descendiendo.

El descenso de actividad está motivado por la inhibición de producto, la unión de los enzimas a zonas de sustrato no activas (regiones no hidrolizables) y la desactivación por cizalla causada por la agitación. De estas posibles causas de inhibición, el efecto de la absorción irreversible de las celulasas sobre la superficie del sustrato puede ser minimizado mediante la adición de agentes de superficie que modifiquen las propiedades superficiales del sustrato. De los diferentes agentes que pueden emplearse (Tween 20, 80, 81, polioxietilenglicol, Emulgen 147, Anhitole 20BS anfótero, Q-86W catiónico, bacitracin, etc.) parece ser que los más adecuados para mejorar la velocidad de hidrólisis son los agentes no iónicos (Sun y Cheng, 2002).

pH y temperatura de operación

Ambas variables actúan sobre la velocidad del proceso de hidrólisis ajustándola a curvas que presentan máximos a valores concretos. El pH puede influir de varias formas:

- Los centros activos de los enzimas están constituidos por aminoácidos con grupos ionizados que pueden variar con el pH
- Los aminoácidos que no estén presentes en los centros activos también pueden ionizarse y con ello provocar modificaciones de conformación de los enzimas.
- Los centros de reacción del sustrato también pueden verse afectados por efecto del pH.

Igualmente, la temperatura también actúa sobre los enzimas modificando su actividad catalítica; así, a temperaturas bajas la estructura cristalina, de los enzimas, es más rígida y su movilidad menor y a altas temperaturas, aunque se mejore su adsorción y desorción, comienzan a desnaturalizarse y su actividad desciende (van Wyk, 1997b).

II.5.4 Inhibidores de la fermentación

El proceso de hidrólisis ácida de la biomasa lignocelulósica es rápido y fácil de realizar pero presenta el inconveniente de que no es selectivo por lo que se forma gran cantidad de bioproductos y, junto con los azúcares, se libera una amplia variedad de

compuestos algunos de los cuales son tóxicos para la posterior fermentación. Igualmente, previo a la hidrólisis enzimática el residuo lignocelulósico debe someterse a un pretratamiento, que puede ser con vapor a alta presión, una prehidrólisis ácida o un tratamiento alcalino; en el cual se generan productos tóxicos.

Así, los tratamientos de la biomasa que tienen lugar a altas temperaturas y, a veces, bajo condiciones ácidas favorecen la formación de estos compuestos que se esquematizan en la Figura II.20 (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000b).

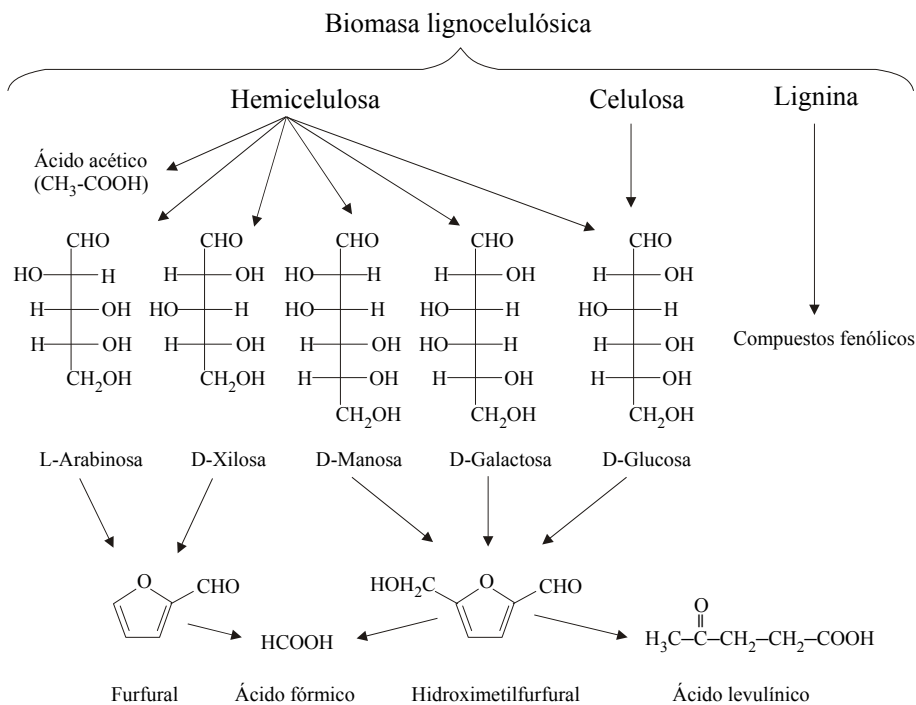


Fig. II.20 Generación de inhibidores

En los hidrolizados de residuos lignocelulósicos pueden encontrarse los siguientes inhibidores:

- Metales contenidos en los residuos o que suelen provenir de las mismas máquinas y equipos de hidrólisis.
- Productos derivados de la hidrólisis de la hemicelulosa y celulosa: ácido acético, furfural e hidroximetilfulfural, ácido fórmico y ácido levulínico.

- Productos derivados de la degradación de la lignina: compuestos fenólicos, ácidos aromáticos y aldehídos.
- Productos derivados de los extractos: ácidos vainillínico, syringico, caprílico, caprílico, pelargónico y palmítico.

Mediante hidrólisis y en los pretratamientos realizados a alta presión y temperatura se liberan los azúcares que constituyen la hemicelulosa y la celulosa, pero a estas condiciones de trabajo los azúcares liberados se degradan rápidamente a furfural e hidroximetilfurfural (HMF), reacción que puede avanzar hasta formar ácido fórmico y ácido levulínico. Los compuestos fenólicos se obtienen por la descomposición parcial de la lignina, aunque también pueden formarse durante la degradación de los carbohidratos.

Como complemento de la Figura II.20, en el hidrolizado también estarán presentes compuestos provenientes de los extractos de la madera los cuales pueden solubilizarse parcial o totalmente durante el tratamiento que se realiza. Dado que estos compuestos tienen como misión la protección de las plantas de los organismos patógenos, pueden tener efecto inhibidor. En este sentido, Ranatunga *et al.* (1997) fermentando hidrolizados con *S. cerevisiae* han determinado que estos compuestos tienen un muy bajo efecto inhibidor y con un tratamiento de *overliming* se eliminan completamente.

En cualquier caso, la concentración máxima permitida para un inhibidor, de cara a la fermentación posterior, no se puede prefijar con carácter general, dado que depende de factores tales como la cepa de levadura utilizada y su grado de adaptación al medio, las condiciones de operación aplicadas a la fermentación y la presencia de otros inhibidores. En la Tabla II.16 se muestran los inhibidores obtenidos, y su concentración, por diversos autores que han empleado distintos residuos y diferentes técnicas de hidrólisis (Parajó *et al.*, 1998c).

TABLA II.16
INHIBIDORES OBTENIDOS POR TRATAMIENTO DE DISTINTOS RESIDUOS

Residuo	Hidrolisis	Concentración, kg/m ³										Referencia		
		Azúcar					Inhibidores							
		D-Xilosa	D-Glucosa	L-Arabinosa	D-Manosa	D-Galactosa	Ácido acético	Furfural	HMF ^a	pH ^b	Vainillina			
Bagazo caña azúcar	H ₂ SO ₄ , 130°C	40,5	5,5	5,1	-	-	10,4	3,6	-	-	-	-	-	Watson <i>et al.</i> (1984)
Bagazo caña azúcar	H ₂ SO ₄ , 120°C	3,3	2,7	3,0	-	-	6,6	0,3	-	-	-	-	-	Chen y Gong (1985)
Madera de Roble	H ₂ SO ₄ , 100°C	105,3	30,1	47,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tran y Chambers (1986)
Maderas blandas	H ₂ SO ₄ , 150 °C	50	-	-	-	-	12,1	1,3	-	-	-	-	-	Yu <i>et al.</i> (1987)
Maderas blandas	Tratamiento con sulfuro	7,8	3,3	1,7	16,2	-	-	-	-	-	-	-	-	Linden y Hahn-Hägerdal (1989)
Maderas blandas	Tratamiento con sulfuro	11	6	4,5	16,5	-	-	-	-	-	-	-	-	Linden y Hahn-Hägerdal (1989)
Paja de trigo	HIF	10	27,5	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	Björfling y Lindman (1989)
Maderas blandas	Tratamiento con sulfuro	9	7	2	21	6	3	0,2	-	-	-	-	-	Prior <i>et al.</i> (1989)
Madera de pino	HCl, 167°C	5,6	5,2	1,7	9,2	1,2	0,4	-	-	-	-	-	-	Prior <i>et al.</i> (1989)
Madera de álamo	HCl, 165°C	15,3	6,3	0,9	1,2	0,8	0,6	-	-	-	-	-	-	Prior <i>et al.</i> (1989)
Madera de álamo	H ₂ O, 240°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Wilson <i>et al.</i> (1989)
Madera de roble	2,5% sólidos	12,3	0,9	-	-	-	-	0,1	-	-	0,5	0,1	-	Wilson <i>et al.</i> (1989)
Madera de roble	5% sólidos	23,7	1,7	-	-	-	-	0,3	-	-	1,1	0,2	-	Wilson <i>et al.</i> (1989)
Madera de eucalipto	H ₂ SO ₄ , 190°C	43,5	9,0	2,9	3,4	-	10,9	0,3	0,9	-	-	-	-	Perego <i>et al.</i> (1990)
Madera de eucalipto	H ₂ SO ₄ , 190°C	30	1,5	2,8	1	3,7	10	-	-	-	-	-	-	Ferrari <i>et al.</i> (1992)
Bagazo caña azúcar	H ₂ SO ₄ , 190°C	90,6	18,8	11,0	-	-	16,7	-	-	-	-	-	-	Gong <i>et al.</i> (1993)
Bagazo caña azúcar	H ₂ SO ₄ , 140°C	54,5	10,7	7,7	-	-	4,7	-	-	-	-	-	-	Roberto <i>et al.</i> (1995a)
Paja de arroz	H ₂ SO ₄ , 140°C	61	18,9	11	-	-	1,5	-	-	-	-	-	-	Roberto <i>et al.</i> (1995a)
Paja de arroz	H ₂ SO ₄ , 140°C	79,3	22,6	13,4	-	-	1,8	0,1	0,5	-	-	-	-	Roberto <i>et al.</i> (1995b)
Madera de eucalipto	H ₂ SO ₄ , 100°C	17,1	1,68	2,13	2,99	<0,5	-	-	-	-	-	-	-	Parajo <i>et al.</i> (1996a)
Madera de eucalipto	H ₂ SO ₄ , 130°C	18	3,6	0,6	-	-	5,2	<0,5	-	-	-	-	-	Parajo <i>et al.</i> (1996c)
Bagazo caña azúcar	H ₂ SO ₄ , 140°C	18,5	5,1	-	-	-	3-7	2,0	0,08	-	-	-	-	Pessoa <i>et al.</i> (1996)
Bagazo caña azúcar	H ₂ SO ₄ , 100°C	66,9	23,9	7,9	-	-	13,9	-	-	-	-	-	-	Dominguez <i>et al.</i> (1996)
Madera de eucalipto	H ₂ SO ₄ , 150°C	52,9	19,5	-	-	-	24,3	0,25	0,42	-	-	-	-	Felipe <i>et al.</i> (1996a)
Paja de arroz	H ₂ SO ₄ , 145°C	16,4	4,4	2,3	-	-	1,4	0,4	0,1	-	-	-	-	Roberto <i>et al.</i> (1996b)
Sauce	SO ₂ , vapor, 205°C	5,2	2,0	-	0,6	0,5	2,6	0,1	0,2	-	-	-	-	Palmaqvist <i>et al.</i> (1997)
Maderas duras	HCl, 165°C	15,3	6,3	0,9	1,2	0,8	4,8	-	-	-	-	-	-	Parekh <i>et al.</i> (1987)
Madera de pino	HCl, 167°C	5,6	5,2	1,7	9,2	1,2	2,7	-	-	-	-	-	-	Parekh <i>et al.</i> (1987)
Madera de conifera	SO ₂ , 203°C	6,4	4,5	1,7	10,0	1,3	2,8	-	-	-	-	-	-	Parekh <i>et al.</i> (1987)

^a Hidroximetilfurfural, ^b Acido p-hidroxibenzoico

II.5.4.1 Mecanismos

Ácidos débiles

Los ácidos débiles tienen un pK_a alto. Cuando este es igual al pH del medio se verifica que la concentración de las formas disociada y molecular son iguales y por tanto la capacidad tampón es mayor. Así, los ácidos acético, levulínico y fórmico presentan pK_a de 4,75, 4,66 (25 °C) y 3,75 (20 °C), respectivamente. Como la fermentación de los hidrolizados se realiza a pH muy próximos a estos la concentración de ambas formas de los ácidos se verá muy afectada por las condiciones de trabajo.

La forma molecular de los ácidos débiles se disuelve en las grasas (son liposolubles) y puede difundirse a través de las membranas plasmáticas originando el descenso del pH citoplasmático e inhibiendo el crecimiento celular. Para un óptimo crecimiento es necesario mantener en equilibrio el pH a ambos lados de la membrana celular, así, se ha detectado que el crecimiento se ve linealmente afectado por el descenso del pH. En ausencia de ácido acético se ha determinado, para *Saccharomyces cerevisiae*, que el pH mínimo para que exista algo de crecimiento es de 2,5 mientras si en la disolución hay ácido acético (10 kg/m³) el pH mínimo asciende a 4,5 (Tahezadeh *et al.*, 1997). También indica que aunque a concentraciones elevadas es un fuerte inhibidor a concentraciones bajas ejerce un efecto estimulador para la producción de etanol; así, concentraciones de la forma molecular próximas a 5 kg/m³ son inhibitoras (Millati *et al.*, 2002), en cambio si es de 3,3 kg/m³ se favorece la generación de etanol, respecto a si la concentración fuese cero. En cualquier caso, el ácido acético inhibe la formación de biomasa, así Parajó *et al.* (1998c) indican que concentraciones superiores a 1,45 kg/m³ inhiben completamente el crecimiento de *P. tannophilus*, y este efecto es más marcado a menores pH. En la Tabla II.17 se muestra la influencia de diferentes concentraciones de ácido acético sobre el crecimiento celular de diferentes levaduras.

Respecto del efecto inhibidor de los ácidos fórmico y levulínico, estos se comportan de forma similar al acético; así, a bajas concentraciones incrementan la formación de etanol y a altas concentraciones muestran su carácter inhibidor. En cualquier caso, muestran diferente toxicidad a concentraciones similares, lo cual puede deberse a diferente permeabilidad de la membrana o incluso a distinta toxicidad de su forma aniónica en el citoplasma de la célula (Larsson *et al.*, 1999). Cuando el pH del medio es bajo las células bajan su pH citoplasmático para intentar mantener un gradiente de protones nulo a ambos lados de la membrana, esto origina que los ácidos del interior de la célula se encuentren en

su forma aniónica, fundamentalmente. Por ello, parece ser que es la concentración del anión en el interior de las células la causa del efecto tóxico de los ácidos débiles.

TABLA II.17
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO
EN EL CRECIMIENTO CELULAR DE DIVERSAS LEVADURAS

Concentración de ácido acético, kg/m ³	Concentración de biomasa, kg/m ³			Crecimiento, %
	Maiorella <i>et al.</i> , (1983) ^a	Phowchinda <i>et al.</i> , (1995) ^b	Watson <i>et al.</i> , (1984) ^c	Delgenes <i>et al.</i> , (1996) ^d
0	1,75	4,58	0,78	100
0,25	1,7	---	---	---
0,5	1,4	---	---	---
1	---	3,65	0,69	---
2	---	2,98	---	---
3	---	2,56	---	---
4	---	1,94	---	---
5	---	1,53	---	63
6	---	1,48	---	---
7,5	---	---	0,22	---
8,5	0,25	---	---	---
10	---	---	---	64
14,2	---	---	0,15	---
15	---	---	---	64

^a *Sacharomyces cerevisiae*: concentración inicial de D-glucosa, 20 g/L; v/V (volumen del medio/volumen del sistema) = 2,4/5; 5% saturación de oxígeno.

^b *Sacharomyces cerevisiae*: concentración inicial de D-glucosa, 50 kg/m³; 30 °C.

^c *Pachysolen tannophilus*: concentración inicial de D-xilosa, 10 kg/m³; 30°C; 130 rpm; v/V = 2/5

^d *Pichia stipitis*: concentración inicial de D-xilosa, 20 kg/m³; 30°C; 150 rpm; v/V = 50/100.

Furfural e hidroximetilfurfural

Saccharomyces cerevisiae es capaz de degradar el furfural bajo condiciones anaerobias, con limitación de oxígeno, y aerobias, a furfural alcohol el cual tiene un pequeño efecto inhibitor sobre el crecimiento anaerobio de *S. cerevisiae* y algo más importante sobre el aerobio de *Pichia stipitis*. Bajo condiciones aerobias también puede oxidarse a ácido furoico aunque en pequeña cantidad. El furfural se metaboliza a bajas concentraciones,

incrementando la velocidad proporcionalmente con la concentración, pero llegado un cierto valor máximo la reacción se detiene. Así, para *S. cerevisiae* este valor máximo es de 0,084 mol/g, probablemente debido a que para valores mayores las células mueren (Palmqvist *et al.*, 1999a).

El furfural inhibe el crecimiento celular y la producción de etanol, aunque de forma más importante el primero. A concentraciones bajas, inhibe la capacidad de replicación de las células pero incrementa algo la producción de etanol mientras a valores elevados produce la muerte de la biomasa. *S. cerevisiae* es capaz de adaptarse a medios con furfural en disolución consiguiendo así incrementar la producción celular y la formación de etanol. Tras la adaptación, esta levadura parece ser que libera un enzima capaz de degradar el furfural (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000b).

El hidroximetilfurfural (HMF) también puede ser degradado por *S. cerevisiae* pero a menor velocidad que el furfural debido a su menor permeabilidad por la membrana. Esta menor velocidad origina que el período de adaptación de las células al medio (fase lag) sea mayor que el correspondiente a la presencia de furfural. El HMF inhibe de forma similar a la del furfural.

En la Tabla II.18 se muestra la influencia del furfural sobre el crecimiento celular de varias levaduras (Parajó *et al.*, 1998c).

TABLA II.18
INFLUENCIA DEL FURFURAL EN EL CRECIMIENTO CELULAR
DE DIVERSAS LEVADURAS

Furfural, kg/m ³	Velocidad relativa de crecimiento, %					
	<i>P. tannophilus</i> ^a	<i>P. stipitis</i> ^b	<i>P. stipitis</i> ^c	<i>C. shehatae</i> ^c	<i>S. cerevisiae</i> ^c	<i>Z. mobilis</i> ^c
0	100	100	100	100	100	100
0,35	85,9	---	---	---	---	---
0,5	---	114,4	75	81	53	82
1	---	96,4	53	62	19	81
1,75	5,13	---	---	---	---	---
2	---	2,4	1	9,7	10	44
3	---	0	---	---	---	---
4	---	0	---	---	---	---

Condiciones de cultivo:
^a v/V = 2/5; S₀ = 10 kg/m³; 168 h (Watson *et al.*, 1984)
^b 30°C; v/V = 2/5; S₀ = 10 kg/m³; 36 h (Roberto *et al.*, 1991b)
^c 30°C; pH₀ = 5,6; 150 rpm; v/V = 1/2; S₀ = 20 kg/m³; 36 h (Delgenes *et al.*, 1996)

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos presentan un alto efecto inhibitor en la fermentación de hidrolizados, seguramente debido a su menor peso molecular. Parece ser que actúan sobre la membrana disminuyendo su capacidad como barrera selectiva. La capacidad de inhibición de estos compuestos se elimina cuando el hidrolizado es tratado con el enzima laccasa, capaz de oxidar la lignina.

Los principales compuestos fenólicos de los hidrolizados son: ácido 4-hidroxibenzoico, vainillina, catecol y otros compuestos de bajo peso molecular. El ácido 4-hidroxibenzoico es un compuesto muy abundante en los hidrolizados de madera dura por lo que se ha estudiado su toxicidad sobre diferentes levaduras. Para *S. cerevisiae* Jönsson *et al.* (1998) indican que este compuesto es inhibitor de la fermentación incluso a concentraciones de 1 g/L; en cambio, Palmqvist *et al.* (1999a) indican que con 2 g/L de ácido 4-hidroxibenzoico no han detectado inhibición en el crecimiento o en la formación de etanol.

La vainillina es un compuesto importante en los hidrolizados de abeto, pino y sauce y es menos tóxico que el ácido 4-hidroxibenzoico. Para *S. cerevisiae* se ha comprobado que asimila vainillina, hidroxibenzaldehido y siringilaldehido (Delgenes *et al.*, 1996) por lo que

puede deducirse que a concentraciones bajas los derivados de la lignina parecen no tener efecto tóxico sobre las levaduras empleadas en fermentación, aunque sí incrementan la fase de adaptación.

Según Jönsson *et al.* (1998) los compuestos fenólicos de bajo peso molecular son los más inhibidores de todos los presentes en los hidrolizados lignocelulósicos.

El efecto tóxico de los distintos componentes se incrementa, además, con el descenso de la actividad del agua, como por ejemplo el aumento de la salinidad, que se corresponde con el incremento del estrés hídrico, ya que los microorganismos resisten ciertos valores de estrés pero llegado un determinado valor se produce la muerte celular.

II.5.4.2 Desintoxicación de los hidrolizados

Para elegir un método de eliminación de los productos tóxicos en los hidrolizados se deben considerar dos cuestiones previas:

- Dependiendo de la severidad del tratamiento y del origen de la biomasa hidrolizada los inhibidores presentes y su composición en el hidrolizado pueden ser muy variables por lo que el grado de inhibición también lo será y
- Cada levadura presenta diferentes tolerancias a estos compuestos tóxicos

por lo que debería realizarse un estudio previo de fermentación e inhibición para los casos concretos que se vayan a estudiar, o bien, obtenerlos de la bibliografía pero adaptarlos a la biomasa y condiciones de la hidrólisis así como al microorganismo a emplear en la fermentación.

Desintoxicación biológica

Los hidrolizados pueden tratarse con los enzimas peroxidasa y laccasa procedentes de hongos ligninolíticos (ej. *Trametes versicolor*). Con este tratamiento se puede incrementar la producción de etanol hasta 3 veces (Jönsson *et al.*, 1998). Laccasa elimina selectiva y completamente los compuestos fenólicos por oxidación.

Un efecto similar presenta el hongo *Trichoderma reesei*, sobre los hidrolizados ácidos, con incrementos en la producción de etanol similares, aunque la forma de operar es distinta ya que también consigue eliminar ácido acético, furfural y derivados del ácido benzoico (Palmqvist *et al.*, 1997).

Desintoxicación física

De todos los bioproductos liberados durante la hidrólisis aquellos que son volátiles no tienen un efecto tóxico importante, son mucho más inhibidores los componentes no volátiles (Palmqvist *et al.*, 1996), por ello, concentrar los hidrolizados, por evaporación, puede incrementar el carácter inhibidor de estos. Cualquier desintoxicación sólo puede tener lugar por descenso o eliminación del ácido acético, furfural y vainillina. Para eliminar los compuestos tóxicos se suelen utilizar disolventes como dietil-éter y acetato de etilo que individualmente o combinados con álcali (los inhibidores no son estables en medio alcalino) consiguen reducirlos o incluso eliminarlos y mejoran de forma importante la producción de etanol y la velocidad de consumo de D-glucosa (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a). De los compuestos extraídos con estos disolventes orgánicos los más tóxicos son los compuestos fenólicos de bajo peso molecular.

Desintoxicación química

Consiste en emplear medio alcalino para eliminar o disminuir la capacidad inhibidora de los hidrolizados. Se emplean varios métodos de desintoxicación semejantes, porque en todos ellos se incrementa el pH hasta 9-11 y después se reajusta al de fermentación, con H₂SO₄ generalmente, (Palmqvist *et al.*, 1998; Larsson *et al.*, 1999; Palmqvist y Hahn-Hägerdal., 2000b):

- Se incrementa el pH con Ca(OH)₂ (*overliming*) y se reajusta con H₂SO₄. Mediante este procedimiento se forma un gran precipitado y se produce un gran incremento de la productividad de etanol. Esta forma de operar se basa en la precipitación de algunos compuestos inhibidores y en la inestabilidad de otros a altos pH. Amartey y Jeffries (1996) lo aplican a un hidrolizado de mazorca de maíz obteniendo buenos resultados.

- Incremento del pH con NaOH y reajuste al de fermentación. Mejora la fermentabilidad de los hidrolizados por precipitación o descomposición de los componentes tóxicos. Este método tiene un menor rendimiento que el de *overliming*.
- Incremento del pH con NaOH y Ca(OH)₂ y reajuste con H₂SO₄. Es mejor que cada uno de los anteriores individualmente ya que parece que se produce un cierto efecto sinérgico entre ellos. Con este método se reduce la concentración de las cetonas de Hibbert, del furfural y del hidroximetilfurfural. En cambio, ni con este ni con los anteriores se afecta la concentración de ácido acético.
- Incremento del pH con álcali y Na₂SO₃. Este método suele emplear hidróxido cálcico o sosa como álcali y opera a temperaturas elevadas. Es uno de los mejores métodos, seguramente porque se eliminan los aldehídos y las cetonas de Hibbert, y los compuestos volátiles por el tratamiento en caliente.

Según Nigam (2002) la fermentabilidad con *Pichia stipitis* de un hidrolizado ácido de *Eichhornia crassipes* se mejoró bastante tras un tratamiento de desintoxicación a ebullición con hidróxido cálcico y sulfito sódico (pH =10).

Otros métodos de desintoxicación son el empleo de *overliming* hasta pH 10 e intercambio iónico o, tratamiento con laccasa e intercambio iónico. Estos métodos mejoran en gran medida la fermentabilidad de los hidrolizados pero tienen el inconveniente de que también elimina azúcares fermentables por lo que no es factible su uso (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a).

Millati *et al.* (2002) estudian la desintoxicación de hidrolizados con Ca(OH)₂, *overliming*, a diferentes pH, tiempos y temperaturas. Como conclusiones indican que, fundamentalmente, se elimina furfural e hidroximetilfurfural; el ácido acético no resulta afectado y que el descenso de los compuestos fenólicos totales no es mayor del 30%. A mayor pH y tiempo de tratamiento se mejora la fermentabilidad del hidrolizado, en cambio, parece ser que la temperatura no tiene mucha influencia, aunque cuanto menor es esta más fermentable resulta el hidrolizado desintoxicado. Cuando se trabaja a pH superiores a 11 se inician procesos de degradación de los azúcares que son tanto más rápidos cuanto mayor es la temperatura.

II.6 OBTENCIÓN DE XILITOL

El xilitol, de fórmula $C_5H_{12}O_5$, es un pentaalcohol con un poder edulcorante similar a la sacarosa que se encuentra en frutas y vegetales. Los humanos adultos lo producimos y consumimos entre 5 y 15 g/día (Parajó *et al.*, 1998a). Este producto limita la tendencia a la obesidad y mejora las características de los alimentos sin modificar sus propiedades. Junto con la fructosa, el xilitol está recomendado para los enfermos diabéticos. Es un anticariogénico ya que impide el crecimiento de las bacterias bucales, favorece la remineralización de las lesiones, incrementa el flujo de saliva y dificulta la fermentación de carbohidratos. Además, el xilitol ejerce un efecto refrescante al disolverse en la saliva por lo que sirve de base para la fabricación de diversos productos que se ingieren por la boca.

Frente a todas las ventajas que presenta existe una gran desventaja, su elevado coste de producción; aunque se están desarrollando tecnologías capaces de hacer descender los costes. Una de estas tecnologías consiste en la síntesis de xilitol a partir de disoluciones de D-xilosa, obtenidas por hidrólisis de la hemicelulosa de los residuos lignocelulósicos, mediante fermentación con levaduras.

II.6.1 Procesos para obtención de xilitol

Existen varias tecnologías para la producción de xilitol, las cuales se resumen en la Figura II.21.

A) Extracción sólido-líquido

El xilitol se encuentra de forma natural en muchas frutas y verduras, lechuga, coliflor, ciruelas, fresas, uvas, plátanos, algas marinas, champiñón, etc.; aunque se encuentra en tan baja concentración que su extracción es antieconómica.

B) Síntesis química

La síntesis se realiza a partir de D-xilosa, que se obtiene de los xilanos que componen la hemicelulosa de los residuos celulósicos. Para liberar la D-xilosa deben someterse los residuos a hidrólisis ácida o enzimática. Dado que la hemicelulosa contiene otros azúcares polimerizados, tras la hidrólisis también se libera D-glucosa, arabinosa, manosa y galactosa, por lo que es muy difícil obtener D-xilosa pura. Previo a la hidrogenación catalítica de la

D-xilosa, esta deberá purificarse por lo que el proceso se encarece. Tras la hidrogenación se separa, por fraccionamiento cromatográfico, el xilitol y se cristaliza.

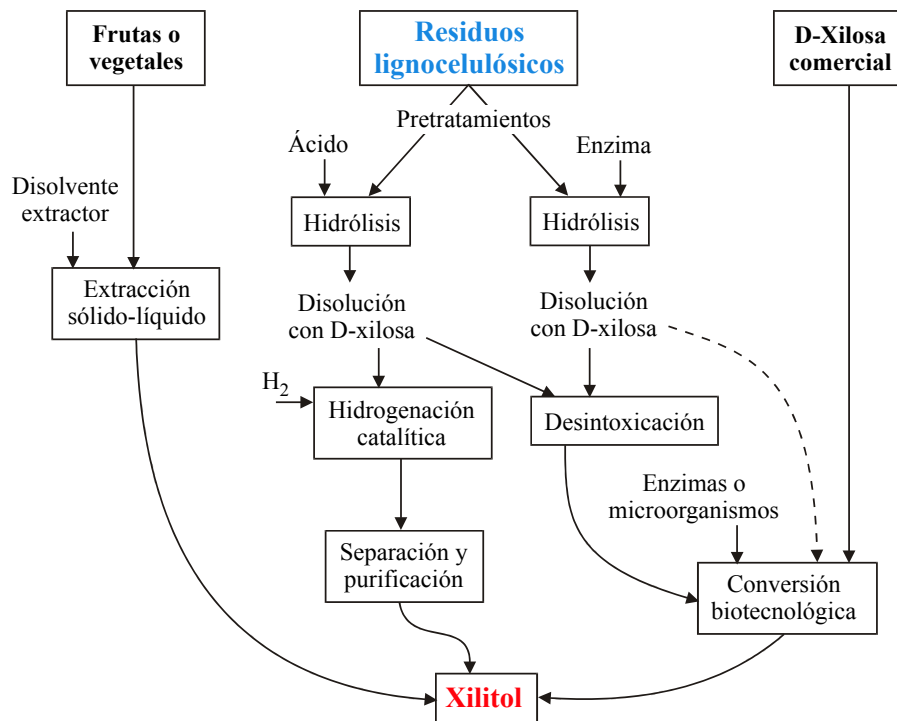


Fig. II.21 Alternativas tecnológicas para la producción de xilitol

C) Procesos biotecnológicos

Estos procesos se basan en la transformación de la D-xilosa, mediante microorganismos y enzimas, a xilitol.

Producción de xilitol con bacterias

La mayoría de las bacterias producen la enzima xilosa isomerasa que, como ya se ha indicado, transforma la D-xilosa en xilulosa, la cual mediante xilulokinasa se convierte en xilulosa 5-fosfato y mediante la vía de la pentosafofosfato se incorpora al proceso de glucólisis. Pero existen algunas bacterias, como *Corynebacterium* y *Enterobacter*, que producen xilitol

mediante un sistema enzimático de oxidación-reducción que reduce la D-xilosa a xilitol y oxida la xilulosa. Se ha llegado a obtener, con *Enterobacter*, concentraciones de 33,3 kg xilitol/m³, en un medio que inicialmente contenía 100 kg D-xilosa/m³ y con una productividad de 0,35 kg/(m³ h) (Parajó *et al.*, 1998a).

Producción de xilitol con hongos

Los hongos metabolizan D-xilosa, por conversión a D-xilulosa, mediante un proceso de oxidación-reducción y no mediante la utilización del enzima xilosa isomerasa.

Producción de xilitol con levaduras

Las levaduras metabolizan D-xilosa mediante el proceso de oxidación-reducción mostrado en la Figura II.21, utilizando las enzimas xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa. Pero mediante este camino el resultado es la obtención de etanol y no de xilitol, el cual es un intermedio del proceso anterior. Por ello, para obtener xilitol, las levaduras deben modificarse genéticamente para que sólo se produzca la reacción con xilosa reductasa y no la segunda con xilitol deshidrogenasa. La levadura, mutada genéticamente, que posee mayor capacidad de producción de xilitol a partir de D-xilosa es, según Parajó *et al.* (1998a), *P. tannophilus*.

Estos mismos autores indican que D-xilosa puede metabolizarse, dependiendo del nivel de oxígeno disuelto, según dos reacciones. En la primera, bajo condiciones de oxígeno limitado, se puede obtener, teóricamente, hasta 0,905 moles de xilitol/mol D-xilosa. En la segunda, bajo condiciones de anaerobiosis, también se obtiene xilitol pero con un rendimiento teórico inferior, 0,875 mol xilitol/mol xilosa.

Considerando las levaduras *P. stipitis* y *P. tannophilus* indican que la primera produce más xilitol bajo condiciones de anaerobiosis y la segunda en condiciones de limitación de oxígeno. En general, y dada la gran cantidad de variables que influyen sobre el proceso de fermentación para obtener xilitol, no existe un criterio claro entre los diversos autores acerca de la influencia de la aireación, aunque como norma general se acepta que la máxima velocidad de obtención de xilitol y su máxima concentración se alcanzan para valores de aireación intermedios, ni medio aerobio ni anaerobio. Así, cuanto mayor es la concentración de D-xilosa en el medio inicial mayor es la necesidad de aireación, mientras

para concentraciones de D-xilosa iniciales inferiores a 90 kg/m³ sólo es necesaria una microaireación.

La bioconversión de D-xilosa en xilitol mediante el empleo de diferentes levaduras es una experimentación muy estudiada, como puede deducirse de la Tabla II.19 (Parajó *et al.*, 1998b). Las mayores producciones de xilitol se obtienen de las cepas de *Candida*, así se destacan *Candida sp.*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. shehatae*, además de *P. tannophilus*; si bien estas dos últimas producen tanto xilitol como etanol.

La conversión de D-xilosa en xilitol es un proceso complejo sobre el que influyen bastantes variables que van desde las características de la cepa de levadura empleada hasta el origen de los azúcares a fermentar, la presencia de otros azúcares, inhibidores de la fermentación, etc. De todos los posibles factores implicados los más importantes son:

- Edad del inóculo. Esta es muy importante porque influye en la viabilidad de las células y sobre su actividad metabólica, afectando tanto a la velocidad de fermentación como al rendimiento de esta.
- Concentración inicial de células. El incremento de esta variable mejora tanto la velocidad de obtención como la concentración final de xilitol.
- pH de operación. El valor óptimo de pH a emplear en fermentación depende de la levadura empleada. Los valores más comunes oscilan entre 4 y 6 aunque hay levaduras cuyo valor óptimo es de 8.
- Temperatura de trabajo. El rango de temperatura en el que las levaduras tienen actividad para producir xilitol oscila entre 20 y 45 °C, aunque los valores óptimos coinciden con el rango de 28 a 30 °C.
- Composición del medio de cultivo. En fermentación influye tanto la composición del medio de cultivo como el origen de los azúcares a fermentar, la salinidad del medio y la naturaleza y concentración de la fuente de nitrógeno.
- Concentración inicial de sustrato. Incrementos de la concentración de D-xilosa en el medio suele originar un descenso en las velocidades de crecimiento excepto si se incrementa el nivel de aireación. En cambio, si se considera la productividad de xilitol esta es mayor a mayor concentración de D-xilosa. La levadura *P. tannophilus* es capaz de producir xilitol a concentraciones de D-xilosa superiores a 10 kg/m³, sin embargo para concentraciones inferiores y sobre todo en cultivos discontinuos se favorece la obtención de etanol sobre la de xilitol.

- Oxígeno disuelto. La concentración de oxígeno es una variable dependiente de la concentración inicial de azúcares empleada. La aireación debe incrementarse con los azúcares iniciales.
- Adición de D-glucosa al medio. La D-glucosa, fuente adicional de carbono, reduce el consumo de D-xilosa y la producción de xilitol debido a la formación de otros bioproductos como glicerol y robitol. La mezcla con otras hexosas muestra un comportamiento similar, metabolizándose en último lugar siempre D-xilosa. El consumo de esta pentosa siempre se inicia una vez que se han consumido parcialmente las hexosas, hecho que parece indicar un cierto valor de concentración de hexosa por encima del cual inhibe el metabolismo de D-xilosa.
- Influencia del xilitol. La única causa de inhibición que presenta el xilitol es su lentitud en el transporte a través de la membrana celular, en cambio, aunque algunos autores indican cierta inhibición a altas concentraciones otros, por el contrario, mantienen que a estos valores puede ser usado por las células como fuente de carbono.

II.6.2 Obtención de xilitol a partir de hidrolizados lignocelulósicos

Tras hidrólisis ácida en condiciones suaves se obtiene, fundamentalmente, una disolución azucarada donde D-xilosa es el componente mayoritario y donde además existen D-glucosa, arabinosa y otras pentosas y hexosas minoritarias. Existen otros componentes, en baja concentración, procedentes de una pequeña fracción de lignina que se solubiliza. El problema que presentan estos componentes ligninolíticos es que todos son, en mayor o menor grado, inhibidores de la fermentación.

Un incremento de la concentración de D-xilosa mejora tanto la productividad como el rendimiento de la fermentación por lo que se aconseja concentrar los hidrolizados obtenidos a partir de los residuos, aunque como indican Parajó *et al.* (1998c), concentrar la D-xilosa por evaporación también incrementa la concentración de los componentes no volátiles y con ello el efecto inhibidor que puedan tener.

TABLA II.19
PRODUCCIÓN DE XILITOL DE HIDROLIZADOS LIGNOCELULÓSICOS

Levadura	Condiciones de fermentación	Residuo	Tratamiento al hidrolizado	t, h	S ₀ , kg/m ³	Q _s , kg/m ³ /h	% consumo de sustrato	X _i , kg/m ³	Q _{Xi} , kg/m ³ /h	Y _{Xi/s} , kg/kg	Referencia
<i>Candida</i> sp. B22 ^e	30°C, v/V = 20/50, 160 rpm	Bagazo de caña de azúcar		96	105,3	1,11	100	94,7	0,99	0,90	Cheng y Gong (1985)
<i>P. lamphiphilus</i> CBS 4044	30°C	Licores sulfito ^e		48	45	0,65	68,9	10,9	0,23	0,36	Linden y Hahn-Hädergal (1989)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	30°C, v/V = 50/125, 200 rpm	Bagazo de caña de azúcar	Ca(OH) ₂ neutralización	130	65	0,48	95	30	0,23	0,48	Roberto <i>et al.</i> (1991a)
			CaO neutralización	130	65	0,47	98	22	0,17	0,36	
			KOH neutralización	130	64	0,29	56	18	0,14	0,48	
<i>Pichia stipitis</i> Y-7124	30°C, v/V = 1/2,5, 150 rpm	Madera de eucalipto	Hidrolizado no tratado	141	36,1	0,25	99	1,4	0,01	0,04	Ferrari <i>et al.</i> (1992)
			Intercambio iónico	69	35,1	0,50	99	2,4	0,04	0,07	
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	30°C, v/V = 50/125, 200 rpm pH ₀ = 5,3	Bagazo de caña de azúcar		55	54,5	0,91	91	35	0,64	0,70	Roberto <i>et al.</i> (1995a)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	30°C, v/V = 50/125, 200 rpm	Paja de arroz		72	64	0,59	-	23	0,32	0,54	Roberto <i>et al.</i> (1996b)
<i>C. entomaea</i> NRRL Y-7785	34°C, pH ₀ = 5,6, 200 rpm	Fibra de maíz		39	6,5	0,056	33,9	0,65 ^a	0,02	0,30	Saha y Bothast (1996)
<i>C. guilliermondii</i> NRRL Y-2075	34°C, pH ₀ = 4,6, 200 rpm	Fibra de maíz		24	6,2	0,079	30,7	0,62 ^a	0,026	0,33	Saha y Bothast (1996)
<i>C. tropicalis</i> IZ 1824	30°C, v/V=500/100 400 rpm, pH ₀ = 6,2 vvm	Bagazo de caña de azúcar		-	-	0,65	-	-	0,20	0,3	Pessoa <i>et al.</i> (1996)
<i>D.hansenii</i> NRRL Y-7426	30°C, pH ₀ = 5,5, v/V=0,5/1 100 rpm	Madera de eucalipto		200	24	0,08	66,7	11,5	0,053	0,63	Parajó <i>et al.</i> (1996c)
<i>D.hansenii</i> NRRL Y-7426	30°C, pH ₀ = 5,5, v/V=10/50 200 rpm, x ₀ = 80 kg/m ³	Madera de eucalipto	Carbon activo	34	58	1,56	92	39	1,06	0,68	Parajó <i>et al.</i> (1996d)
<i>Debaromyces hansenii</i> NRRL Y-7426	30°C, v/V = 20/50, 200 rpm x ₀ = 52,9 kg/m ³	Madera de eucalipto	OV ^b + extracción con éter etilico	24	52,9	1,58	71,6	29	1,11	0,70	Parajó <i>et al.</i> (1997)
<i>Canadida</i> sp. 11-2	32°C, v/V = 10/50, 200 rpm	Madera dura	(pret. NH ₄ OH)	5	50	7,27	72	33,6	5,38	0,74	Dominguez <i>et al.</i> (1997)

^a Obtenido como un bioproducto; ^b levaduras adaptadas; ^c azúcares tratados con xilosa-isomerasa; ^d OV= overliming; ^e fermentación con adición de diferentes nutrientes

Nomenclatura: S, concentración de sustrato; inicial; Q, v, velocidad volumétrica de consumo de sustrato; X_i, concentración de xilitol; Q_{Xi}, velocidad volumétrica de producción de xilitol; Y_{Xi/s}, rendimiento en producto v/V = (volumen de medio/volumen del sistema).

II.7 OBTENCIÓN DE ETANOL

El etanol puede obtenerse por síntesis a partir del etileno, por fermentación de los azúcares con levaduras y a partir de carbohidratos de alto peso molecular, tales como hemicelulosa, celulosa y almidón; los cuales mediante una hidrólisis previa liberan azúcares fermentables.

II.7.1 Producción de etanol por fermentación

Los azúcares se pueden encontrar como monosacáridos en disolución o como polisacáridos en forma sólida. Los primeros son directamente fermentables por las levaduras mientras los segundos deben liberarse previamente de la estructura cristalina para que puedan ser fermentados.

En la Tabla II.20 se indican las principales fuentes de las que puede obtenerse etanol por fermentación aunque por su naturaleza y bajo coste son susceptibles de ser sustituidas por otras de características similares pero más abundantes en las zonas donde se vaya a realizar el proceso.

TABLA II.20
OBTENCIÓN DE ETANOL POR FERMENTACIÓN

Principales fuentes de:		
Azúcares	Almidón	Hemicelulosa y celulosa
Caña de azúcar	Cereales	Madera
Remolacha azucarera	Patatas	Residuos agrícolas
Melaza de frutas	Verduras	Residuos sólidos urbanos
	Hortalizas	Residuos de Papel

El primer desarrollo comercial para la producción de etanol a partir de la madera se realizó en Estados Unidos en 1910 y se logró producir entre 0,065 y 0,085 g etanol/g madera, que representan entre el 20,3% y 26,6% del máximo obtenible a partir de una madera media de composición 21% en hemicelulosa y 42% en celulosa y supuesto que se produce la conversión total en azúcares y estos se fermentan a etanol con una conversión teórica de 0,51 g de etanol por g de D-glucosa (Taherzadeh, 2003).

Considerando que la producción de etanol en el año 1998 fue de unos 33.300 millones de litros, de los cuales el 68% se emplearon como combustible, el 21% para uso industrial y el resto para bebida, y que sólo el 9% se obtuvieron por medios sintéticos se deduce claramente la importancia que la fermentación tiene como proceso mediante el cual obtener etanol a partir de las diferentes fuentes de azúcares. Continuando en el mismo año, en la Figura II.22 se muestra la producción de etanol en los distintos continentes, y si se considera esta por países Brasil es el país que mayoritariamente lo produce con casi la mitad del total.

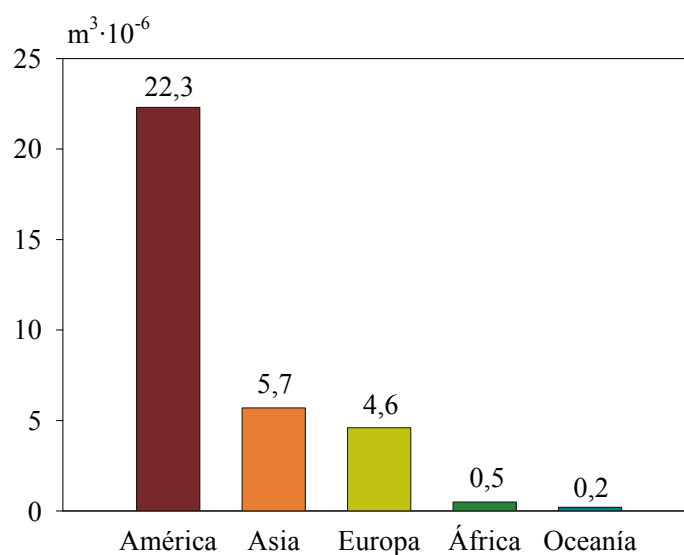


Fig. II.22 Producción de etanol en el mundo

La obtención de etanol por fermentación de mezclas de azúcares es un proceso muy estudiado. El mecanismo de obtención es distinto según se haga a partir de hexosas o de pentosas, y no todas las levaduras son capaces de fermentar ambos tipos de azúcares. Así, hay levaduras que sólo fermentan hexosas y otras que son capaces de hacerlo con ambos tipos, pero se están modificando genéticamente para que las muy activas con las hexosas también lo sean con las pentosas. La obtención de etanol, o su mezcla con xilitol, a partir de residuos lignocelulósicos presenta un futuro muy prometedor.

Si a los residuos lignocelulósicos se les realiza una hidrólisis, ácida o enzimática, suave sólo se hidroliza la hemicelulosa permaneciendo intacta la celulosa, por lo que todos los azúcares que se obtienen lo son de la primera fracción, siendo el azúcar mayoritario la D-xilosa. Por este motivo es muy importante desarrollar microorganismos y procesos que sean

capaces de fermentar esta pentosa, ya sea para obtener xilitol o etanol, dado que ello tendría un marcado efecto sobre los costes totales del proceso de fermentación y con ello sobre la obtención de xilitol o etanol a partir de residuos lignocelulósicos.

Las levaduras son unos de los microorganismos usados para realizar la fermentación de los hidrolizados. Son hongos unicelulares, muy abundantes en la naturaleza y con muy diversas formas, que pertenecen al reino de los hongos ('Fungi') y, dentro de él, están enmarcadas entre los hongos verdaderos o en la división Amastigomycota. En ésta, las levaduras se incluyen en la subdivisión de los Ascomycotina y su mayor parte pertenece a la clase de los Ascomicetos.

La formación y mantenimiento de los sistemas estructurales altamente organizados de las levaduras dependen de una compleja red integrada de reacciones bioquímicas que en su conjunto constituyen el metabolismo. La función de este es extraer la energía y el poder reductor del medio que rodea a la levadura y usarlos para sintetizar los constituyentes macromoleculares de su estructura. La energía, que durante el metabolismo es transferida y almacenada dentro de la molécula de ATP, es necesaria para las reacciones bioquímicas de síntesis. El poder reductor, generado durante el metabolismo por acoplamiento de la reducción de las coenzimas con reacciones de oxidación, es necesario para la conversión de las formas oxidadas del carbono, CO₂ por ejemplo, a sus estados de oxidación reducida que es como se encuentran en las macromoléculas de la levadura.

Las levaduras son organismos anaerobios facultativos, pueden vivir en un medio anaerobio o aerobio, que utilizan el oxígeno para la respiración y obtención de ATP y que son capaces de oxidar la D-glucosa, en ausencia de oxígeno, mediante la fermentación y con ella obtienen ATP. El crecimiento de las levaduras en aerobiosis es muy alto; se consigue aproximadamente un 1 gramo de levaduras por cada 4 gramos de azúcares consumidos. Conforme el oxígeno empieza a escasear las levaduras no tienen capacidad de desdoblar los azúcares de forma completa y es el momento en que la glucólisis comienza, generándose etanol, CO₂ y energía. Bajo condiciones de falta de oxígeno (anaerobiosis) la creación de biomasa es muy limitada, llegando a ser necesarios más de 100 gramos de azúcares para crear un gramo de levaduras. La producción de alcohol y las carencias prolongadas de oxígeno y azúcares ocasiona la muerte de las propias levaduras, que variará en función de la(s) cepa(s) dominante(s) y sus características de tolerancia. Por este motivo, en un proceso de fermentación, inicialmente se necesita oxígeno para que las levaduras se multipliquen pero posteriormente debe restringirse para que aparezca la glucólisis. De hecho, una carencia

brusca de oxígeno al comienzo del proceso es una de las causas más comunes de paradas no deseadas de la fermentación.

El proceso fermentativo está totalmente ligado a la densidad de población de las levaduras. En este se aprecian una serie de etapas:

- a - Una primera fase de adaptación en la que los microorganismos se aclimatan al medio de cultivo.
- b.- Una segunda fase de crecimiento exponencial en la que el crecimiento es muy rápido y se desprende mucho CO₂.
- c.- Al final de la fase anterior la multiplicación de las células comienza a ser cada vez menor y aumenta la mortalidad, por lo que se alcanza la tercera fase en la que el crecimiento es nulo.
- d.- Y, finalmente, la mortalidad comienza a ser mayor que la multiplicación por lo que el proceso de fermentación está concluyendo.

Inicialmente, con el medio más favorable para el crecimiento, las levaduras se multiplican por vía vegetativa (asexual) o mitosis, mientras que al final de la fermentación comienzan a reproducirse sexualmente por meiosis, lo que indica un medio de vida muy desfavorable por falta de sustratos (Collado, 2003).

II.7.1.1 Glucólisis

La glucólisis es el proceso químico mediante el cual una molécula de D-glucosa se transforma en dos moléculas de ácido pirúvico y se producen dos moléculas de ATP netos. En realidad, durante la glucólisis no se degrada D-glucosa pura, sino un derivado fosforilado llamado glucosa 6-fosfato. Este es el paso clave para que otros azúcares entren al proceso de glucólisis, siempre y cuando se fosforilen previamente.

El paso previo mediante el cual todos los azúcares son potenciales sustratos para la fermentación es su conversión en glucosa 6-fosfato y ya dentro del proceso de glucólisis sufre una serie de transformaciones enzimáticas sucesivas hasta que se obtienen, en una primera etapa, dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato con un consumo de 2 moléculas de ATP, Figura II.23.

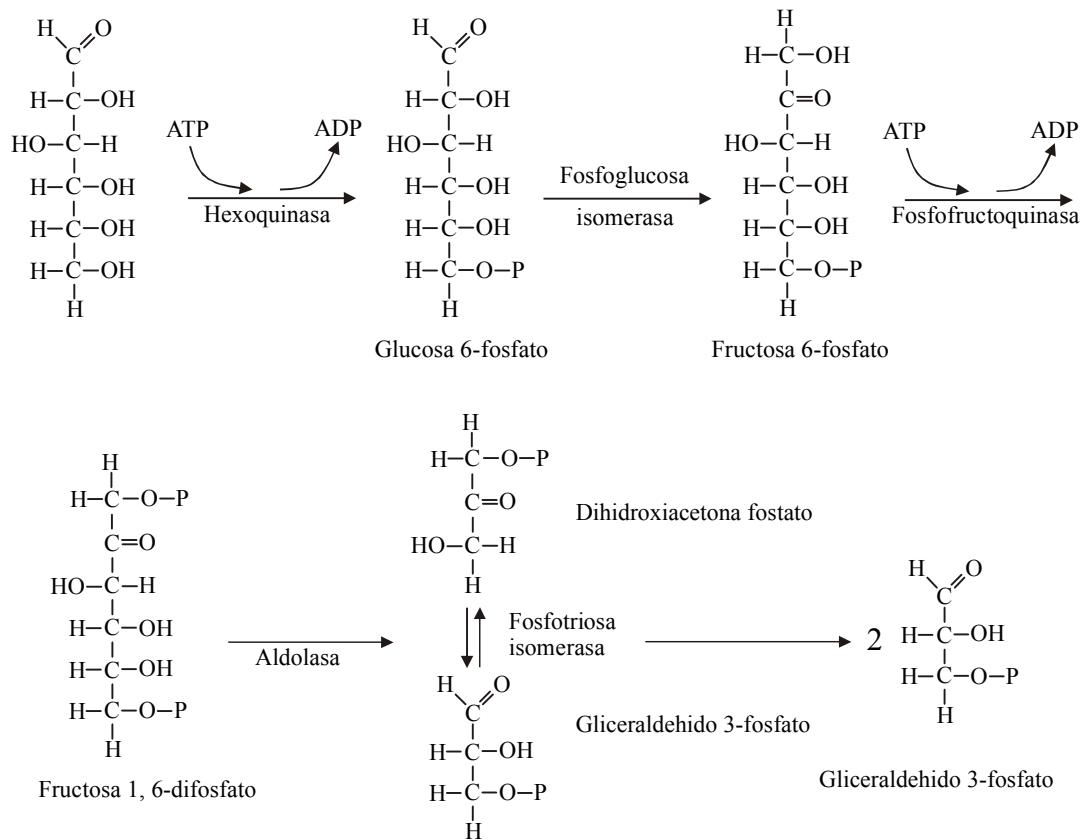


Fig. II.23 Proceso de la glucólisis: a)

Y, en una segunda etapa, las dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato se transforman en dos de ácido pirúvico y liberan 4 moléculas de ATP, Figura II.24.

La glucólisis es la principal fuente de energía de los microorganismos anaerobios o de aquellos que se encuentran en un medio con falta de oxígeno. En este medio el ácido pirúvico continúa descomponiéndose hasta etanol. A todo el proceso metabólico en ausencia de oxígeno se denomina fermentación alcohólica, en este proceso el ácido pirúvico es descarboxilado y transformado en acetaldehído que posteriormente se reduce a etanol, Figura II.25.

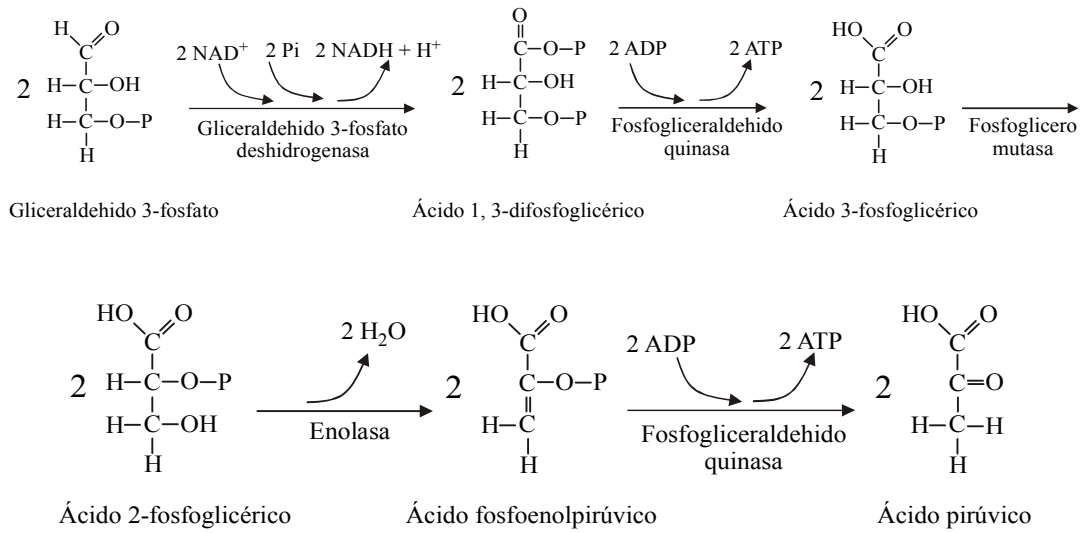


Fig. II.24 Proceso de la glucólisis: b)

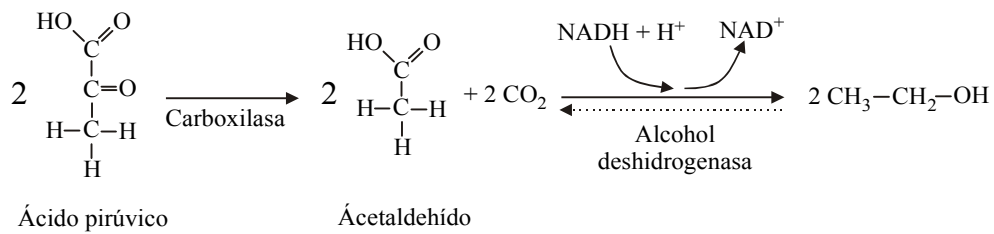


Fig. II.25 Proceso de la glucólisis: c)

Si en el medio hay presencia de oxígeno el ácido pirúvico sigue la ruta de respiración aerobia y en este caso por cada glucosa consumida se obtienen 36 moléculas de ATP netas.

II.7.1.2 Obtención de etanol a partir de D-xilosa

El alto potencial económico del etanol, para ser usado como combustible o como materia prima de otras industrias, hace necesario que se investigue en la forma más económica de obtenerlo. Por otra parte, si se considera que los residuos lignocelulósicos son una fuente potencial de azúcares, pentosas y hexosas, y que por fermentación de estos azúcares mediante microorganismos se puede obtener etanol, se incentiva la investigación por el doble motivo de que se eliminan residuos y además se obtiene un producto de alto valor añadido.

La mayoría de las levaduras son capaces de obtener etanol, mediante la glucólisis, a partir de hexosas, aunque las velocidades de obtención y las condiciones de operación son distintas para cada una. Considerando únicamente este camino, *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura que mayor tolerancia presenta al etanol y además, bajo condiciones anaerobias, es la que mayor velocidad de crecimiento presenta; pero es incapaz de fermentar las pentosas, como la D-xilosa que es el azúcar mayoritario en los residuos. Para la conversión de D-xilosa a etanol existen otras levaduras, pero en cualquier caso la que es capaz de asimilar el azúcar no lo fermenta y la que sí fermenta lo hace muy lentamente.

Según Aristidou y Penttilä (2000), las levaduras *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* y *Pachysolen tannophilus* son las que presentan un futuro más prometedor para fermentar pentosas. Kuyper *et al.* (2003) proponen modificar genéticamente *S. cerevisiae* con el gen, procedente de bacterias, que permite obtener el enzima xilosa isomerasa. Así, en ambas referencias, se indica que el metabolismo de la D-xilosa por las bacterias se inicia con la isomerización a D-xilulosa mediante el enzima xilosa isomerasa (EC 5.3.1.5); por otra parte, las levaduras emplean un camino de dos etapas con el empleo de las enzimas xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, Figura II.26.

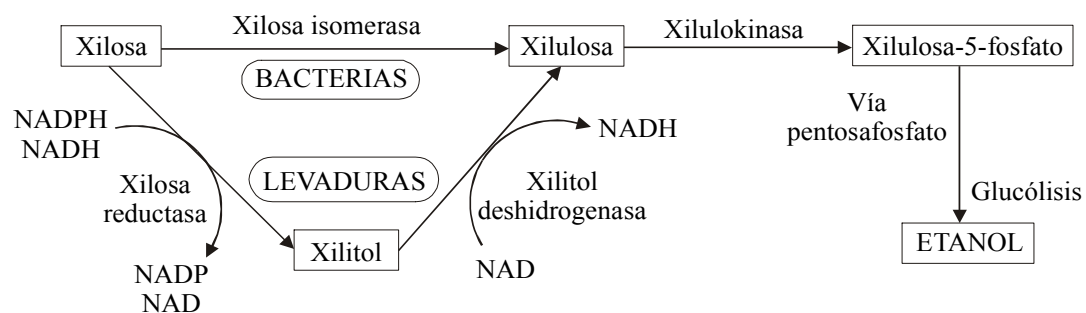


Fig. II.26 Metabolismo de la D-xilosa

Mediante la vía de la pentosafosfato pueden interconvertirse las pentosas y las hexosas y permite la síntesis de hexosas por microorganismos que crecen sobre pentosas. La vía de la pentosafosfato se inicia con la xilulosa-5-fosfato y mediante las enzimas transcetolasa y transaldolasa se obtiene gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato que pueden ser metabolizados por vía glucolítica, Figuras II.23 a II.25.

Lee (1997) tras estudios de cultivos de las levaduras *Candida tropicalis*, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae* y el cocultivo de *P. tannophilus* y *S. cerevisiae*, en presencia del enzima xilosa isomerasa, para fermentar xilosa concluye que aunque el empleo de este enzima mejora algo la obtención de etanol a partir de xilosa es necesario un enzima adicional, xilulokinasa, con el cual sí se consiguen resultados importantes. En la Tabla II.21 se muestran algunas levaduras capaces de fermentar la D-xilosa a etanol.

TABLA II.21
EJEMPLOS DE CULTIVOS DE LEVADURAS QUE UTILIZAN D-XILOSA

Microorganismos	Comentario	Referencias
<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124, Y-11 544, Y-11 545	Cepa NRRL Y-7124 utilizando xilosa al 95% y con $s_0=150$ g/L. Produce 52 kg/m ³ de etanol con un rendimiento de 0,39 kg etanol/kg D-xilosa.	Slininger <i>et al.</i> , 1985
<i>Klebsiella planticola</i> ATCC 33531	Genes de <i>Zymomonas mobilis</i>	Tolan y Finn, 1987
<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124	Máxima concentración celular de 50 kg/m ³ . $Q_E=10,7$ kg/(m ³ h) con una conversión de xilosa superior al 80%. Rendimiento de etanol y xilitol de 0,4 y 0,03 kg/kg D-xilosa.	Delgenes <i>et al.</i> , 1988
<i>Zymomonas mobilis</i>	Máxima concentración de etanol de 24,1 kg/m ³ con cepas de <i>P. tannophilus</i> usando 200 kg/m ³ de D-xilosa.	Beck <i>et al.</i> , 1990
<i>Pachysolen tannophilus</i> y <i>Sacharomyces cerevisiae</i> ATCC 24860	Co-cultivos de ambas levaduras que resultan en el mejor rendimiento en etanol.	
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> CBS 1200 y <i>Candida shehatae</i> ATCC 24 860	Co-cultivos de ambas cepas de levaduras utilizando D-glucosa y D-xilosa. Rendimientos de 100 y 27% en D-glucosa y D-xilosa, respectivamente.	Laplace <i>et al.</i> , 1993

Respecto de la inhibición del crecimiento y fermentación, por causa del etanol del medio, Lee (1997) indica que las levaduras son más tolerantes a menor temperatura y que el

etanol por ellas generado parece ofrecer más inhibición que el adicionado al medio, lo que justifica bajo la hipótesis de que parte del etanol formado se acumula en el interior de la célula. También indica que, en cultivos de *P. tannophilus* y de *C. shehatae*, el etanol en concentraciones inferiores a 18 kg/m³ parece ser que no ejerce efecto inhibidor.

Para los nutrientes, indica que una limitación de biotina limita también el crecimiento celular y la utilización de D-xilosa, pero valores altos favorece la obtención de etanol con *P. tannophilus* y la de xilitol con *C. guilliermondii*. Si se añade extracto de malta más peptona a un cultivo con *Pichia stipitis* se incrementa la obtención de xilitol.

El oxígeno disuelto en el medio, para la fermentación de D-xilosa, parece tener el mismo efecto que sobre la glucosa. Bajo condiciones aerobias no se obtiene etanol de la D-xilosa y sí lo hace cuando se limita el oxígeno. En la Tabla II.22 se muestran algunos ejemplos de la influencia del oxígeno en la obtención de etanol a partir de xilosa, (Lee, 1997).

TABLA II.22
INFLUENCIA DEL OXÍGENO EN LA PRODUCCIÓN
DE ETANOL A PARTIR DE D-XILOSA

Microorganismo	Condiciones y resultados significativos	Referencias
Especies de <i>Candida</i> (XF217)	Aumenta el rendimiento en etanol al descender los niveles de oxígeno. Las concentraciones de etanol disminuyen a los niveles más bajos de oxígeno debido a las bajas concentraciones de catalizador. Las concentraciones de xilitol están afectadas por el oxígeno aportado.	Baillargeon <i>et al.</i> , 1983
<i>Pachysolen tannophilus</i> (RL171)	Al aumentar la agitación de 300 a 400 rpm descende la producción de etanol. Bajas concentraciones de xilitol con bajos niveles de D-xilosa. Concentración máxima de etanol de 26,5 kg/m ³ con un rendimiento de 0,41 kg etanol/kg D- xilosa.	Woods y Millis, 1985
<i>Pichia stipitis</i> (CSIR-Y633)	La concentración de etanol aumenta desde 3,3 mMol a 23,7 mMol al disminuir la velocidad de transferencia de oxígeno desde 411 mMol/(L h) a 2 mMol/(L h) .	
<i>Pichia stipitis</i>	El rendimiento en etanol es de 0,48 kg /kg D- xilosa. Velocidad de transferencia de oxígeno inferior a 1 mMol/(L h). La concentración de etanol aumenta desde 3,4 mMol a 23,7 m Mol al disminuir la velocidad de transferencia de oxígeno desde 411 mMol/(L h) a 2 mMol/(L h) .	Skoog y Hahn- Hädergal, 1990
<i>Candida shehatae</i> (ATCC 22 984)	Utilización incompleta de D-xilosa bajo condiciones anaerobias. El bajo consumo de glucosa aumenta la velocidad de consumo de D-xilosa de forma significativa.	Sreenath <i>et al.</i> , 1986

TABLA II.22
INFLUENCIA DEL OXÍGENO EN LA PRODUCCIÓN
DE ETANOL A PARTIR DE D-XILOSA

Microorganismo	Condiciones y resultados significativos	Referencias
<i>Candida shehatae</i> (ATCC 22 984)	Se opera con dos reactores. En el primero, con limitación de oxígeno, se produce casi exclusivamente biomasa. En el segundo reactor, no aireado, se produce muy poca biomasa y prácticamente todo el etanol.	Alexander <i>et al.</i> , 1988

II.7.1.3 Influencia de las condiciones de operación

A) Temperatura

Las levaduras son microorganismos mesófilos, por lo que pueden desarrollar la labor fermentativa entre las temperaturas de 15 y 35 °C aproximadamente. En este rango, a mayor temperatura mayor será la velocidad del proceso pero también las levaduras se agotan antes, en cambio, a menores temperaturas el contenido alcohólico alcanzable es mayor. Por encima de los 33-35 °C se suele producir una parada fermentativa y se incrementa el riesgo de contaminación bacteriana.

B) Aireación

Las levaduras requieren una cierta aireación. Así, una velocidad específica de suministro de oxígeno excesiva (condiciones aerobias) origina que consuman los azúcares por vía oxidativa y contribuyan sólo al crecimiento celular; por contra, si la aireación se restringe (condiciones próximas a las anaerobias) los azúcares se consumen por vía fermentativa obteniéndose etanol como producto final.

C) pH

Aunque las levaduras normalmente se emplean en medios con pH entre 2,5 y 5,5, su viabilidad es tanto mayor cuanto mayor es el pH; sin embargo, al aumentar este el riesgo de contaminación bacteriana también se incrementa. En cultivos con pH bajos las velocidades específicas de consumo de sustrato, formación de biomasa y bioproductos son pequeñas.

D) Nutrientes y activadores

Las levaduras necesitan los azúcares para su catabolismo (obtener energía) pero también necesitan otros sustratos para su anabolismo (nitrógeno, fósforo, carbono, azufre, potasio, magnesio, calcio y vitaminas).

E) Inhibidores y concentración inicial de azúcares

Los primeros, como su nombre indica, reducen el rendimiento del proceso y por ello deben eliminarse o minimizarse. Respecto de los azúcares en la disolución inicial, si la concentración es alta se originarán fenómenos de ósmosis con los fluidos corporales, para igualar las concentraciones, y pueden llegar a producirse estallidos celulares y consecuentemente la muerte celular.

II.7.2 Obtención de etanol mediante hidrólisis y fermentación simultáneas

Este proceso también es llamado sacarificación y fermentación simultáneas y se reconoce por las siglas SSF. La obtención de etanol a partir de los residuos lignocelulósicos puede realizarse mediante sacarificación y fermentación secuenciales (SHF) o bien por SSF y cada uno de estos procesos tiene ventajas e inconvenientes.

La principal ventaja de SHF es la posibilidad de realizar cada etapa en las condiciones óptimas, o sea, hidrólisis enzimática entre 45 y 50 °C y fermentación alrededor de 30 °C (Galbe y Zacchi, 2002); además permite realizar la fermentación de forma continua mediante el reciclado de las células. El principal inconveniente es la posible inhibición de los enzimas por los azúcares que se van obteniendo en la hidrólisis.

Comparando ambos procesos, la sacarificación y fermentación simultáneas tiene las siguientes ventajas (Sun y Cheng, 2002):

- Incrementa la velocidad de hidrólisis por conversión de los azúcares que inhiben la acción de las celulasas
- Se requiere menos cantidad de enzimas
- Se obtiene un alto rendimiento en etanol
- Las condiciones de esterilidad no son tan estrictas dado que la glucosa es eliminada para obtener etanol
- Los tiempos de proceso son más cortos
- Al emplearse un solo reactor, el volumen de aparatos es menor.

Por otra parte, el proceso SSF presenta los inconvenientes siguientes:

- El etanol puede inhibir los enzimas utilizados para hidrólisis
- Aunque se intente buscar una temperatura óptima de operación esta no es la óptima para la hidrólisis y fermentación por separado
- Los microorganismos no toleran concentraciones altas de etanol.

Normalmente, la hidrólisis es la etapa limitante en el proceso SSF, por ello, se están estudiando microorganismos termotolerantes que permitan incrementar la temperatura del proceso y con ello mejorar la velocidad de hidrólisis. Así, *Kluyveromyces marxianus* and *K. fragilis* presentan una elevada producción de etanol a 42 °C y *Candida acidothermophilum* a 40 °C. En cualquier caso, las cepas de *Kluyveromyces* son más termotolerantes que las de *Candida* y *Saccharomyces*

Los procesos SHF y SSF, cuando se emplean para maderas duras, no suelen presentar ventajas entre ellos ya que ambos son normalmente rápidos y con elevada producción de etanol; en cambio, para maderas blandas sí se aconseja la sacarificación y fermentación simultáneas ya que tiene mayor productividad y rendimiento (Galbe y Zacchi, 2002).

Desde el punto de vista económico, para ambos procesos, la etapa de hidrólisis es la menos rentable ya que la obtención de celulasas de elevada actividad es una etapa de elevado coste; por lo que actualmente se está investigando con hongos capaces de producir enzimas de elevada actividad y a bajo coste.

II.8 OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación tiene como objeto el aprovechamiento de un residuo lignocelulósico como es el residuo de poda de olivo. Para este residuo, al igual que para la mayoría de los residuos no se han encontrado aplicaciones tecnológica y económicamente viables. En la mayor parte de los casos, para eliminarlos, se incineran sobre los terrenos de cultivo, con los inconvenientes que esto puede suponer (propagación de plagas, mineralización del suelo, incremento de los riesgos de incendios, desprendimiento inútil de dióxido de carbono,...).

Una vía de aprovechamiento es el fraccionamiento mediante hidrólisis de sus principales componentes: hemicelulosa, celulosa y lignina. El proceso de hidrólisis de las fracciones celulósica y hemicelulósica proporciona una disolución de azúcares fermentables de cuya fermentación pueden obtenerse distintos productos de interés industrial: etanol, xilitol, etc.

En un trabajo anterior, Moya López (1997), se estudió la fermentación de hidrolizados ácidos del residuo de poda de olivo con *Pachysolen tannophilus*. Continuando con dicha investigación se ha estudiado la hidrólisis ácida y enzimática del mismo residuo, fermentando a continuación, con dicha levadura los hidrolizados obtenidos en las condiciones más favorables.

En una primera etapa se va a hidrolizar el residuo de poda, previamente acondicionado, con ácidos de distinta naturaleza, ácido sulfúrico y fosfórico, a diferentes concentraciones. Asimismo se estudiará la influencia de la temperatura sobre el proceso de hidrólisis, en un rango de 60 a 100°C empleando ácido sulfúrico 1 N.

La segunda etapa de esta investigación se destinará al estudio de la hidrólisis enzimática del mismo residuo, empleando celulasas y hemicelulasas de *Trichoderma viride* y *Aspergillus niger*, respectivamente. Las variables que se pretenden estudiar en este tipo de hidrólisis son: tiempo de pretratamiento, diámetro de partícula, relación enzima/sustrato, relación celulasas/hemicelulasas, pH y temperatura

Tanto los experimentos de hidrólisis ácida como enzimática se realizarán en un reactor tipo tanque agitado, y se seguirá el proceso mediante el análisis de las siguientes variables:

- Caracterización del residuo de poda de partida y de los residuos sólidos resultantes del proceso de hidrólisis:
 - contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina, expresado en porcentaje sobre materia seca.
 - contenido en humedad y cenizas
- Caracterización de las muestras de hidrolizado retiradas a lo largo del proceso:
 - concentración en azúcares reductores totales
 - concentración en D-glucosa

Una vez obtenidos y caracterizados los hidrolizados ácidos y enzimáticos se procederá a la fermentación de los mejores experimentos utilizando la levadura no tradicional *P. tannophilus* (ATCC 32691), capaz de fermentar pentosas y hexosas.

A partir de los resultados experimentales se determinan los siguientes parámetros:

- En el proceso de hidrólisis ácida y enzimática, la conversión fraccional referida a la fracción de hemicelulosa, y de celulosa en los casos en que exista degradación de esta última fracción, así como los rendimientos en azúcares reductores totales y D-glucosa.
- En el proceso de fermentación, las velocidades específicas de crecimiento, de consumo de sustrato y de producción de etanol, así como las productividades en biomasa y los rendimientos en biomasa, etanol y xilitol.

Los resultados obtenidos en esta Memoria permitirán establecer las condiciones más favorables para la hidrólisis ácida y enzimática del residuo de poda de olivo y posterior fermentación del hidrolizado, con la levadura empleada, considerando los valores más elevados de la velocidad específica de formación de producto y del rendimiento global en etanol.

III. Materiales y métodos

III.1 INSTALACIONES EXPERIMENTALES

III.1.1 Equipos de hidrólisis

III.1.1.1 Reactor de hidrólisis ácida

Los experimentos de hidrólisis ácida se han realizado en una instalación realizada para tal fin, en las dependencias del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales, en la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén. En la Figura III.1 se muestra un esquema de la instalación, describiéndose a continuación los elementos principales:

1. Baño de aceite, Tectron 200, con termostato, selector de temperatura y bomba de recirculación para la alimentación de la camisa del reactor.
2. a. Reactor de vidrio Pyrex, de volumen útil 1.000 cm³, de geometría cilíndrica y fondo redondo, con un diámetro interno de 10 cm y provisto de una camisa de termostatación por la que circula el aceite calefactor. A este contactor se le ajusta una tapa, del mismo material, provista de cinco bocas.
b. Reactor de vidrio Pyrex, de geometría esférica, con un volumen útil de 5.000 cm³ y un diámetro interno de 21,2 cm; sin camisa de termostatación, la labor de esta es realizada por la inmersión en un baño de aceite. También se le ajusta una tapa con cinco bocas.
3. Refrigerante de reflujo tipo Dimroth encamisado. Permite operar a presión atmosférica al mantener el reactor abierto, impidiendo a su vez pérdidas de vapor por evaporación.
4. Cierre de agitación, Quickfit ST20/4.
5. Varilla de agitación con ánora fija, de teflón (dimensiones: longitud 500 mm, diámetro 75 mm).
6. Agitador, Heidolph mod. RZR-2000, conectado a la varillay provisto de cuentarrevoluciones. Permite mantener una agitación adecuada para obtener condiciones de mezcla perfecta en el reactor.
7. Termómetro de mercurio, con escala de 0 a 150 °C.

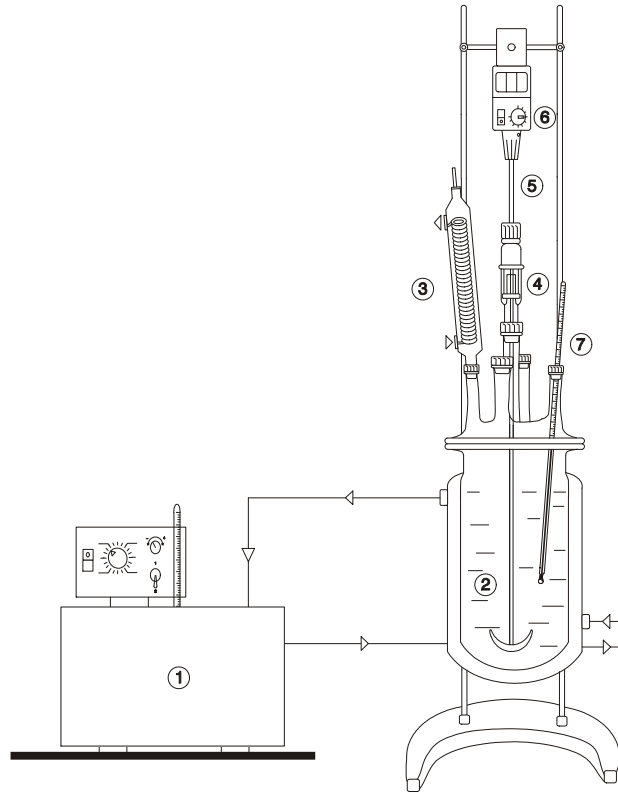


Fig. III.1 Instalación de hidrólisis

III.1.1.2 Reactor de hidrólisis enzimática

Los experimentos de hidrólisis enzimática se realizaron en un montaje similar al empleado para hidrólisis ácida; con el único cambio del reactor utilizado que pasa a tener un volumen útil de 500 cm³ y un diámetro interno de 10 cm.

En una de las bocas de la tapa del reactor se introdujo un electrodo de pH. También hay que indicar que, en este caso, el fluido de calefacción fue agua en lugar de aceite ya que las temperaturas de trabajo no sobrepasaron en ningún caso de 333 K.

III.1.2 Instalación de fermentación

En la Figura III.2 se representa la instalación experimental empleada en fermentación de los hidrolizados, formada básicamente por los siguientes elementos:

1. Vasos de cultivo encamisados, cilíndricos y de fondo plano, con un volumen útil de 2 L y un diámetro interno de 10,5 cm, provistos de una tapa con cuatro bocas.
2. Baño de agua, Selecta mod. Digiterm S-542, con termostato y bomba de recirculación, para mantener constante la temperatura del vaso de cultivo.
3. Equipo de agitación, compuesto por un agitador magnético Heidolph MR2000 y una varilla agitadora cilíndrica de teflón de 40 mm de longitud y 8 mm de diámetro. La velocidad de agitación inicial se ha fijado, para todos los experimentos, en un valor próximo a 750 rpm, reduciéndose dicha velocidad a medida que se va reduciendo el volumen en el vaso de cultivo con el tiempo de fermentación. La absorción del oxígeno necesario se realiza a través de la superficie en contacto con la fase gaseosa (aire), incluido el vórtice formado por la agitación.
4. Cuentarrevoluciones, Heidolph digital 2002.
5. Jeringa estéril y tubos de silicona, para la extracción y manipulación de las muestras.
6. Bomba peristáltica, Millipore modelo XX80202 30, para esterilizar el medio de cultivo, mediante filtros, e introducirlo en los vasos.
7. Portafiltros equipados con un filtro de nitrato de celulosa, de porosidad 0,45 μm , y un prefiltro de lana de vidrio.
8. Medidor de pH, Crison modelo GLP 22.
9. Electrodo combinado sensible a los hidrogeniones, Crison cat. n° 52-02.

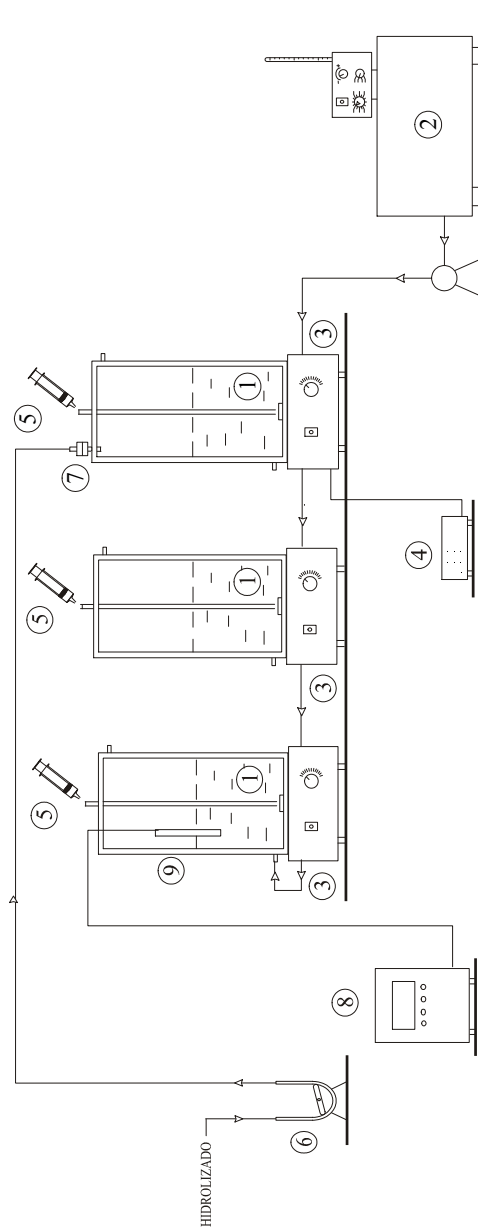


Fig. III.2 Instalación experimental de fermentación

III.2 PROCEDIMIENTO Y DESARROLLO DE LOS EXPERIMENTOS

III.2.1 Características del residuo de poda

Los residuos obtenidos tras la operación de poda están constituidos por troncos de madera, ramas (ó varetas) y hojas. A esta composición también debería añadirse, fundamentalmente en los olivares viejos y dependiendo del tipo de poda que se realice, los grandes bloques de madera, obtenidos del tronco del árbol, que se cortan con el objeto de que el olivo no se haga muy grande y esté constituido fundamentalmente por troncos y tallos jóvenes ya que son los más productivos.

III.2.1.1 Procedencia y recogida

El residuo de poda de olivo se ha recogido cada año en el período correspondiente a esta tarea agrícola (entre los meses de enero y marzo) y procede de una finca ubicada en la comarca de Sierra Mágina. Se ha procurado, al recogerlo, que sea lo más representativo posible de todo el material que se produce en la poda, intentando minimizar las diferencias entre los distintos métodos de poda existentes en cada comarca así como las cantidades de residuo tan dispares que se obtienen por olivo y año. En este sentido, hay que indicar que el residuo de poda recogido está formado por hojas, ramas y trozos de tronco del olivo.

III.2.1.2 Preparación del residuo

A) Molturación

El residuo se tritura, sobre el terreno de recogida, con una trituradora de martillos reduciendo el tamaño inicial y homogeneizando la mezcla hasta un tamaño de 5 cm de largo por 2 cm de diámetro, aproximadamente.

Y finalmente, en una segunda fase, se procede a molturar las astillas en un molino de cuchillas Retsch, tipo SM1, obteniendo un residuo triturado que se clasifica por tamaños mediante tamizado.

B) Tamizado y almacenamiento

Una vez triturado el residuo, se procede a su clasificación por tamaños mediante una tamizadora Retsch, tipo Vibro, con el fin de obtener mezclas de tamaño de partícula uniforme, que facilite el posterior estudio experimental. Los tamices utilizados son los comprendidos entre 25 y 600 μm , según norma ISO 3310-1.

Para los experimentos de hidrólisis ácida se ha aceptado, como más conveniente por su textura, la fracción comprendida entre 425 y 600 μm , es decir, partículas con un diámetro medio (d_p) de 513 μm ; mientras que para los experimentos de hidrólisis enzimática se han estudiado otros tamaños inferiores, partículas con un diámetro medio de 363, 213 y 75 μm , para así estudiar la influencia de la molienda, como tratamiento previo al proceso de hidrólisis.

El residuo, molido y tamizado, se guarda en frascos herméticos y se almacena para su posterior utilización.

III.2.2 Proceso de hidrólisis

III.2.2.1 Hidrólisis ácida

Todos los experimentos de hidrólisis ácida se han llevado a cabo en uno de los dos reactores discontinuos, tipo tanque agitado descritos en el Apartado III.1, analizándose la influencia de las siguientes variables: naturaleza y concentración del ácido, temperatura y tiempo de hidrólisis.

Se ha estudiado la hidrólisis del residuo de poda con los ácidos fosfórico y sulfúrico, y en todos los casos se ha mantenido la proporción residuo/disolución ácida en 1/10 (p/v), la velocidad de agitación en el reactor en 150 rpm y 240 minutos de tiempo de hidrólisis.

Con el equipo completamente operativo, en primer lugar se carga el reactor con la disolución ácida y se inicia la calefacción, una vez alcanzada la temperatura de operación se adiciona, por una de las bocas de la tapa, la materia prima y en ese momento se pone el cronómetro en marcha.

A lo largo del experimento se han ido tomando muestras de forma periódica para su posterior análisis, y una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis se separa el residuo sólido de la disolución ácida que contiene los azúcares disueltos (hidrolizado), mediante filtración.

El residuo sólido se lava con agua destilada, para así arrastrar el posible ácido que pudiera haber quedado adherido a las partículas de aquel, a continuación se extiende sobre una superficie plana y una vez seco se pesa y caracteriza.

Por otro lado, el hidrolizado se enfría en hielo hasta temperatura ambiente y se guarda en frigorífico. Posteriormente, se someterá a las etapas de acondicionamiento previas al proceso de fermentación.

III.2.2.2 Hidrólisis enzimática

En los experimentos de hidrólisis enzimática se han empleado hemicelulasas y celulasas procedentes de *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride* respectivamente, manteniendo siempre la relación sólido/líquido en 1/10 (p/v) y una velocidad de agitación de 150 rpm.

Previo a la hidrólisis enzimática se ha realizado, para todos los experimentos, un pretratamiento con vapor a la presión relativa de 196,32 kPa, oscilando la temperatura del autoclave entre 398 y 403 K. En un frasco hermético, de vidrio Pyrex, se introduce el residuo de poda junto con una porción medida del agua empleada para preparar la disolución tampón de hidrólisis. La relación empleada en el pretratamiento con vapor ha sido 1/5 (p/v) para el residuo de poda y agua, respectivamente.

Terminado el pretratamiento el residuo se deja enfriar y se carga en el reactor, posteriormente se le añaden las enzimas disueltas en el volumen restante de disolución tampón. A continuación se pone en funcionamiento el baño calefactor, se introduce el electrodo y se ajusta el pH al valor establecido para cada experimento, se espera hasta alcanzar la temperatura de hidrólisis y en ese momento se comienza a contar el tiempo de reacción.

Los tampones empleados en los primeros experimentos han sido ácido acético/acetato sódico y ácido cítrico/citrato sódico, si bien en posteriores hidrólisis se obvió el empleo de los mismos al observar que la disolución obtenida tras la mezcla de la madera y el agua tenía

cierto carácter tampón lo cual hacía que el pH permaneciera prácticamente constante a lo largo de todo el experimento. De esta forma se evitan los problemas que plantea el tampón en la fermentación y en el análisis de los azúcares. El ácido acético inhibe la formación de biomasa (Millati *et al.*, 2002) y el citrato interfiere en cierta medida en el método de análisis de los azúcares reductores (Miller, 1959).

Al objeto de poder estudiar la cinética de la hidrólisis enzimática se toman muestras de la mezcla de reacción a distintos tiempos (0, 6, 20, 24, 30, 44 y 48 horas). Una vez extraída la muestra debe detenerse la reacción enzimática y para ello se desnaturaliza el enzima mediante la inmersión del tubo de ensayo, que la contiene, en agua hirviendo durante cinco minutos. A continuación, las muestras se centrifugan para separar las porciones de residuo presentes y se guardan para su posterior análisis.

Transcurrido el tiempo total de hidrólisis se separa el residuo y el hidrolizado mediante filtración. Cuando se trabaja con el tamaño de partícula más pequeño se presentan problemas en la filtración y por ello en estos casos la separación sólido-líquido se hace por centrifugación (3.000 rpm, 15 min) en tubos de 50 mL.

El residuo sólido presente en el filtro se lava para recoger todo el hidrolizado que pueda quedar retenido en las partículas; a continuación se extiende en una superficie plana para su secado a temperatura ambiente. Una vez seco se pesa y se realiza su caracterización.

III.2.3 Acondicionamiento de hidrolizados

Previo al proceso de fermentación, los hidrolizados deben ser sometidos a una serie de operaciones para que puedan ser fermentados con la levadura *Pachysolen tannophilus*.

III.2.3.1 Ajuste del pH

Una vez separados residuo e hidrolizado se procede a la neutralización parcial de éste último. Para hidrolizados obtenidos por hidrólisis ácida, el pH es muy bajo e inapropiado para el desarrollo de los microorganismos, por ello es necesario ajustarlo hasta un valor próximo a 3,5, pH al que se va a fermentar, empleando $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y MgO , en forma de lechada, como agentes neutralizantes.

En el caso de hidrolizados procedentes de un proceso enzimático, con un pH próximo a 4,8, simplemente se ajusta con HCl hasta 4,5. Este pH es adecuado para este tipo de hidrolizados, por ser el óptimo para el crecimiento de *Pachysolen tannophilus* cuando el objetivo es producción de etanol (Bravo *et al.*, 1993).

En relación con los hidrolizados ácidos se ha seleccionado un pH de 3,5 debido al hecho de que no existen diferencias acusadas de los rendimientos en etanol obtenidos con azúcares puros en bioprocesos realizados a este pH en comparación con los llevados a cabo a pH 4,5, y considerando que para el ajuste del pH del hidrolizado el consumo de base es menor.

III.2.3.2 Concentración

En algunos casos el contenido en azúcares del hidrolizado es relativamente bajo para llevar a cabo la fermentación en buenas condiciones. En otras ocasiones, aunque sí se parte de una buena concentración de azúcares, el proceso de concentración permite eliminar o reducir la concentración de algunos compuestos volátiles inhibidores para el crecimiento de las levaduras que pueden haberse formado durante la hidrólisis, como el ácido acético (Wilson *et al.*, 1989; Lindén y Hahn-Hägerdal, 1989).

La operación de concentración se realiza mediante evaporación a vacío en un rotavapor Resona Technics, mod. laborota C-311, a temperaturas inferiores a 328 K para evitar la posible caramelización de azúcares. Se concentra hasta unos 500 cm³ y después se diluye a un volumen cercano a los 650 cm³.

III.2.3.3 Centrifugación

Durante la neutralización de los hidrolizados ácidos se produce un precipitado importante que se retira mediante centrifugación en frío a 3000 rpm, en centrífuga vertical Selecta, modelo Mixtasel, de manera que quede un hidrolizado lo más limpio posible.

III.2.3.4 Esterilización

A los hidrolizados, tanto ácidos como enzimáticos, ya acondicionados, se les disuelven los nutrientes descritos en el Apartado III.2.4.3; posteriormente, se esterilizan empleando membranas de nitrato de celulosa de 0,45 μm de tamaño de poro y finalmente se introducen en los vasos de fermentación.

Se debe indicar que para los hidrolizados procedentes de hidrólisis con ácido fosfórico no se adiciona KH_2PO_4 , y para los hidrolizados neutralizados con MgO no es necesario añadir $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, nutrientes tanto el fósforo como el magnesio necesarios para el crecimiento celular de las levaduras.

III.2.4 Proceso de fermentación

III.2.4.1 Levadura utilizada

Todos los experimentos han sido realizados con la levadura *Pachysolen tannophilus*, (32691), suministrada por la American Type Culture Collection (ATCC).

III.2.4.2 Precultivo en medio sólido

Los microorganismos se mantienen en tubos de ensayo de 100 cm^3 de capacidad sobre un medio sólido con la siguiente composición en g/L:

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

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

A continuación, se disuelve el agar calentando la disolución hasta comienzo de ebullición y manteniéndola en agitación. Se traspasan unos 25 cm^3 de esta suspensión a cada tubo de ensayo, se tapan con algodón graso y se esterilizan en autoclave, Raype mod. AE-110, durante 30 minutos a una sobrepresión comprendida entre 58,8 y 78,5 kPa.

Por último, los tubos se almacenan colocándolos de forma inclinada para conseguir una mayor superficie de inoculación.

El microorganismo se inocula sobre este medio en una cabina de flujo laminar, empleando un asa de platino y en condiciones estériles. Finalmente, los tubos inoculados se conservan en estufa de cultivo. Con una periodicidad de unos 15 días, la levadura se transfiere a medio sólido fresco.

III.2.4.3 Medio de cultivo

Una vez acondicionados los hidrolizados, éstos se emplean como medio de cultivo en la fermentación. No obstante, para poder servir como un medio de crecimiento apropiado para una levadura, los hidrolizados deben ser suplementados con otros componentes, cuya naturaleza y concentración en g/L se relacionan seguidamente:

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

Estos cinco componentes junto con D-glucosa constituirían el medio formulado por Lindegren *et al* (1958). En nuestro caso es el hidrolizado quien suministra los azúcares, y también algunos nutrientes, tal es el caso del magnesio que se aporta al hidrolizado en la etapa de neutralización del mismo.

III.2.4.4 Inóculo líquido

En primer lugar, entre 48 y 60 horas antes del comienzo del experimento, se inocula la levadura sobre el medio de cultivo sólido descrito en el Apartado III.2.4.2 y se mantiene en estufa a 30°C, con el objeto de obtener células en un mismo estado de crecimiento. Sobre este precultivo se añaden unos 20 cm³ de medio de cultivo, a través de un filtro estéril. Se agita suavemente para resuspender los microorganismos y se transfiere a otro tubo esterilizado.

Por último, se determina la concentración de biomasa en el inóculo, a través de la absorbancia de la suspensión celular (según lo indicado en el Apartado III.4.3) y se calcula el volumen de inóculo necesario para que la concentración inicial de biomasa sea próxima a 0,1g/L.

III.2.4.5 Preparación y comienzo del bioproceso

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

Se prepara el medio de cultivo disolviendo los componentes del mismo en los hidrolizados, previamente acondicionados según se describe en el Apartado III.2.3, hasta un volumen de 750 cm³ y se ajusta el pH.

Con la ayuda de una bomba peristáltica y a través de filtros esterilizados, se transfiere el medio hasta los vasos de cultivo. Éstos se sitúan sobre los agitadores magnéticos (regulados a 750 rpm) y se adiciona a cada vaso el volumen de inóculo líquido calculado. En este momento se inicia el cómputo de tiempo.

En el transcurso del experimento se van tomando muestras de los vasos de cultivo, en volumen de 2 a 5 cm³ (dependiendo de las necesidades de análisis), mediante una jeringa estéril. Inmediatamente se determina la concentración celular y se centrifugan las muestras, para retirar las levaduras y conservar el sobrenadante que posteriormente se analizará.

III.3 VARIABLES DE OPERACIÓN

III.3.1 Proceso de hidrólisis

La hidrólisis del residuo de poda se ha llevado a cabo, tanto con disolución ácida como con enzimas, variando una serie de parámetros y analizando así la influencia de éstos en la producción de azúcares reductores y D-glucosa, así como su influencia también en la fermentación de esos hidrolizados.

III.3.1.1 Hidrólisis ácida

En la serie de experimentos de hidrólisis ácida se ha estudiado la influencia de distintas variables de operación, tales como tiempo y temperatura de operación, naturaleza y concentración del ácido.

Para todos los experimentos se han ido tomando muestras a ciertos tiempos (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 minutos), que posteriormente se han analizado para poder determinar la cinética del proceso de hidrólisis.

La influencia de la temperatura de operación (343, 353, 363 y 373 K) se ha estudiado únicamente para la hidrólisis con ácido sulfúrico de concentración 1 N y para la serie de tiempos indicada anteriormente.

Respecto de la naturaleza del agente hidrolítico, se ha trabajado con dos ácidos diferentes: sulfúrico y fosfórico, modificando la concentración de cada uno de ellos desde 0 hasta 8 N (0,0, 0,1, 0,3, 0,5, 0,75, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 y 8,0 N). Todos estos experimentos se han realizado a la temperatura de 363 K.

III.3.1.2 Hidrólisis enzimática

Todos los experimentos de hidrólisis enzimática estuvieron precedidos de un pretratamiento con vapor en autoclave a la sobrepresión de 196,2 kPa.

En una primera serie se estudió la influencia del tiempo de pretratamiento (0, 60, 120, 180 y 300 min) y posteriormente se modificó el tamaño de partícula del residuo, estudiándose las partículas con diámetro medio (d_p) de 513, 363, 213, y 75 μm , según norma ISO 3310-1.

Las relaciones enzima/sustrato (p/v) y celulasas/hemicelulasas (p/p) se modificaron entre 2/100 y 1/10 para la primera y 2/1, 1/1, 2/0, 0/2 y 3/1 para la segunda.

De acuerdo con las condiciones utilizadas por distintos autores (Fanta *et al.*, 1984), también se han modificado las temperaturas y pH de hidrólisis en los valores de 303, 308, 313, 318, 323, 328 y 333 K y 2,5, 3,5, 4,0, 4,4, 4,8, 5,5 y 6,5, respectivamente.

III.3.2 Proceso de fermentación

Todos los experimentos de fermentación se realizaron a 303 K, con agitación (750 rpm) y a un pH de 3,5 para los hidrolizados ácidos y de 4,5 para los hidrolizados enzimáticos, por ser precisamente este el valor de pH óptimo para *Pachysolen tannophilus* (Bravo *et al.*, 1993).

La duración de los experimentos de fermentación se modificó entre 350 y 500 horas dependiendo en cada caso del desarrollo de cada uno de ellos.

III.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

III.4.1 Caracterización del residuo

Por caracterización del residuo se considera la determinación de su contenido en humedad, cenizas, extractos, hemicelulosa, celulosa y lignina. Dado que la suma de porcentajes de estas fracciones no suma 100 se considera que el resto es fracción soluble en agua destilada, fundamentalmente hemicelulosa y celulosa solubles.

Se ha caracterizado tanto el residuo de poda de olivo de partida como los residuos sólidos de las hidrólisis. Los métodos analíticos empleados se describen a continuación.

A) Humedad

Se sigue la norma TAPPI T 11 m-59.

La humedad del residuo de poda de olivo se determina a partir de la pérdida de peso que experimenta cuando se somete a una temperatura de 105 ± 3 °C, durante el tiempo necesario para alcanzar pesada constante. Para determinar si se ha alcanzado pesada constante, una vez que se estima se ha secado la muestra introducida en la estufa, mínimo 6 horas, se introduce en un desecador, con gel de sílice como elemento desecante, durante unos 15 minutos aproximadamente, hasta que alcanza la temperatura ambiente y se pesa; se introduce de nuevo en la estufa y se vuelve a pesar, siguiendo el mismo proceso descrito anteriormente, pasado como mínimo 1 hora hasta que dos pesadas consecutivas den el mismo valor o bien que varias de las pesadas indiquen claramente, por sus oscilaciones, que la variación de peso es debida a errores de medida y no a variación en la humedad de la muestra.

Una porción del residuo, previamente acondicionado, se deja en contacto con el ambiente para que alcance la humedad de equilibrio; de ella se toma una muestra de 2 g aproximadamente en el pesasustancias y se procede a su secado a 105 °C, hasta pesada constante. Se determina el contenido en humedad por diferencia de peso y referido a la muestra original, expresado en tanto por ciento (% HUM).

B) Cenizas

Se ha seguido la norma TAPPI T 15 os-58.

Por cenizas se entiende, el residuo que queda tras someter la muestra a una temperatura de $575\pm 25^{\circ}\text{C}$ durante el tiempo necesario para incinerar el residuo carbonoso; este tiempo es del orden de unas tres horas. Constituye una medida del contenido en sales minerales de la madera.

En crisoles de porcelana, previamente tarados, se pesa alrededor de 1 g de madera y se llevan a un horno mufla (Thermolyne, tipo 1300) a una temperatura de 575°C durante 3 horas, aproximadamente, para su calcinación. Posteriormente se deja enfriar el residuo para determinar el tanto por ciento en peso de cenizas (% CEN) respecto de la muestra inicial.

C) Fibra neutro detergente (FND)

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

La FND es la fracción insoluble de una muestra sometida a ebullición lenta con una disolución neutro detergente y corresponde, fundamentalmente, al contenido en lignina, hemicelulosa y celulosa. La fracción soluble está constituida por sustancias fácilmente asimilables como azúcares sencillos y otras materias solubles en agua. Dicha disolución neutro detergente se prepara como sigue:

Se disuelven 18,61 g de $(\text{EDTA})\text{Na}_2$ y 6,81 g de $\text{B}_4\text{O}_7\text{Na}_2$ en agua bidestilada calentando suavemente. Se añaden 30 g de lauril sulfato sódico y 10 cm³ de etilenglicol. Aparte se disuelven 4,56 g de fosfato monoácido de sodio que se unen a la primera disolución, enrasándose a 1 litro con agua ultrapura.

Se pesa una muestra de 1 g, se le añaden 100 cm³ de disolución neutro detergente, 2 mL de decahidronafaleno (decalina), que actúa como antiespumante, y 0,5 mL de sulfito de sodio; se somete a ebullición durante una hora. A continuación, se filtra a vacío a través de placa porosa, previamente tarada, se lava varias veces con agua caliente y después con acetona, secando en estufa a 105°C hasta pesada constante.

$$\% \text{ FND} = \frac{P_1}{w_1} 100 \quad (3.1)$$

p_1 = peso de la fracción insoluble, g

w_1 = peso de muestra seca, g

D) Fibra ácido detergente (FAD)

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

La FAD es la parte insoluble, formada fundamentalmente por lignina y celulosa, obtenida tras someter la muestra a una ebullición lenta con una disolución ácido detergente. La fracción soluble corresponde al contenido celular y hemicelulosa, ya que éstas sustancias son fácilmente despolimerizables por este disolvente. La disolución ácido detergente se prepara como sigue:

Se disuelven 20 g de bromuro de N-cetil-N,N,N,-trimetil amonio en ácido sulfúrico 1N enrasando a 1 litro.

Se pesa una muestra de 1 g, se le añaden 100 cm³ de disolución ácido detergente y 5 gotas de decalina, que actúa como antiespumante, y se somete a ebullición durante una hora. A continuación, se filtra a vacío a través de una placa porosa, previamente tarada, se lava varias veces con agua caliente y después con acetona, secando finalmente en estufa hasta pesada constante.

$$\% \text{ FAD} = \frac{P_2}{w_2} 100 \quad (3.2)$$

p_2 = peso de la fracción insoluble, g

w_2 = peso seco de muestra, g

E) Lignina

Se sigue la norma TAPPI T 222 os-74.

La lignina representa el llamado "material de incrustación", que forma parte de la pared celular y de la lamela media en maderas. Según el método aplicado, la lignina se define como el constituyente de la madera insoluble en ácido sulfúrico del 72%.

Se pesa una muestra de aproximadamente 1 g de madera, se lleva a un vaso de precipitado de 100 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 dos horas, removiendo frecuentemente. Transcurrido este tiempo se vierte en un matraz donde se lleva a 575 cm³ con agua bidestilada. A continuación, se hierva la disolución durante 4 horas manteniendo constante el volumen mediante un condensador de reflujo. Se deja que el material insoluble (lignina) 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 la estufa a una temperatura de 105 °C hasta pesada constante.

$$\% \text{ LIG} = \frac{p_3}{w_3} 100 \quad (3.3)$$

p_3 = peso de la fracción insoluble, g

w_3 = peso de muestra seca, g

Determinadas FND, FAD y lignina es posible calcular los porcentajes de hemicelulosa y celulosa tal como se indica en las ecuaciones (3.4) y (3.5).

$$\% \text{ HEM} = \% \text{ FND} - \% \text{ FAD} \quad (3.4)$$

$$\% \text{ CEL} = \% \text{ FAD} - \% \text{ LIG} \quad (3.5)$$

F) Extractos

Se sigue la norma TAPPI T 12 m-59.

Por extractos se entienden aquellos materiales solubles en disolventes neutros, que no forman parte de la constitución de la madera. En una mezcla etanol-benceno en proporción 1:2, en volumen, se extrae una pequeña cantidad de los carbohidratos de bajo peso molecular, sales orgánicas, ceras, grasas, resinas y parafinas.

El procedimiento operatorio es el siguiente:

Se coloca una cantidad conocida de muestra en una cápsula de vidrio dentro de un extractor microsoxhlet y se realiza la extracción, durante 4 horas, con una mezcla etanol-benceno (1:2). Finalizada la misma, se filtra en un filtro de placa porosa, para separar el disolvente, y se lava el residuo con etanol.

A continuación, se vuelve a colocar en el soxhlet y se extrae con etanol del 95% durante 4 horas, hasta observar que el etanol en el sifón no tenga color. Cuando se ha acabado la extracción, se extiende la muestra sobre una superficie plana formando una capa delgada para facilitar la evaporación del disolvente; una vez evaporado se extrae el material con agua hirviendo, se vuelve a filtrar y se deja secar al aire. El porcentaje de extractos de la madera se determina por gravimetría como la relación existente entre la diferencia de la madera inicial y la madera ya extractada frente a la madera inicial empleada.

III.4.2 Sustratos analizados

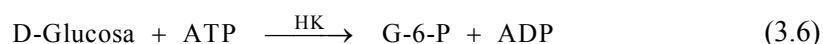
En el transcurso de los procesos de hidrólisis y de fermentación se han analizado de forma cuantitativa las concentraciones residuales de D-glucosa, D-fructosa y azúcares reductores totales de acuerdo a distintos métodos.

III.4.2.1 Contenido en D-glucosa

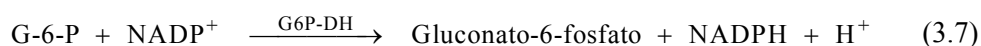
A) Método enzimático (Bergmeyer *et al.*, 1974)

Para determinar el contenido del hidrolizado en D-glucosa se ha empleado el método enzimático propuesto por Bergmeyer *et al.* (1974).

La D-glucosa es fosforilada por el enzima hexoquinasa, HK, [EC 2.7.1.1] y adenosina-5-trifosfato (ATP) a glucosa-6-fosfato (G-6-P) con la formación simultánea de adenosina-5'-difosfato (ADP) según las reacciones siguientes:



En presencia del enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), [EC 1.1.1.49] la G-6-P es oxidada por nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) a gluconato-6-fosfato con aparición de su forma reducida (NADPH).



La cantidad de NADPH formada es estequiométrica a la de D-glucosa presente en la muestra y se determina por medidas de absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. El incremento de NADPH se mide por absorbancia en espectrofotómetro.

El procedimiento operatorio es el siguiente:

- En una cubeta de 1 cm de paso de luz se adicionan 1 cm³ de una disolución de NADP, ATP y un tampón de trietanolamina (pH=7,6), 1,90 cm³ de agua ultrapura y 0,10 cm³ del sobrenadante que resulta de la centrifugación de unos cm³ de la disolución del hidrolizado.

- Se agita y se mide la absorbancia, A_{G1} .
- Seguidamente, se añaden 0,02 cm³ de una disolución que contiene las enzimas HK y G6P-DH.
- Se agita y se deja completar la reacción durante 15 minutos, tras los cuales se mide la absorbancia, A_{G2} .

Se determina la diferencia de absorbancias:

$$\Delta A_{D\text{-glucosa}} = (A_{G2} - A_{G1})_{\text{muestra}} - (A_{G2} - A_{G1})_{\text{blanco}} \quad (3.8)$$

Por blanco se considera una muestra de agua bidestilada que ha seguido el mismo proceso que las demás.

El cálculo de la concentración de D-glucosa, en g/L, viene expresado por la ecuación:

$$g = \frac{V_G M_W^G}{\epsilon d v_G 1000} \Delta A_G F \quad (3.9)$$

siendo:

- V_G = Volumen final, cm³
- v_G = Volumen de muestra, cm³
- M_W^G = Peso molecular de la glucosa, kg/kmol
- d = Paso de luz, cm
- ϵ = Coeficiente de absorción del NADH a 340 nm, igual a 6,3 L/(mMol cm)
- F = Factor de dilución

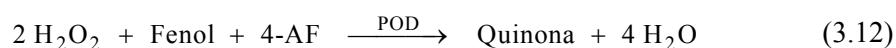
Sustituyendo los valores de los parámetros empleados en este caso, la ecuación para la glucosa se reduce a:

$$g = 0,8637 \Delta A_{D\text{-glucosa}} F \quad (3.10)$$

Este método es válido para concentraciones inferiores a 0,5 g/L, a concentraciones superiores es necesario realizar la dilución correspondiente.

B) Método enzimático de Trinder (1969)

Se basa en las siguientes reacciones:



La glucosa es oxidada hasta gluconato por el enzima glucosa oxidasa (GOD), [EC 1.1.3.4] con la formación simultánea de peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

El peróxido de hidrógeno reacciona con fenol y 4-aminofenazona (4-AF), en presencia del enzima peroxidasa (POD), [EC. 1.11.1.7], formando quinona y agua. La concentración de quinona y, por tanto, la de glucosa presente, se determina a través de la absorbancia a una longitud de onda de 505 nm.

El procedimiento operatorio consta de las siguientes etapas:

- Se prepara la disolución de reactivo disolviendo los contenidos de dos disoluciones de partida; una primera que contiene fenol y un tampón (pH = 7,5) y la segunda que lleva las enzimas (GOD y POD) y 4-AF.
- Se introducen 0,02 cm³ de muestra en una cubeta de 1 cm de paso de luz; mientras que en otra cubeta se disponen 0,02 cm³ de una disolución estándar de glucosa (concentración: 1 g/L).
- Se añaden 2 cm³ de la disolución de reactivo.
- Se deja completar la reacción durante 30 minutos, transcurridos los cuales se mide la absorbancia, frente a un blanco del reactivo como referencia, a una longitud de onda de 505 nm.

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

$$g = \frac{A_m}{A_s} C_s \quad (3.13)$$

donde:

- g = concentración de D-glucosa (g/L)
- C_s = concentración del estándar (1 g/L)
- A_m = absorbancia de la muestra a 505 nm
- A_s = absorbancia del estándar a 505 nm

III.4.2.2 Azúcares reductores totales

Para determinar la concentración de azúcares reductores liberados en la hidrólisis de la hemicelulosa y celulosa se ha utilizado el método del ácido dinitrosalicílico descrito por Miller (1959). Este método está basado en la reacción entre el grupo reductor aldehído del azúcar y el reactivo dinitrosalicílico (DNS), que origina un compuesto coloreado (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico) cuya concentración, y por tanto la del azúcar reductor presente, puede determinarse aplicando un método fotocolorimétrico.

La composición del reactivo DNS es la siguiente:

- | | |
|-------------------------------|-------|
| - ácido 3,5-dinitrosalicílico | 10 g |
| - fenol | 2 g |
| - tartrato sódico-potásico | 200 g |
| - sulfito sódico | 0,5 g |
| - disolución de NaOH al 2% | 0,5 L |

enrasando todo ello hasta 1 L con agua ultrapura.

El procedimiento operatorio consta de las siguientes etapas:

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

La concentración de azúcares reductores totales se calcula a partir de una recta patrón determinada previamente con disoluciones de composición conocida (0,10, 0,16, 0,20, 0,30 y 0,40 g/L). Dicha recta se determina para cada serie de medidas de azúcares totales.

Este método es válido para concentraciones de azúcares reductores totales comprendidas entre 0,05 y 0,50 g/L, por lo que para concentraciones superiores es necesario realizar la dilución correspondiente.

III.4.2.3 Determinación de azúcares por HPLC

Se ha utilizado un equipo Hewlett Packard (mod. 1050), con detector de índice de refracción y una columna HP Hypersil APS (NH₂) de 200 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula. La fase móvil ha sido acetonitrilo/agua en la proporción 80/20 (v/v), con un caudal de 1 cm³/min y una temperatura en el horno y en el detector de 313 K. En todos los casos, la cantidad de muestra utilizada en la inyección ha sido 10 μL.

III.4.3 Biomasa formada en el proceso de fermentación

La concentración celular se ha calculado a través de una curva de calibrado previamente obtenida (Bravo *et al.*, 1995), que relaciona el peso seco y la absorbancia de la suspensión de células.

Las medidas se han realizado a una longitud de onda de 620 nm, utilizando un espectrofotómetro UNICAM, mod. UV2. Cuando la absorbancia se encuentra por encima del rango de linealidad se realiza la dilución correspondiente con medio de cultivo, (Lindgren *et al.* 1958), pero sin D-glucosa. La ecuación de calibrado del espectrofotómetro obtenida, para la levadura *P. tannophilus*, mediante la aplicación del método de mínimos cuadrados es la siguiente:

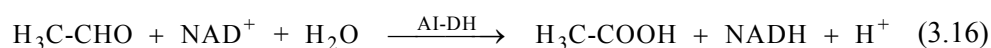
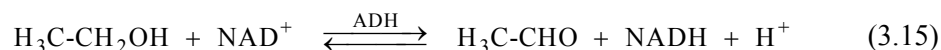
$$x = 0,2095 (A_{620}) + 2,04 \cdot 10^{-4} \quad r^2 = 0,991 \quad (3.14)$$

donde x representa la concentración de biomasa en g/L y A₆₂₀ la absorbancia a dicha longitud de onda.

III.4.4 Bioproductos formados

III.4.4.1 Etanol

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



El etanol es oxidado a acetaldehído por el NAD (dinucleótido nicotinamida-adenina) mediante la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), [EC 1.1.1.1]. El equilibrio de esta reacción está desplazado hacia la derecha en condiciones alcalinas y por la retirada del acetaldehído que se forma.

El acetaldehído se oxida cuantitativamente a ácido acético en presencia de la enzima aldehído deshidrogenasa (AI-DH), [EC. 1.2.15]. El NADH se determina por medidas de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. El procedimiento operatorio consta de las siguientes etapas:

- En una cubeta de 1 cm de paso de luz se disponen 1,5 cm³ de la disolución que contiene NAD y AI-DH en un tampón de difosfato potásico de pH 9,0.
- Se añaden 0,05 cm³ de muestra.
- Se mide la absorbancia a 340 nm, A_{E1}.
- Se añaden 0,025 cm³ de la suspensión que contiene la enzima ADH.
- 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/L; para valores superiores se realiza la correspondiente dilución de la muestra. La concentración de etanol se calcula con la ecuación:

$$E = \frac{V_E \text{ PM}_E}{\epsilon_E d v_E 2 1000} \Delta A_E F \quad (3.17)$$

donde:

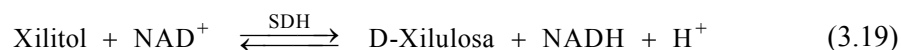
- E = concentración de etanol (g/L)
 F = factor de dilución
 ΔA_E = $(A_{E2} - A_{E1})_{\text{muestra}} - (A_{E2} - A_{E1})_{\text{blanco}}$
 V_E = volumen final (cm³)
 v_E = volumen de muestra (cm³)
 PM_E = peso molecular del etanol (g/mol)
 d = paso de luz (cm)
 ϵ_E = coeficiente de extinción del NADH a 340 nm, igual a 6,3 L/(mM cm)

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

$$E = 0,113 \Delta A_E F \quad (3.18)$$

III.4.4.2 Xilitol

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



El xilitol es oxidado a D-xilulosa por el NAD (dinucleótido nicotinamida-adenina) mediante la enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH, también llamada polialcohol deshidrogenasa), [EC. 1.1.1.14] con la formación de NADH (forma reducida del dinucleótido nicotinamida adenina).

El equilibrio de esta reacción está favorecido hacia la izquierda en las condiciones de este ensayo, pero se puede desplazar hacia la formación de D-xilulosa por la retirada del NADH.

El NADH reduce cuantitativamente al cloruro de iodotetrazolio (INT) (C₁₉H₁₃IClN₅O₂) hasta INT-Formazán (C₁₉H₁₄IN₅O₂) en presencia del enzima diaforasa, [EC. 1.8.1.4]. El

INT-Formazán se determina por medidas de absorbancia a 492 nm. El procedimiento operatorio consta de las siguientes etapas:

- Se introduce en una cubeta de 1 cm de paso de luz una disolución-reactivo formada por 0,5 cm³ de un tampón fosfato potásico/trietanolamina (pH=8,6), 0,2 cm³ de una disolución de diaforasa y 0,2 cm³ de una disolución de INT.
- Se añaden 0,1 cm³ de muestra y 1,90 cm³ de agua ultrapura.
- Se mide la absorbancia, A₁.
- Se añaden 0,05 cm³ de una disolución de SDH.
- Se deja completar la reacción durante 30 minutos y se mide la absorbancia, A₂.

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

$$X_i = \frac{V_{xi} PM_{xi}}{\epsilon_{xi} d v_{xi} 1000} \Delta A_{xi} F \quad (3.21)$$

donde:

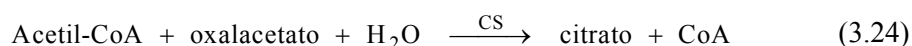
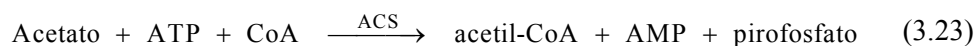
- X_i = concentración de xilitol (g/L)
 F = factor de dilución
 $\Delta A_{xi} = (A_2 - A_1)_{muestra} - (A_2 - A_1)_{blanco}$
 V_{xi} = volumen final (cm³)
 v_{xi} = volumen de muestra (cm³)
 PM_{xi} = peso molecular del xilitol (g/mol)
 d = paso de luz (cm)
 ϵ_{xi} = coeficiente de extinción del INT-Formazán a 492 nm, igual a 19,9 L/(mM cm).

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

$$X_i = 0,2332 \Delta A_{xi} \quad (3.22)$$

III.4.4.3 Ácido acético

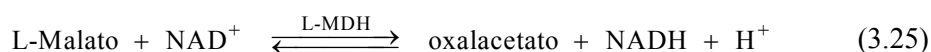
El método enzimático empleado es el propuesto por Bergmeyer y Mollering (1974) basado en las siguientes reacciones:



El acetato es convertido, mediante la acción del enzima acetil-CoA sintetasa (ACS), [EC. 6.2.1.1], también conocido como acetato tioquinasa en presencia de adenosín-5-trifosfato (ATP) y coenzima A (CoA) a acetil-CoA.

El acetil-CoA reacciona con oxalacetato a citrato, en presencia del enzima citrato sintasa (CS), [EC. 4.1.3.7] para producir citrato.

El oxalacetato necesario para la reacción se forma a partir del L-malato y nicotinamín-adenín-dinucleótido (NAD) que, en presencia del enzima L-malato-deshidrogenasa (L-MDH), [EC.1.1.1.37] es reducido a NADH.



La determinación de ácido acético está basada en la formación de NADH medida por el incremento de absorbancia a 340 nm. Debido al equilibrio de la reacción la cantidad de NADH formada no es directamente proporcional a la concentración de ácido acético.

El procedimiento operatorio es el siguiente:

- En una cubeta de 1 cm de paso de luz, se dispone 1 cm³ de la disolución tampón trietanolamina-malato (pH = 8,4), que también contiene ácido málico.
- Se añaden 0,2 cm³ de una disolución de NAD/CoA/ATP, 0,1 cm³ de muestra y 1,9 cm³ de agua ultrapura.
- Se agita y se mide la absorbancia, A₀.
- Se añade 0,010 cm³ de la suspensión de enzimas MDH/CS
- Se agita y se mide la absorbancia después de 3 minutos, A₁.

- Se añade 0,020 cm³ de una disolución de ACS para empezar la reacción
- Se agita y se espera hasta que concluya la reacción durante 15 min, tras los cuales se mide la absorbancia de la disolución, A₂.

El cálculo de la concentración de ácido acético, en g/L, viene expresado por la ecuación:

$$Ac = \frac{V_{Ac} PM}{\epsilon d v_{Ac} 1000} \Delta A_{Ac} F \quad (3.26)$$

donde:

- Ac = concentración de ácido acético (g/L)
 F = factor de dilución
 V_{Ac} = volumen final (cm³)
 v_{Ac} = volumen de muestra (cm³)
 PM_{Ac} = peso molecular del ácido acético (g/mol)
 d = paso de luz (cm)
 ε_{Ac} = coeficiente de extinción del NADH a 340 nm, igual a 6,3 L/(mmol cm).
 ΔA_{Ac} se determina mediante la expresión siguiente:

$$\Delta A_{Ac} = \left[(A_2 - A_0)_{muestra} - \frac{(A_1 - A_0)_{muestra}^2}{(A_2 - A_0)_{muestra}} \right] - \left[(A_2 - A_0)_{blanco} - \frac{(A_1 - A_0)_{blanco}^2}{(A_2 - A_0)_{blanco}} \right] \quad (3.27)$$

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

$$Ac = 0,3079 \Delta A_{Ac} F \quad (3.28)$$

III.5 PRODUCTOS UTILIZADOS

III.5.1 Reactivos químicos

Los reactivos utilizados y sus características se indican a continuación:

1. Acetato de sodio 3-hidrato, purísimo, $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Panreac.
2. Acetona, Q.P., $(\text{CH}_3\text{COCH}_3)$, Panreac.
3. Acetonitrilo, HPLC, (CH_3CN) , 99,8 % , Probus.
4. Ácido acético/agua (1/2), Merckotest DC.
5. Ácido cítrico 1-hidrato, P.A., $(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O})$, Panreac.
6. Ácido clorhídrico, P.A., (HCl) , 35%, Panreac.
7. Ácido etilen-diamino-tetracético sal disódica dihidratada, P.A., $(\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$, Panreac.
8. Ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoico, P.A., $(\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7)$, Merck.
9. Ácido ortofosfórico, purísimo, 85%, PRS, (H_3PO_4) , Panreac.
10. Ácido sulfúrico, P.A., (H_2SO_4) , 98%, Panreac.
11. Agua ultrapura, resistividad 18,2 mΩ-cm.
12. Benceno, purísimo, (C_6H_6) , Panreac.
13. Calcio hidróxido, polvo purísimo, PRS, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Panreac.
14. N-Cetil-N,N,N-trimetil amonio bromuro, P.A., $(\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{NBr})$, Panreac.
15. Decahidronaftaleno (cis-trans), puro, $(\text{C}_{10}\text{H}_{18})$, Fluka.

16. Disolución tampón Crison, pH = 4,01, cat. n° 23-110-02.
17. Disolución tampón Crison, pH = 7,00, cat. n° 23-111-02.
18. Electrolito (KCl 3 M + AgCl), Crison, cat. n° 95-01.
19. Etanol, P.A., (C₂H₆O), 96%, Panreac.
20. Etilenglicol, P.A., (C₂H₆O₂), Panreac.
21. Fenol, P.A., (C₆H₅OH), Carlo Erba.
22. D-Glucosa, anhidra, P.A., (C₆H₁₂O₆), Panreac.
23. Helio, N-45, (He), 99,995%, SEO.
24. Lauril sulfato sódico, 95%, (C₁₂H₂₅SNa), Sigma.
25. Magnesio óxido, químicamente puro, Q.P., (MgO), Panreac.
26. Magnesio sulfato heptahidratado, P.A., (MgSO₄·7H₂O), 99,5%, Carlo Erba.
27. Potasio hidróxido, P.A., (KOH), Panreac.
28. Potasio diácido fosfato, P.A., (KH₂PO₄), Panreac.
29. Reactivo enzimático de determinación de ácido acético, N° Cat. 148261, Boëhringer Mannheim.
30. Reactivo enzimático de determinación de etanol, N° Cat. 176290, Boëhringer Mannheim.
31. Reactivo enzimático de determinación de D-glucosa, Cod. 1001190, Spinreact.
32. Reactivo enzimático de determinación de D-glucosa/D-fructosa, N° Cat. 139106, Boëhringer Mannheim.

33. Reactivo enzimático de determinación de D-sorbitol/xilitol, N° Cat. 670057, Boehringer Mannheim.
34. Sodio fosfato monoácido dodecahidratado, P.A., ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), Merck.
35. Sodio hidróxido, P.A. (NaOH), 99%, Merck.
36. Sodio sulfito heptahidratado, P.A. ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Carlo Erba.
37. Sodio tetraborato decahidratado, purísimo ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), Panreac.
38. Sodio y potasio tartrato tetrahidratado, P.A. 99%, ($\text{COOK}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Carlo Erba.
39. D-xilosa anhidra, purísima, ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$), Panreac.

III.5.2 Otros materiales

1. Agar-agar, purísimo, Panreac.
2. Celulasas de *Trichoderma viride*, Sigma [EC 3.2.1.4]
3. Extracto de levadura, BBL.
4. Extracto de malta, Merck.
5. Hemicelulasas de *Aspergillus niger*, Sigma [EC 232-799-9].
6. Lana de vidrio lavada, pura, Panreac.
7. Peptona de caseína, Merck, Ref. 7216 (Riqueza 80%).
8. Silicona pasta A, químicamente puro, Panreac.
9. Silicona pasta B, químicamente puro, Panreac.

IV. Resultados experimentales

IV.1 HIDRÓLISIS ÁCIDA

En el transcurso de esta experimentación se han utilizado dos residuos de poda distintos, correspondientes a las campañas 1997 y 2000. La caracterización de estos residuos muestra que existen diferencias en relación con la composición de las fracciones de celulosa, hemicelulosa, lignina, cenizas y extractos; por ello, en las tablas de experimentos se ha especificado la composición del residuo de poda de partida y el que se obtiene después del tratamiento de hidrólisis. En todos los casos se indican los porcentajes de humedad, cenizas, hemicelulosa, celulosa y lignina. El tanto por ciento de extractos, determinado en los residuos de partida, arroja valores distintos para cada uno de ellos: 14,1 % (Ref. 1) y 23,9 % (Ref. 2).

En toda experimentación, cuando se inicia un ensayo existe al principio de éste un intervalo de tiempo en el que ciertas variables externas tienen una gran influencia sobre el desarrollo posterior. Así, el tiempo que se tarda en alcanzar la temperatura de operación, los distintos tratamientos físicos que pueda haber recibido el residuo en cada experimento, las condiciones ambientales, distintos residuos de partida, etc. influyen en los resultados analíticos que se puedan obtener de las diferentes muestras extraídas del reactor. Considerando este hecho, en todos los experimentos se ha realizado una toma de muestra al inicio, tiempo cero, al objeto de determinar unas condiciones de partida que no son controlables y que sí influyen bastante en el desarrollo experimental.

Respecto de la hidrólisis ácida, se considera tiempo cero aquel al cual se alcanza la temperatura de operación prefijada de antemano. La forma de operar ha sido precalentar el reactor con aproximadamente el 90-95% de la disolución de ácido hasta alrededor de unos 5 K por encima de la temperatura de trabajo, y a continuación añadir, por una de las bocas de la tapa, el residuo pesado y finalmente limpiar el pesasustancias con el resto del ácido. Una vez terminada esta operación se cierra el reactor, se conecta la agitación y transcurridos unos segundos se para de nuevo para la toma de muestra, considerando este momento como tiempo cero.

IV.1.1 Pretratamientos

Se ha realizado la hidrólisis ácida del residuo de poda de olivo sometido a dos pretratamientos diferentes: a presión y con ultrasonidos.

IV.1.1.1 A presión

En esta serie se realizaron tres experimentos, para estudiar la influencia del pretratamiento sobre los rendimientos obtenidos en la posterior hidrólisis ácida del residuo de poda de olivo.

Todos los experimentos se han realizado a presión constante de 196,32 kPa de sobrepresión y se ha modificado el tiempo que se mantenía la mezcla, agua-madera de olivo (relación 5/1 en v/p), a presión. Los tiempos ensayados han sido: 30 minutos (expto HASP-1), 60 minutos (expto HASP-2) y 120 minutos (expto HASP-3). Para completar esta serie de tiempo de pretratamiento se ha hecho uso de un experimento de otra serie, sin pretratamiento, pero en el que las condiciones de hidrólisis son idénticas a las de los tres experimentos anteriores (expto HAS-3).

Las condiciones de operación para la hidrólisis ácida de los cuatro experimentos considerados han sido:

- relación líquido/sólido (v/p): 10/1
- concentración de ácido sulfúrico: 0,5 N
- temperatura: 363 K
- tiempo de hidrólisis: 240 minutos.

Los residuos obtenidos tras el pretratamiento seguido de hidrólisis ácida se han caracterizado, Apartado III.4.1, y los resultados obtenidos han sido incluidos en la Tabla IV.1, junto con los correspondientes al residuo de partida. Por otra parte, también se han caracterizado las muestras de hidrolizado retiradas durante el tiempo de experimentación, Apartados III.4.2.1 y III.4.2.2, y los resultados de azúcares reductores totales y D-glucosa, respectivamente, se recogen en las Tablas IV.2 y IV.3.

En la Tabla IV.1 puede observarse que el contenido en cenizas disminuye hasta valores prácticamente nulos y el de hemicelulosa baja apreciablemente. Estas variaciones, según se deduce, no parecen provocadas por el pretratamiento realizado por lo que se estima que este

no tiene influencia. Los contenidos en celulosa y lignina no se ven afectados y su oscilación entre experimentos es debido posiblemente a la variación de hemicelulosa.

En la Tabla IV.2 las concentraciones de azúcares reductores totales varían desde 2,6, a tiempo cero, hasta 19,5 kg/m³, a 240 minutos, en el ensayo sin pretratamiento y en menor cuantía para el resto de experimentos, que han sido pretratados. Ello indica que durante el pretratamiento se liberan algunos azúcares solubles, pero dicha operación no facilita el posterior proceso de hidrólisis; hecho que coincide con la variación de hemicelulosa de la Tabla IV.1. En la Tabla IV.3 de concentración en D-glucosa se observa un comportamiento similar.

De lo expuesto se deduce que el pretratamiento a presión no tiene influencia apreciable sobre la posterior hidrólisis ácida del residuo de poda de olivo puesto que las variaciones que pueden observarse en cuanto a la fracción hemicelulósica y a las cenizas son debidas a la hidrólisis y no al tiempo de pretratamiento.

TABLA IV.1
HIDRÓLISIS ÁCIDA: PRETRATAMIENTO A PRESIÓN
CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO

	HUM, %	CEN, %	HEM, %	CEL, %	LIG, %
Ref.1	10,5	3,5	23,6	30,6	20,9
HAS-3	11,5	0,2	6,1	44,8	35,2
HASP-1	6,5	0,1	6,2	44,8	33,7
HASP-2	7,2	0,1	7,0	43,6	34,7
HASP-3	7,9	0,0	7,0	42,6	35,6

TABLA IV.2
HIDRÓLISIS ÁCIDA: PRETRATAMIENTO A PRESIÓN
 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 Azúcares reductores totales

P = 196,32 kPa

t, min	HAS-3	HASP-1	HASP-2	HASP-3
	s, kg/m ³			
0	2,55	5,46	6,36	7,24
5		6,82	7,38	8,17
10		8,77	8,65	9,30
15	7,49	9,83	10,09	10,31
30	7,75	12,21	11,40	11,75
45		12,48	12,84	12,49
60	11,23	13,14	13,91	13,42
90	12,58	13,88	15,15	15,02
120	14,55	16,30		16,73
150	16,06	17,08	18,02	18,52
180	17,32	18,41	19,22	19,69
210	18,43	21,06	21,37	20,54
240	19,53	20,67	21,85	21,40

TABLA IV.3
HIDRÓLISIS ÁCIDA: PRETRATAMIENTO A PRESIÓN
 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 D-glucosa

P = 196,32 kPa

t, min	HAS-3	HASP-1	HASP-2	HASP-3
	g, kg/m ³			
0	0,80	1,10	0,97	1,01
5		1,20	1,00	1,01
10		1,23	1,05	0,96
15	1,40	1,36	1,10	1,04
30	1,61	1,37	1,10	1,03
45		1,64	1,32	1,21
60	1,74	1,80	1,40	1,28
90	1,95	1,76	1,64	1,45
120	2,10	2,26	2,01	1,89
150	2,45	2,79	2,63	2,06
180	2,82	3,24	3,31	2,48
210	3,25	3,26	3,54	2,94
240	3,40	3,13	3,24	3,37

IV.1.1.2 Con ultrasonidos

En esta segunda serie se estudió la influencia que sobre la hidrólisis ácida tiene un pretratamiento con ultrasonidos.

Por ultrasonidos se considera la emisión de energía mediante ondas electromagnéticas de alta frecuencia, baja longitud de onda y alto contenido energético. Son utilizadas para romper las paredes celulares de los microorganismos empleados en las diferentes líneas de investigación y con ello poder determinar la concentración de proteínas o de otras biomoléculas que contienen. En esta investigación de hidrólisis de residuo de poda de olivo se han empleado los ultrasonidos para estudiar un posible pretratamiento que de alguna forma rompa la estructura cristalina de la celulosa y con ello se favorezca la posterior hidrólisis.

En un primer experimento se sometió el residuo de poda de olivo a pretratamiento con ultrasonidos durante 30 minutos y posteriormente se hidrolizó con agua a 363 K durante 240 minutos (expto HwU). Este experimento se comparó con otro realizado en idénticas condiciones pero sin pretratamiento (expto Hw).

En un segundo experimento, se sometió el residuo al mismo pretratamiento y posteriormente se le realizó una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico 0,5 N, a 363 K y durante 240 minutos (expto HASU-1). Este experimento se compara con otro de hidrólisis ácida en idénticas condiciones (expto HAS-3), pero sin pretratamiento.

En la Tabla IV.4 se muestran los resultados obtenidos tras caracterizar los residuos sólidos de los experimentos anteriores y puede observarse cómo la variación en cenizas es debida a la concentración de ácido y no al pretratamiento al igual que ocurre con la hemicelulosa. La celulosa y la lignina parecen no resultar afectadas.

En las Tablas IV.5 y IV.6 aparece la composición de las muestras de hidrolizado retiradas en el transcurso de cada experimento, azúcares reductores totales y D-glucosa, respectivamente, y no se observan diferencias apreciables por el empleo de ultrasonidos.

De lo expuesto se deduce que el pretratamiento con ultrasonidos tampoco tiene influencia apreciable en la posterior hidrólisis ácida del residuo de poda de olivo. Lo que sí ponen de manifiesto estas tablas es el mayor ataque sufrido por el residuo de poda de olivo cuando el agente hidrolítico es un ácido.

TABLA IV.4
HIDRÓLISIS ÁCIDA: PRETRATAMIENTO CON ULTRASONIDOS
CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO

	HUM, %	CEN, %	HEM, %	CEL, %	LIG, %
Ref.1	10,5	3,5	23,2	30,6	20,9
Hw	6,6	2,9	23,3	36,0	24,8
HwU	8,6	3,1	24,0	35,2	24,1
HAS-3	11,5	0,2	6,1	44,8	35,2
HASU-1	8,0	0,3	7,0	45,7	34,9

TABLA IV.5
HIDRÓLISIS ÁCIDA: PRETRATAMIENTO CON ULTRASONIDOS
 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 Azúcares reductores totales

$\nu = 23,3 \text{ kHz}$

t, min	Hw	HwU	HAS-3	HASU-1
	s, kg/m ³			
0	2,22	2,52	2,55	5,65
15	2,42	2,69	7,49	10,57
30	2,44	2,79	7,75	12,09
45	2,57	2,99		13,14
60	2,70	3,08	11,23	13,17
90	2,62	3,14	12,58	14,92
120	2,70	3,14	14,55	16,51
150	2,72	3,22	16,06	18,09
180	2,86	3,39	17,32	18,93
210	2,82	3,60	18,43	20,43
240	3,20	3,47	19,53	21,43

TABLA IV.6
HIDRÓLISIS ÁCIDA: PRETRATAMIENTO CON ULTRASONIDOS
 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 D-glucosa

$\nu = 23,3 \text{ kHz}$

t, min	Hw	HwU	HAS-3	HASU-1
	g, kg/m ³			
0	0,41	0,45	0,80	1,36
15	0,35	0,53	1,40	1,59
30	0,40	0,61	1,61	1,48
45	0,35	0,46		1,56
60	0,37	0,47	1,74	1,84
90	0,38	0,48	1,95	2,26
120	0,38	0,47	2,10	2,34
150	0,38	0,43	2,45	2,53
180	0,41	0,45	2,82	3,18
210	0,45	0,42	3,25	3,59
240	0,43	0,54	3,40	3,93

IV.1.2 Naturaleza y concentración de ácido

Sin pretratamiento alguno, se han realizado dos series de experimentos de hidrólisis con ácidos de distinta naturaleza (H_2SO_4 y H_3PO_4) para estudiar la influencia que la concentración de ácido tiene sobre la hidrólisis del residuo de poda de olivo.

IV.1.2.1 Ácido sulfúrico

En esta serie (HAS) se ha modificado, manteniendo constante la temperatura de hidrólisis en 363 K y el tiempo de operación en 240 minutos, la concentración de ácido sulfúrico entre 0 y 8 N. En todos los experimentos de la serie se ha caracterizado tanto el residuo sólido obtenido tras la hidrólisis, Tabla IV.7, como las muestras de hidrolizado retiradas de forma periódica, Tablas IV.8 y IV.9, de azúcares reductores totales y D-glucosa, respectivamente.

Todos los residuos sólidos obtenidos tras hidrólisis se han dejado secar, extendidos sobre un papel, expuestos al ambiente en los laboratorios del Departamento; lo que condiciona el contenido en humedad que tengan debido a las condiciones atmosféricas existentes en el momento del secado. Esto puede observarse en la Tabla IV.7 en la que cada residuo tiene un valor de humedad distinto lo cual no representa problema alguno ya que todos los cálculos posteriores se realizan en base seca.

Si comparamos los tiempos cero de cada experimento, en las Tablas IV.8 y IV.9 se puede observar cómo a medida que aumenta la concentración de ácido las concentraciones, tanto de azúcares reductores totales como de D-glucosa, también aumentan. Esto puede deberse a las distintas condiciones de inicio de cada experimento.

TABLA IV.7
HIDRÓLISIS ÁCIDA: CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SULFÚRICO
 CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO

	$T_H = 363 K$	$t = 240 min$				
	C_A, N	HUM, %	CEN, %	HEM, %	CEL, %	LIG, %
Ref. 1	---	10,5	3,5	23,2	30,6	20,9
Hw	0,0	6,6	2,9	24,5	36,2	24,8
HAS-1	0,1	8,4	2,7	22,9	39,5	26,6
HAS-2	0,3	13,0	1,6	11,0	41,0	32,9
HAS-3	0,5	11,2	0,2	6,1	44,9	35,1
HAS-4	0,75	7,0	0,2	3,2	44,7	35,8
HAS-5	1,0	9,7	0,2	0,0	47,9	38,0
HAS-6	2,0	6,6	0,1	0,0	45,9	41,3
HAS-7	4,0	6,2	0,1	0,0	46,4	41,7
HAS-8	6,0	11,3	0,05	0,0	45,4	42,6
HAS-9	8,0	6,6	0,02	0,0	42,2	45,0

TABLA IV.8
HIDRÓLISIS ÁCIDA: CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SULFÚRICO
CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 Azúcares reductores totales

Serie: HAS		$T_H = 363\text{ K}$								
	Hw	HAS-1	HAS-2	HAS-3	HAS-4	HAS-5	HAS-6	HAS-7	HAS-8	HAS-9
C_A, N	0,0	0,1	0,3	0,5	0,75	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0
t, min	s, kg/m^3									
0	2,22	2,46	2,70	3,08	3,81	6,13	6,01	12,33	23,15	
15	2,42	3,40	5,91	7,97	9,01	12,04	18,65	25,91	24,07	
30	2,44	4,08	8,57	10,16	11,50	16,91	22,32	27,50	26,15	
45	2,57	4,77	9,74	11,36	13,98	19,70	24,41	28,17	27,99	
60	2,70	5,02	11,16	12,67	15,64	21,30	24,56	28,25		
90	2,62	5,66	13,23	14,94	18,51	23,21				
120		6,42	14,61	17,35	20,69	24,17				
150	2,72	7,08	16,22	18,97	21,97					
180	2,86	7,35	17,06	20,60	23,33					
210	2,82	7,95	18,02	21,38	24,31					
240		8,29	19,70	21,52	24,99					

TABLA IV.9
HIDRÓLISIS ÁCIDA: CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SULFÚRICO
 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 D-glucosa

Serie: HAS		$T_H = 363\text{ K}$								
H _w	HAS-1	HAS-2	HAS-3	HAS-4	HAS-5	HAS-6	HAS-7	HAS-8	HAS-9	
C _A , N	0,0	0,1	0,3	0,5	0,75	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0
t, min	g, kg/m ³									
0	0,41	0,59		0,81	0,97	1,35	1,69	1,38	2,14	1,78
15	0,35	0,85		0,99	1,48	1,59	2,13	4,14	5,74	6,21
30	0,40	1,05	2,05	1,34	1,74	2,18	3,34	5,44	6,12	6,16
45	0,35	1,16		1,42	1,68	2,23	4,20	6,14	6,56	6,96
60	0,37	1,09	2,57	1,15	1,85	2,60	4,96	6,22	6,43	6,53
90	0,38	1,25	2,42	1,59	2,44	3,79	5,72	6,14	6,08	6,56
120	0,38	1,20	2,66	1,75	2,96	4,51	5,94	6,25	6,04	6,86
150	0,38	1,20	2,89	2,22	3,50	4,89	6,40	6,75	6,21	6,72
180	0,41	1,33	3,07	2,38	3,88	5,49	6,25	6,72	7,60	6,49
210	0,45	1,15	3,45	2,69	4,35	5,91	6,34	6,50	6,26	6,25
240	0,43	1,37	3,58	3,25	4,65	6,70	6,84	6,53	7,05	6,71

IV.1.2.2 Ácido fosfórico

Con la hidrólisis se consigue liberar los azúcares que forman la hemicelulosa y la celulosa obteniéndose una disolución diluida denominada hidrolizado. Como el objetivo fundamental es obtener etanol, este hidrolizado debe ser fermentado y previamente acondicionado para ello. Los hidrolizados obtenidos tras hidrólisis con ácido sulfúrico tienen como principal característica su bajo pH y una alta concentración de iones; para subir el pH y eliminar los iones sulfato se emplean lechadas de óxido de magnesio con lo que precipita el sulfato de magnesio. Por otra parte, deben agregarse a la disolución nutrientes para las levaduras, y aquí es donde se justifica el estudio de un nuevo ácido en la hidrólisis, que además sirva de nutriente para la posterior fermentación lo que sólo implicaría ajustar el pH del medio pero no retirar el ácido.

El ácido empleado, que además es nutriente en la fermentación, es el ácido fosfórico. Las condiciones de operación han sido: temperatura 363 K y tiempo de hidrólisis 240 minutos. En la Tabla IV.10, correspondiente a esta serie (HAP), se recogen las concentraciones a las que se ha trabajado, así como la composición de los residuos y de la madera de partida (Ref. 1) y en las Tablas IV.11 y IV.12 se indica la concentración en azúcares reductores totales y D-glucosa, respectivamente, de las muestras de hidrolizado retiradas periódicamente.

Con respecto al contenido en cenizas, en la Tabla IV.10 se observa que el ácido fosfórico, aunque disuelve las cenizas no tiene un efecto tan elevado como el ácido sulfúrico.

TABLA IV.10
HIDRÓLISIS ÁCIDA: CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO FOSFÓRICO
 CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO

	$T_H = 363 K$	$t = 240 min$				
	C_A, N	HUM, %	CEN, %	HEM, %	CEL, %	LIG, %
Ref. 1	---	10,5	3,5	23,2	30,6	20,9
Hw	0,0	6,6	2,9	23,3	36,0	24,8
HAP-1	0,1	6,9	2,7	20,6	35,9	24,3
HAP-2	0,3	5,5	2,5	19,1	37,2	26,1
HAP-3	0,5	6,7	2,8	17,0	40,4	25,6
HAP-4	1,0	10,1	2,4	14,9	40,9	27,6
HAP-5	2,0	9,5	1,8	13,7	43,8	30,3
HAP-6	4,0	7,5	1,6	10,4	41,7	30,7
HAP-7	8,0	10,2	1,4	8,1	45,9	31,7

TABLA IV.11
HIDRÓLISIS ÁCIDA: CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO FOSFÓRICO
 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 Azúcares reductores totales

Serie: HAP		$T_H = 363\text{ K}$						
Hw	HAP-1	HAP-2	HAP-3	HAP-4	HAP-5	HAP-6	HAP-7	
C _{A,N}	0,0	0,1	0,3	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
t, min	s, kg/m ³							
0	2,22	2,46	2,51	2,56	3,83	2,76	3,02	3,20
15	2,42	2,89	3,32	3,65	5,63	4,93		8,20
30	2,44	3,13	3,71	4,40	6,43	6,65		8,98
45	2,57	3,22	3,94	5,41	7,19	8,38		10,75
60		3,50	4,41	5,69	7,67	8,76	9,86	11,89
90	2,62	3,83	4,96	6,48	7,82	9,97	10,38	13,97
120	2,70	3,99	5,60	6,17		11,03	11,72	14,07
150	2,72	4,20	5,47	6,77		11,48	12,13	17,29
180	2,86	4,30	6,00	7,37		11,79	14,04	16,83
210	2,82	4,58	6,74	7,52		12,84	14,19	17,14
240		4,69	6,96	8,12		13,67	15,23	20,25

TABLA IV.12
HIDRÓLISIS ÁCIDA: CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO FOSFÓRICO
 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 D-glucosa

$T_H = 363\text{ K}$

Serie: HAP								
	Hw	HAP-1	HAP-2	HAP-3	HAP-4	HAP-5	HAP-6	HAP-7
C_A, N	0,0	0,1	0,3	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
t, min	g, kg/m ³							
0	0,41	0,43	0,60	0,59	0,53	0,72	1,12	0,84
15	0,35	0,53	0,71	0,78	0,83	1,24	1,23	1,19
30	0,40	0,70	0,86	0,92	0,88	1,42	1,43	1,33
45	0,35	0,79	1,00	0,98	1,08	1,37	1,34	1,41
60	0,37	0,86	0,96	1,04	0,98	1,48	1,44	1,50
90	0,38	0,87		1,24	1,14	1,53	1,38	1,70
120	0,38	0,84	1,15	1,20	1,16	1,53	1,33	1,95
150	0,38	0,99	1,18	1,24	1,07	1,41	1,41	2,27
180	0,41	1,00	1,18	1,24	1,11		1,45	2,67
210	0,45	1,03	1,15	1,18	1,21	1,57	1,57	2,99
240	0,43	1,03	1,15	1,19	1,23	1,62	1,75	3,50

IV.1.3 Temperatura de hidrólisis

Estudiadas las hidrólisis de residuo de poda de olivo sometido a diferentes pretratamientos así como el empleo de diferentes ácidos, se ha procedido a estudiar, en una nueva serie (HAST), la influencia que sobre la hidrólisis ácida del residuo tiene la temperatura de operación.

Todos los experimentos de esta serie se han realizado con ácido sulfúrico 1 N y tiempo de hidrólisis de 240 minutos. En la Tabla IV.13 se recogen las temperaturas a las que se ha trabajado, así como la composición de los residuos y la de la madera de partida (Ref. 2), y en las Tablas IV.14 y IV.15 la composición de las diferentes muestras de hidrolizado retiradas periódicamente.

TABLA IV.13
HIDRÓLISIS ÁCIDA: TEMPERATURA
CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO

<i>Ácido sulfúrico</i>	$C_A = 1,0 N$					$t = 240 \text{ min}$
	T_H, K	HUM, %	CEN, %	HEM, %	CEL, %	LIG, %
Ref. 2	---	5,6	3,1	21,9	24,5	21,2
HAST-1	333	10,3	0,1	21,8	39,8	23,6
HAST-2	343	6,0	0,04	19,8	41,8	26,9
HAST-3	353	7,0	0,03	10,8	44,3	32,2
HAS-5 (Ref. 1)	363	9,7	0,2	0,0	47,9	38,0
HAST-4	373	5,4	0,03	0,0	47,9	39,9

TABLA IV.14
HIDRÓLISIS ÁCIDA: TEMPERATURA
CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 Azúcares reductores totales

<i>Ácido sulfúrico</i>		$C_A = 1,0 N$				
	HAST-1	HAST-2	HAST-3	HAS-5	HAST-4	
T_H, K	333	343	353	363	373	
t, min	$s, kg/m^3$					
0	1,73	3,27	4,00	3,81	9,40	
15	5,97	8,04	10,71	9,01	19,71	
30	6,55	9,59	12,59	11,50	24,31	
45	7,49	10,38	13,36	13,98	25,20	
60	7,74	10,96	15,13	15,64	28,52	
90	8,18	11,90	16,04	18,51		
120	8,67	12,98	16,97	20,69		
150	9,54	13,26	18,87	21,97		
180	9,99	13,84	19,99	23,33		
210	10,19	13,93	20,60	24,31		
240	10,43	14,42	20,87	24,99		

TABLA IV.15
HIDRÓLISIS ÁCIDA: TEMPERATURA
CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 D-glucosa

<i>Ácido sulfúrico</i>		$C_A = 1,0 N$				
	HAST-1	HAST-2	HAST-3	HAS-5	HAST-4	
T_H, K	333	343	353	363	373	
t, min	g, kg/m ³					
0	0,53	0,63	0,74	1,35	1,35	
15	1,11	1,15	1,51	1,59	2,09	
30	1,28	1,26	1,53	2,18	3,43	
45	1,33	1,30	1,57	2,23	4,12	
60	1,32	1,38	1,62	2,60	5,23	
90	1,40	1,40	1,68	3,79	5,25	
120	1,47	1,47	2,03	4,51	5,52	
150	1,54	1,49	2,08	4,89	5,64	
180	1,49	1,45	2,11	5,49	6,69	
210	1,63	1,54	2,52	5,91	6,94	
240	1,46	1,75	2,88	6,70	7,16	

IV.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Realizada la hidrólisis ácida, posteriormente se procedió a estudiar la obtención de azúcares, a partir del residuo de poda de olivo, mediante la realización de diferentes experimentos de hidrólisis enzimática. Dado que antes de realizar la hidrólisis enzimática es conveniente someter el residuo a un pretratamiento que lo esponje y favorezca el posterior acceso del enzima a los centros de actuación, todos los experimentos de hidrólisis enzimática se han realizado sobre residuo pretratado con vapor de agua.

Considerando lo indicado en el Apartado IV.1, respecto de las tomas de muestra a tiempo cero, en la hidrólisis enzimática se considera este tiempo en el momento en el que se alcanza la temperatura de operación. Una vez realizado el pretratamiento a presión, el *modus operandi* en estas series de experimentos ha sido enfriar la mezcla residuo de poda-agua hasta temperatura ambiente, añadir el peso de agua que se haya perdido en el autoclave (o la disolución tampón según el caso), para así mantener la relación peso de sólido/volumen de líquido, calentar hasta la temperatura de operación, añadir las enzimas, agitar y tomar la muestra de la disolución a tiempo cero.

Durante el tiempo que se mantiene en contacto el sólido con la disolución, sin enzimas, se solubilizan aquellos componentes solubles a la temperatura del sistema, por lo que también puede haber oscilaciones en la composición de las muestras de tiempo cero entre distintos experimentos y habrá que considerar la forma de eliminar estos valores de partida con vistas al tratamiento de los resultados obtenidos.

IV.2.1 Naturaleza de la disolución tampón

Se han realizado tres hidrólisis con diferentes tampones y con la mejor condición de cada una de las series (Apartados IV.2.2 a IV.2.6): 300 minutos de pretratamiento con vapor, tamaño medio de partícula de 75 μm , relación enzima/sustrato 0,005 g/g, relación celulasas/hemicelulasas 2/1g/g, pH 4,8 y temperatura 318 K. Los tampones empleados han sido: acético/acetato (expto HEtp-1) y cítrico/citrato (expto HEtp-2); finalmente, se realizó un experimento con idénticas condiciones pero sin disolución tampón (expto HEtp-3). El objetivo de esta serie ha sido determinar la posible influencia que sobre la fermentación tiene el tampón empleado.

Tanto la caracterización del residuo resultante tras la hidrólisis como la concentración en azúcares reductores totales y en D-glucosa de las diferentes muestras de hidrolizado han resultado ser muy semejantes e independientes del tampón empleado tal como se puede comprobar en las Tablas IV.16 a IV.18.

TABLA IV.16
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: DISOLUCIÓN TAMPÓN
 CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO

	HUM, %	CEN, %	HEM, %	CEL, %	LIG, %
Ref. 1	10,5	3,5	23,2	30,6	20,9
HEtp-1	6,0	4,6	19,3	16,7	36,8
HEtp-2	6,6	4,9	18,9	17,0	37,4
HEtp-3 (Ref. 2)	5,4	5,7	19,1	16,9	37,5

TABLA IV.17
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: DISOLUCIÓN TAMPÓN
 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 Azúcares reductores totales

t, h	HEtp-1	HEtp-2	HEtp-3
	s, kg/m ³		
0	8,40	10,52	8,21
3	9,72		9,18
16	11,01	16,16	10,00
20	12,55	17,07	12,24
26	12,75	14,29	
40	13,36	15,53	
44	13,40		15,83
48	15,53	17,29	16,00

TABLA IV.18
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: DISOLUCIÓN TAMPÓN
 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 D-glucosa

t, h	HEtp-1	HEtp-2	HEtp-3
	g, kg/m ³		
0	1,80	1,66	1,30
3	2,26		2,77
16	5,75	4,71	
20	5,14	5,09	3,02
26	5,60	5,25	3,47
40	5,95	5,48	
44	6,66		6,01
48	7,45	5,99	6,46

IV.2.2 Pretratamientos a presión

Para estudiar la posible influencia del pretratamiento sobre la posterior hidrólisis, en primer lugar, se ha realizado una serie de cinco experimentos en los que se modificó únicamente el tiempo de pretratamiento (HEP). La operación realizada ha consistido en someter una mezcla de agua y residuo de poda de olivo (relación 5/1 en v/p) a presión, en autoclave, con lo que se conseguían temperaturas que oscilaban entre 393 y 403 K. El resto de las variables de operación se mantuvieron constantes en los siguientes valores:

- pH de la disolución: 4,8
- Temperatura de hidrólisis: 318 K
- Relación enzima/sustrato: 2/1000 (p/p)
- Relación celulasas/hemicelulasas: 2/1 (p/p)
- Diámetro medio de partícula: 513 μm (valor medio de la fracción de partículas de residuo comprendidas en el intervalo 425-600 μm)

En la Tabla IV.19, de caracterización del residuo sólido obtenido en cada experimento, se puede observar que el contenido en cenizas desciende levemente con el aumento del tiempo

de pretratamiento, pero no de forma apreciable. La hidrólisis enzimática, parece ser que no influye sobre el contenido en cenizas del residuo, al contrario que la hidrólisis ácida que prácticamente disuelve todas las cenizas de los residuos de partida para concentraciones de ácido sulfúrico superiores a 0,3 N, Tabla IV.7.

En las Tablas IV.20 y IV.21 se muestran, respectivamente, los resultados obtenidos tras analizar la concentración de azúcares reductores totales y el contenido en D-glucosa de las diferentes muestras tomadas durante la hidrólisis.

TABLA IV.19
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: TIEMPO DE PRETRATAMIENTO
CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO

<i>pH = 4,8</i> <i>T_H = 318 K</i> <i>(E/S)₀ = 0,002</i> <i>EC/EH = 2/1</i> <i>d_p = 513 μm</i>						
	<i>t_p, h</i>	<i>HUM, %</i>	<i>CEN, %</i>	<i>HEM, %</i>	<i>CEL, %</i>	<i>LIG, %</i>
Ref. 1	---	10,5	3,5	23,2	30,6	20,9
HEP-1	0	7,9	3,1	25,0	36,3	23,4
HEP-2	1	7,3	3,0	23,1	37,5	25,0
HEP-3	2	6,7	3,1	21,9	38,0	25,1
HEP-4	3	8,7	2,7	21,1	38,4	26,8
HEP-5	5	5,8	2,7	20,1	40,9	26,4

TABLA IV.20
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: TIEMPO DE PRETRATAMIENTO
CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 Azúcares reductores totales

$pH = 4,8$ $T_H = 318 K$ $(E/S)_0 = 0,002$ $EC/EH = 2/1$ $d_p = 513 \mu m$

t_p , h	HEP-1	HEP-2	HEP-3	HEP-4	HEP-5
t , h	0	1	2	3	5
t , h	s , kg/m ³				
0	2,45	4,60	4,71	5,65	6,45
6	3,22	6,38	7,57		
20	3,77			10,91	11,66
24	3,81	8,75	9,46		11,76
30	4,03	9,05	10,33	12,83	
44	4,33	9,53	11,55	13,36	13,70
48	4,69	9,84	11,77	13,48	14,23

TABLA IV.21
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: TIEMPO DE PRETRATAMIENTO
CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 D-glucosa

<i>pH = 4,8 T_H = 318 K (E/S)₀ = 0,002 EC/EH = 2/1 d_p = 513 μm</i>					
	HEP-1	HEP-2	HEP-3	HEP-4	HEP-5
t _p , h	0	1	2	3	5
t, h	g, kg/m ³				
0	0,62	0,68	1,08	1,12	1,20
6	0,89	1,44	2,20	2,43	1,57
20	1,17	2,54	3,07	4,20	4,85
24	1,27	2,63	4,04	4,96	5,24
30	1,39	2,86	4,33	5,03	5,44
44	1,53	3,71	5,00	5,62	5,99
48	1,67	3,46	5,30	6,31	6,47

IV.2.3 Tamaño de partícula

Fijado el tiempo de pretratamiento a presión en 120 minutos, según el estudio realizado en la serie anterior, se realizó una nueva serie con el objeto de estudiar la influencia que sobre la hidrólisis enzimática del residuo de poda tiene el tamaño de partícula (serie HED). Los valores estudiados, junto con el resto de variables de operación, se muestran en la Tabla IV.22.

En todos los experimentos de esta serie el residuo de partida es de la misma campaña, sin embargo, la composición se ve afectada por el grado de trituración alcanzado en el residuo. Por ello, en esta serie, para cada experimento se especifica la composición del residuo de partida (Ref. 1) junto con la que resulta después del proceso de hidrólisis. Inicialmente, cabe destacar la diferencia existente entre las composiciones del residuo de partida de la fracción más fina ($d_p = 75 \mu\text{m}$) y las correspondientes a los diámetros medios de partícula de 213, 363 y 513 μm .

En las Tablas IV.22 a IV.24 aparecen los resultados obtenidos, tras los análisis correspondientes, del residuo sólido y de las muestras de hidrolizado retiradas periódicamente.

TABLA IV.22
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: TAMAÑO DE PARTÍCULA
CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO

$t_p = 2 h$		$pH = 4,8$		$T_H = 318 K$		$(E/S)_0 = 0,002$		$EC/EH = 2/1$	
$d_p, \mu m$		HUM, %	CEN, %	HEM, %	CEL, %	LIG, %			
75	Ref.1	7,6	5,1	24,6	16,5	27,4			
	HED-1	6,4	4,4	19,5	25,8	36,7			
213	Ref.1	6,7	3,7	25,2	27,5	18,7			
	HED-2	6,1	2,9	21,7	36,6	24,2			
363	Ref. 1	8,6	3,4	21,6	31,3	19,8			
	HED-3	8,0	2,7	19,1	42,0	23,6			
513	Ref. 1	10,5	3,5	23,2	30,6	20,9			
	HEP-3	6,7	3,1	21,9	38,0	25,1			

TABLA IV.23
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: TAMAÑO DE PARTÍCULA
CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 Azúcares reductores totales

$t_p = 2 \text{ h}$ $pH = 4,8$ $T_H = 318 \text{ K}$ $(E/S)_0 = 0,002$ $EC/EH = 2/1$

	HED-1	HED-2	HED-3	HEP-3
$d_p, \mu\text{m}$	75	213	363	513
t, h	$s, \text{kg/m}^3$			
0	6,83	6,19	5,47	4,71
6	9,74	8,89	7,53	7,57
20		11,04	9,98	7,93
24	12,13	11,32	10,24	9,46
30	13,83	11,72	10,51	10,33
44	13,50	12,32	11,69	11,55
48	14,48	12,97	11,10	11,77

TABLA IV.24
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: TAMAÑO DE PARTÍCULA
CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 D-glucosa

$t_p = 2 \text{ h}$ $pH = 4,8$ $T_H = 318 \text{ K}$ $(E/S)_0 = 0,002$ $EC/EH = 2/1$				
	HED-1	HED-2	HED-3	HEP-3
$d_p, \mu\text{m}$	75	213	363	513
t, h	$g, \text{kg/m}^3$			
0	1,32	1,33	1,24	1,08
6	2,74	2,83	2,13	2,20
20	4,82	4,40	3,79	3,07
24	5,00	4,70	4,35	4,04
30	5,47	4,75	4,78	4,33
44	6,30	5,76	4,67	5,00
48	7,08	5,49	5,19	5,30

IV.2.4 Concentración de enzimas

También se ha estudiado la influencia que pueda tener, en la hidrólisis enzimática, la cantidad total de enzimas en disolución (celulasas y hemicelulasas). Para ello se han realizado dos series de experimentos, una primera en la que se ha modificado la relación entre las enzimas totales y el sustrato presente, y una segunda en la que manteniendo constante la relación enzima/sustrato se ha modificado la relación entre las enzimas.

IV.2.4.1 Relación enzima/sustrato

Con el objetivo de estudiar la influencia de la relación enzima/sustrato al inicio del experimento, se ha realizado una serie en la que se ha modificado la relación entre los enzimas totales adicionados a la suspensión y el residuo sólido presente (serie HEE/S). La relación enzima sustrato se ha modificado en el intervalo 0,00-0,01 y el resto de variables de operación se han mantenido constantes en los siguientes valores: tiempo de pretratamiento, 2 h; pH, 4,8; temperatura de hidrólisis, 318 K; relación celulasas/hemicelulasas, 2; diámetro medio de partícula, 513 μm .

En las Tablas IV.25 a IV.27 se muestran los resultados obtenidos en la caracterización del residuo sólido y de los hidrolizados retirados periódicamente.

TABLA IV.25
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: RELACIÓN ENZIMA/SUSTRATO
CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO

$t_p = 2 h$	$pH = 4,8$	$T_H = 318 K$	$EC/EH = 2/1$	$d_p = 513 \mu m$		
	$(E/S)_0$	HUM, %	CEN, %	HEM, %	CEL, %	LIG, %
Ref. 1	---	10,5	3,5	23,2	30,6	20,9
HEE/S-1	0,000	7,4	3,3	21,4	40,1	21,7
HEP-3	0,002	6,7	3,1	21,7	39,0	24,9
HEE/S-3	0,005	6,7	2,8	20,0	39,9	25,4
HEE/S-4	0,010	7,7	2,6	21,1	40,9	23,8

TABLA IV.26
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: RELACIÓN ENZIMA/SUSTRATO
CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 Azúcares reductores totales

<i>t_p = 2 h pH = 4,8 T_H = 318 K EC/EH = 2/1 d_p = 513 μm</i>				
	HEE/S-1	HEP-3	HEE/S-3	HEE/S-4
(E/S) ₀	0,000	0,002	0,005	0,010
t, h	s, kg/m ³			
0	6,24	4,71	6,26	3,69
6	6,30	7,57	9,65	7,24
20	6,08		11,27	8,88
24		9,46	12,22	9,46
30	6,71	10,33		10,53
44	7,11	11,55	12,79	11,74
48	7,08	11,77	13,48	

TABLA IV.27
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: RELACIÓN ENZIMA/SUSTRATO
 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 D-glucosa

$t_p = 2 \text{ h}$	$pH = 4,8$	$T = 318 \text{ K}$	$EC/EH = 2/1$	$d_p = 513 \mu\text{m}$
	HEE/S-1	HEP-3	HEE/S-3	HEE/S-4
$(E/S)_0$	0,000	0,002	0,005	0,010
t, h	g, kg/m ³			
0	0,91	1,08	1,17	1,07
6	0,92	2,20	3,45	3,17
20	1,03	3,07	4,58	4,64
24	1,17	4,04	4,87	4,76
30	1,20	4,33	4,88	5,45
44	1,24	5,00	5,78	7,62
48	1,25	5,30	5,95	7,75

IV.2.4.2 Relación celulasas/hemicelulasas

Con objeto de incrementar el rendimiento posterior de la hidrólisis, se ha sometido el residuo a un mayor tiempo de pretratamiento en autoclave, fijándose éste en 3 horas.

Tras estudiar la relación enzima/sustrato se procedió a analizar, fijando la cantidad total de enzimas, la influencia de la relación entre las enzimas empleadas (celulasas y hemicelulasas).

Empleando un valor de $(E/S)_0$ de 0,002 g/g, se modificó la relación celulasas/hemicelulasas en los valores que se encuentran tabulados en la Tabla IV.28, (serie HEC/H). En dicha tabla también se indican los valores seleccionados para el resto de variables de operación.

En las Tablas IV.28 a IV.30 se muestran la composición de los residuos sólidos obtenidos al final del proceso de hidrólisis y la concentración en azúcares reductores totales y D-glucosa de las diferentes muestras de hidrolizado retiradas en el transcurso de cada experimento.

TABLA IV.28
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: RELACIÓN CELULASAS/HEMICELULASAS
CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO

<i>t_p = 3 h</i>	<i>pH = 4,8</i>	<i>T_H = 318 K</i>	<i>(E/S)₀ = 0,002</i>	<i>d_p = 513 μm</i>		
	EC/EH	HUM, %	CEN, %	HEM, %	CEL, %	LIG, %
Ref. 1	---	10,5	3,5	23,2	30,6	20,9
HEC/H-1	2/0	7,6	2,2	24,0	35,5	29,2
HEC/H-2	3/1	7,5	2,2	18,2	39,2	28,5
HEP-4	2/1	8,7	2,7	21,1	38,4	26,8
HEC/H-3	1/1	7,2	2,5	21,5	39,9	27,0
HEC/H-4	0/2	6,0	2,8	20,8	40,3	26,5

TABLA IV.29
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: RELACIÓN CELULASAS/HEMICELULASAS
 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 Azúcares reductores totales

$t_p = 3 h$ $pH = 4,8$ $T_H = 318 K$ $(E/S)_0 = 0,002$ $d_p = 513 \mu m$					
	HEC/H-1	HEC/H-2	HEP-4	HEC/H-3	HEC/H-4
EC/EH	2/0	3/1	2/1	1/1	0/2
t, h	s, kg/m ³				
0	5,85	5,29	5,65	5,76	6,70
6	8,38			7,97	9,18
20		10,46	10,91	10,65	9,97
24	9,91	10,62		10,63	
30	10,24	10,90	12,83	11,58	9,79
44	10,55	11,68	13,36	12,68	
48	11,20	11,57	13,48	12,80	10,14

TABLA IV.30
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: RELACIÓN CELULASAS/HEMICELULASAS
 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO

D-glucosa

<i>t_p = 3 h pH = 4,8 T_H = 318 K (E/S)₀ = 0,002 d_p = 513 μm</i>					
	HEC/H-1	HEC/H-2	HEP-4	HEC/H-3	HEC/H-4
EC/EH	2/0	3/1	2/1	1/1	0/2
t, h	g, kg/m ³				
0	0,91	0,90	1,12	1,24	0,95
6	1,85	1,80	2,43	2,44	2,07
20	3,22	3,40	4,20	4,54	3,72
24	3,31	3,57	4,96	4,57	3,60
30	3,72	4,44	5,03	5,08	4,35
44	4,16	5,12	5,62	5,31	4,02
48	5,33	5,10	6,31	5,51	4,35

IV.2.5 pH de operación

Con objeto de estudiar la influencia que sobre la hidrólisis enzimática del residuo de poda tiene el pH de la disolución se ha modificado éste entre 2,5 y 5,5, valores suficientemente distanciados del máximo de actividad del enzima (serie HEpH). En la Tabla IV.31 se muestran los valores de pH estudiados y los de las restantes variables de operación fijadas.

Al igual que en todos los casos anteriores también se ha determinado la composición del residuo sólido de todos los experimentos de hidrólisis, Tabla IV.31. Asimismo, se han analizado todas las muestras de hidrolizado retiradas del reactor para determinar el contenido en azúcares reductores totales y en D-glucosa, Tablas IV.32 y IV.33, respectivamente.

TABLA IV.31
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: pH
 CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO

$t_p = 3 h$	$T = 318 K$	$(E/S)_0 = 0,002$	$EC/EH = 2/1$	$d_p = 513 \mu m$		
	pH	HUM, %	CEN, %	HEM, %	CEL, %	LIG, %
Ref. 2	---	5,6	3,1	21,9	24,5	21,2
HEpH-1	2,5	9,2	2,4	23,7	36,8	27,8
HEpH-2	3,5	7,5	2,5	20,6	40,6	24,1
HEpH-3	4,0	7,5	2,6	22,3	39,5	23,8
HEpH-4	4,4	8,7	2,6	22,1	37,6	26,8
HEP-4 (Ref. 1)	4,8	8,7	2,6	21,1	39,5	26,8
HEpH-5	5,5	5,0	2,5	21,2	40,9	24,6

TABLA IV.32
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: pH
 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 Azúcares reductores totales

<i>t_p = 3 h T_H = 318 K (E/S)₀ = 0,002 EC/EH = 2/1 d_p = 513 μm</i>						
	HEpH-1	HEpH-2	HEpH-3	HEpH-4	HEP-4	HEpH-5
pH	2,5	3,5	4,0	4,4	4,8	5,5
t, h	s, kg/m ³					
0	7,77	6,03	6,23	6,39	5,65	7,44
6	9,12	7,67		9,49		9,38
20	10,49	8,80	10,10		10,91	
24	10,76	9,06	11,18			10,93
30	11,47	9,33	11,33		12,83	11,24
44	12,10	10,24	11,78	13,10	13,36	11,51
48	12,27	10,79	13,01	13,99	13,48	11,90

TABLA IV.33
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: pH
 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 D-glucosa

<i>t_p = 3 h T_H = 318 K (E/S)₀ = 0,002 EC/EH = 2/1 d_p = 513 μm</i>						
	HEpH-1	HEpH-2	HEpH-3	HEpH-4	HEP-4	HEpH-5
pH	2,5	3,5	4,0	4,4	4,8	5,5
t, h	g, kg/m ³					
0	1,06	0,77	0,86	1,06	1,12	1,19
6	1,57	1,30	1,44	1,89	2,43	2,03
20	2,12	2,59	2,59	2,74	4,20	3,19
24	2,20	2,84	3,04	2,82	4,96	3,40
30	2,28	2,78	3,48	2,98	5,03	3,80
44	2,63	3,06	3,48	4,19	5,62	4,09
48	3,00	3,42	3,81	4,54	6,31	4,22

IV.2.6 Temperatura de hidrólisis

Seleccionado el tiempo de pretratamiento con vapor en 180 minutos, en la serie HET se varió la temperatura de hidrólisis desde 303 hasta 333 K, lo cual va a permitir estudiar cómo afecta esta variable a la hidrólisis enzimática del residuo de poda de olivo, Tablas IV.34 a IV.36.

TABLA IV.34
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: TEMPERATURA
CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO

$t_p = 3 h$	$pH = 4,8$	$(E/S)_0 = 0,002$	$EC/EH = 2/1$	$d_p = 513 \mu m$		
	T_H, K	HUM, %	CEN, %	HEM, %	CEL, %	LIG, %
Ref. 2	---	5,6	3,1	21,9	24,5	21,2
HET-1	303	5,3	3,0	23,5	39,6	23,8
HET-2	308	7,0	2,5	24,5	38,4	24,4
HET-3	313	7,7	2,5	21,3	39,4	23,4
HEP-4	318	8,7	2,7	21,1	38,4	26,8
HET-4	323	9,1	2,4	23,0	38,3	24,7
HET-5	328	7,0	2,2	25,4	36,5	25,7
HET-6	333	6,4	2,2	24,6	38,0	23,8

TABLA IV.35
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: TEMPERATURA
 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 Azúcares reductores totales

$t_p = 3 h$	$pH = 4,8$	$(E/S)_0 = 0,002$	$EC/EH = 2/1$	$d_p = 513 \mu m$			
	HET-1	HET-2	HET-3	HEP-4	HET-4	HET-5	HET-6
T_H, K	303	308	313	318	323	328	333
t, h	s, kg/m ³						
0	4,65	6,70	7,19	5,65	7,61	7,52	8,06
6		10,63	9,34			8,97	
20	6,59	12,89		10,91	11,74	9,35	10,48
24	6,89	13,97	11,37	10,58	12,04	9,86	10,87
30	7,18		11,96	12,83	12,38	9,50	10,97
44	10,68		12,33	13,36	13,05	9,55	12,15
48	10,76		13,26	13,48	13,58	9,59	12,23

TABLA IV.36
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: TEMPERATURA
 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO
 D-glucosa

$t_p = 3 \text{ h}$	$pH = 4,8$	$(E/S)_0 = 0,002$	$EC/EH = 2/1$	$d_p = 513 \mu\text{m}$			
	HET-1	HET-2	HET-3	HEP-4	HET-4	HET-5	HET-6
T_{Hb}, K	303	308	313	318	323	328	333
t, h	g, kg/m^3						
0	0,71	0,89	1,15	1,12	1,07	1,06	1,31
6	1,13	2,24	1,79	2,43	2,02	1,69	1,65
20	1,30	2,62	3,16	4,20	3,56	1,75	1,92
24	1,48	2,68	3,38	4,96	3,48	2,04	2,71
30	1,69	3,33	3,34	5,03	3,83	2,01	2,63
44	3,02	3,39	4,04	5,62	4,08	2,54	3,12
48	3,10	3,50	3,88	6,31	4,20	2,73	3,26

IV.3 FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS

Todos los hidrolizados, procedentes de las hidrólisis que se indican a continuación, se han fermentado con la levadura no tradicional *Pachysolen tannophilus*; el volumen del medio de cultivo en el biorreactor ha sido 750 cm³, la velocidad de agitación 750 rpm, la temperatura de 303 K y el pH 3,5 para hidrolizados ácidos y 4,5 para los enzimáticos. La aireación del medio se realiza por difusión a través del vórtice que se obtiene al agitar la disolución en la instalación experimental descrita en el Apartado III.1.2. Estas condiciones fueron seleccionadas en experimentos previos, concretamente en la fermentación de mezclas de D-glucosa/D-xilosa con *P. tannophilus* con vista a la producción de etanol (Sánchez *et al.*, 1999 y Sánchez *et al.*, 2002).

IV.3.1 Hidrolizados ácidos

IV.3.1.1 Ácido sulfúrico

Dado que como objetivo final del proceso experimental se ha fijado la producción de etanol y otros bioproductos, con el fin de estudiar la influencia del proceso de hidrólisis, se han realizado dos series de experimentos de fermentación de hidrolizados con ácido sulfúrico en los que se ha modificado la concentración del mismo (experimentos FS1 a FS5) y la temperatura de hidrólisis (experimentos FS3 y FS6 a FS8).

Las concentraciones de ácido estudiadas han sido 0,5, 0,75, 1, 2 y 4 N a la temperatura de 363 K y las temperatura de 343, 353, 363 y 373 K a la concentración de ácido 1 N. El resto de variables de hidrólisis han sido: 240 minutos, 150 rpm, volumen de disolución variable entre 1 y 2 L y relación líquido/sólido (v/p) 10/1.

Las Tablas IV.37 a IV.41 recogen los resultados de fermentar la serie de hidrólisis en la que se ha modificado la concentración de ácido sulfúrico empleado; en las Figuras IV.1 a IV.5 se han representado dichos resultados.

Cabe destacar, en los experimentos de esta serie, que las concentraciones máximas de biomasa alcanzadas son inferiores a 2 kg/m³. En todos los casos, se observa un consumo total de D-glucosa, mientras que a pesar de un prolongado tiempo de cultivo los azúcares reductores totales no se llegan a consumir en ninguno de los experimentos. También cabe señalar que en el cultivo FS4 se parte de una concentración elevada de azúcares, del orden de 42 kg/m³, mientras en los restantes experimentos de la serie, los valores de s_0 son inferiores

a 27 kg/m³. El mayor nivel de etanol, próximo a 5 kg/m³, se alcanza en el cultivo FS3 que corresponde a un hidrolizado obtenido con una concentración de ácido sulfúrico 1 N. Las máximas concentraciones de xilitol se sitúan por debajo de 0,5 kg/m³.

En las Tablas IV.42 a IV.44 se han incluido los resultados correspondientes a la serie de temperaturas y en las Figuras IV.6 a IV.8 se han representado. Debe indicarse que el experimento a 363 K (FS3) es el mismo que corresponde en la serie anterior a la concentración de ácido sulfúrico 1 N (Tabla IV.39 y Fig. IV.3).

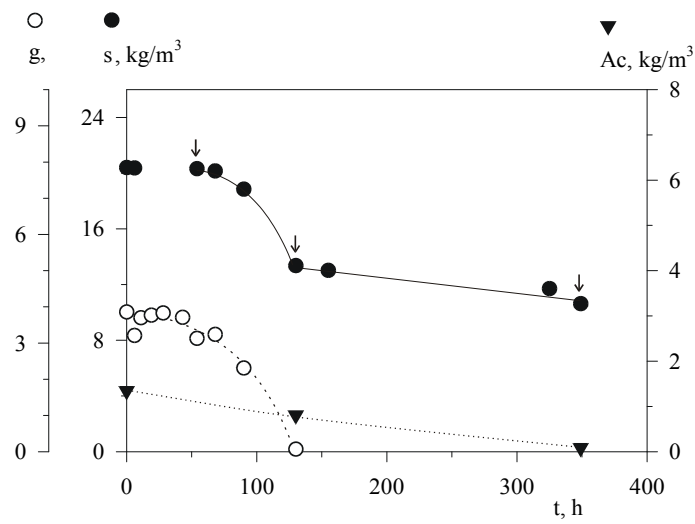
Igualmente, cabe destacar que en la Tabla IV.44, correspondiente a la fermentación del hidrolizado obtenido a la temperatura de 373 K, no se apreciaba, en una primera etapa, variación en la composición de azúcares reductores totales, por lo que se optó por diluir la mezcla añadiendo 0,2 L de agua pura. Al realizar la dilución todos los resultados se vieron afectados por lo cual y de cara a la interpretación posterior, se ha considerado este momento como tiempo cero del experimento, desechando todos los resultados anteriores.

En esta serie de experimentos, al igual que en la anterior, se inicia el cultivo con una concentración de biomasa próxima a 0,1 kg/m³ y se observa, de forma excepcional, que en la fermentación del hidrolizado obtenido a 353 K, el nivel de biomasa alcanzado es muy alto, próximo a 2,8 kg/m³. De igual forma, D-glucosa es consumida en su totalidad, mientras que al final de los cultivos y después de tiempos prolongados, quedan del orden de 5 kg/m³ de azúcares reductores totales sin consumir. Las concentraciones máximas de etanol y xilitol son inferiores a 5 y 0,5 kg/m³, respectivamente. Cabe señalar, que el ácido acético también es asimilado por la levadura en el transcurso de los experimentos.

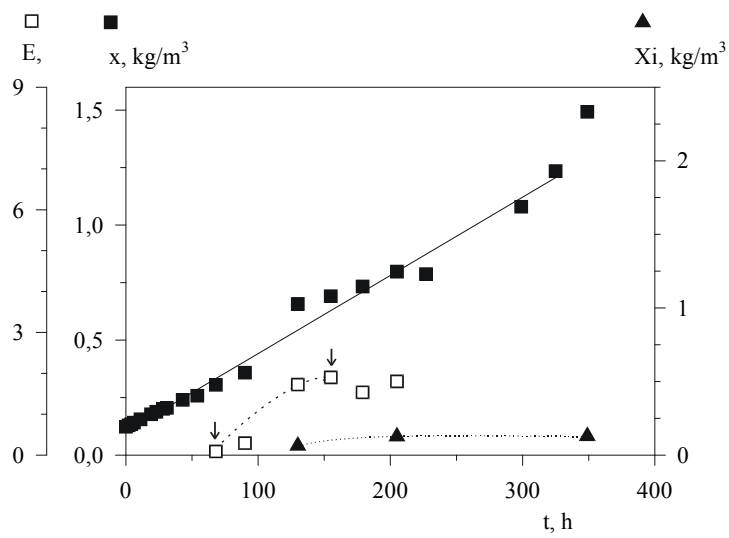
TABLA IV.37
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON H₂SO₄
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto: FSI $C_A = 0,5 N$

t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,123	20,40	3,86	1,343		
2	0,129					
4	0,134					
6	0,141	20,37	3,21			
11	0,155		3,70			
19	0,177		3,77			
23	0,188					
28	0,201		3,83			
31	0,205					
43	0,240		3,71			
54	0,258	20,32	3,13			
68	0,305	20,16	3,24		0,090	
90	0,358	18,85	2,31		0,291	
130	0,657	13,36	0,07	0,805	1,725	0,063
155	0,691	13,02			1,898	
179	0,733				1,534	
205	0,798				1,801	0,127
227	0,787					
299	1,080					
325	1,235	11,71				
349	1,493	10,63		0,086		0,129



(a)



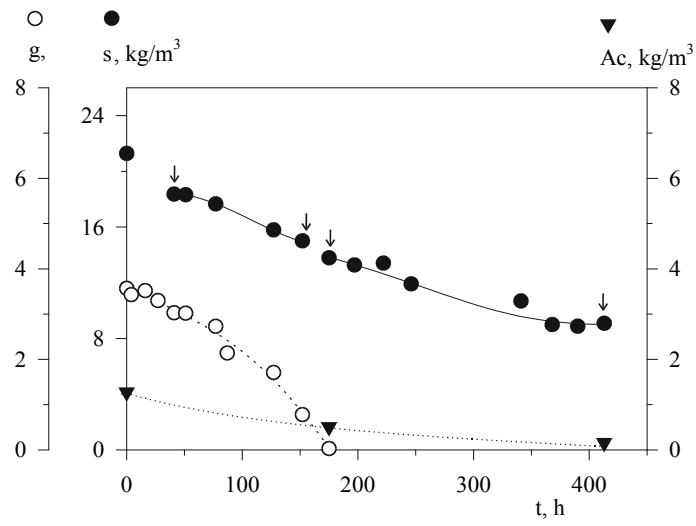
(b)

Fig. IV.1 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FS1:
a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
b) Biomasa, etanol y xilitol

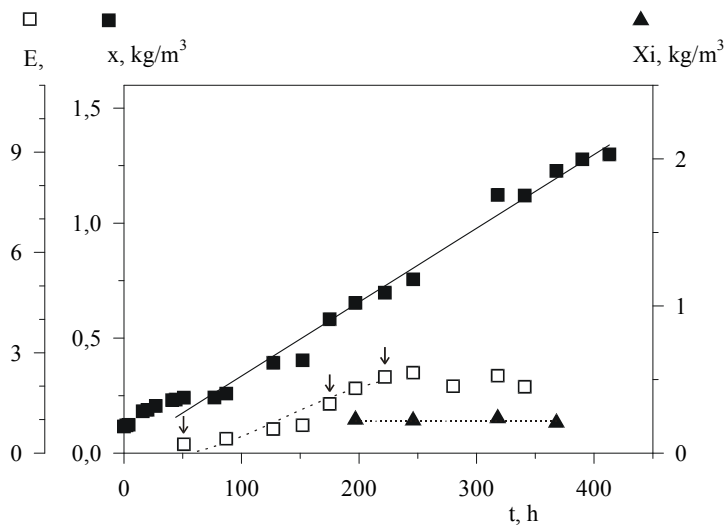
TABLA IV.38
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON H₂SO₄
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

*Expto: FS2**C_A = 0,75 N*

t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,116	21,29	3,57	1,275		
2	0,121					
4	0,123		3,43			
16	0,182		3,52			
20	0,188					
27	0,205		3,30			
41	0,230	18,37	3,03			
44	0,233					
51	0,241	18,32	3,02		0,266	
77	0,242	17,66	2,73			
87	0,259		2,14		0,432	
127	0,393	15,80	1,71		0,720	
152	0,404	15,01	0,78		0,835	
175	0,582	13,79	0,03	0,506	1,473	
197	0,653	13,28			1,938	0,227
222	0,698	13,41			2,276	
246	0,756	11,92			2,406	0,221
280					1,999	
318	1,123				2,314	0,237
341	1,120	10,69			1,985	
368	1,227	9,00				0,206
390	1,278	8,88				
413	1,299	9,09		0,159		



(a)



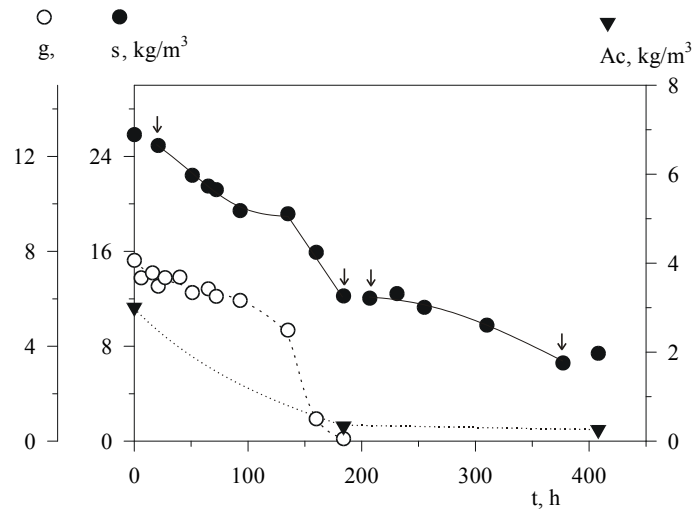
(b)

Fig. IV.2 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FS2:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

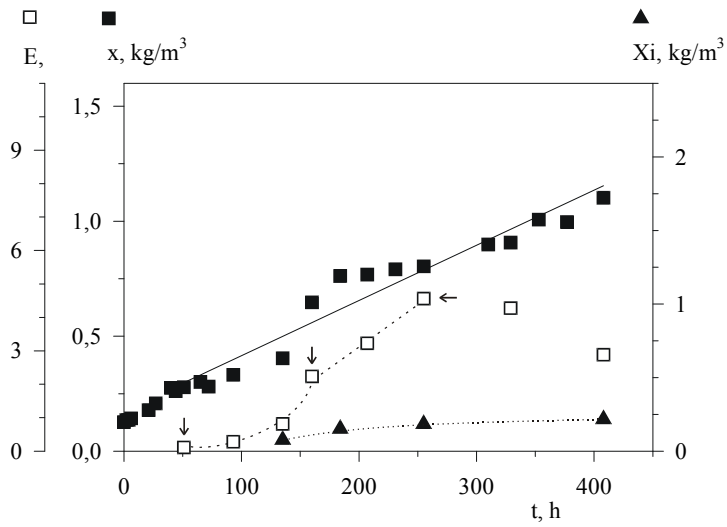
TABLA IV.39
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON H₂SO₄
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto: FS3 $C_A = 1 N$

t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,127	25,83	7,62	3,004		
2	0,136					
4	0,136					
6	0,143		6,88			
16			7,09			
21	0,179	24,91	6,53			
27	0,208		6,89			
40	0,275		6,91			
44	0,261					
51	0,278	22,40	6,26		0,115	
65	0,301	21,49	6,42			
72	0,281	21,19	6,10			
93	0,332	19,43	5,93		0,288	
135	0,404	19,16	4,68		0,851	0,077
160	0,647	15,91	0,94		2,346	
184	0,762	12,24	0,10	0,335		0,152
207	0,768	12,05			3,439	
231	0,791	12,43				
255	0,804	11,28			4,945	0,185
310	0,899	9,78				
329	0,907				4,761	
353	1,007					
377	0,997	6,59				
408	1,102	7,40		0,258	3,312	0,217



(a)



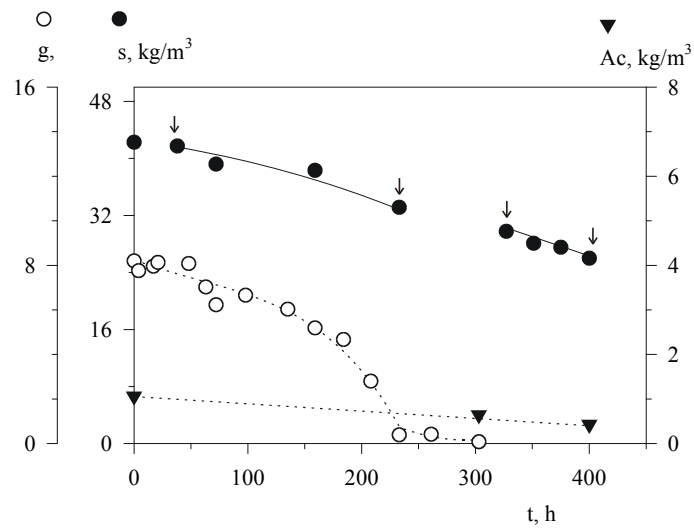
(b)

Fig. IV.3 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FS3:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

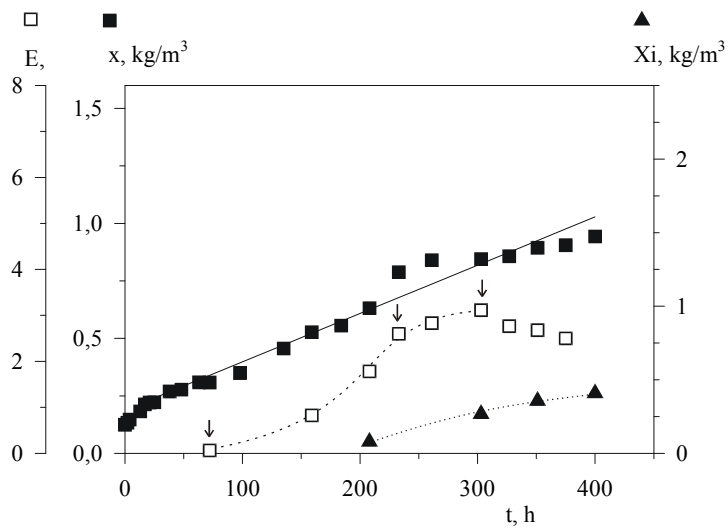
TABLA IV.40
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON H₂SO₄
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto: FS4 $C_A = 2 N$

t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,124	42,26	8,20	1,059		
2	0,133					
4	0,147		7,76			
13	0,182					
17	0,213		7,96			
21	0,221		8,13			
25	0,222					
38	0,269	41,73				
48	0,277		8,08			
63	0,309		7,03			
72	0,308	39,19	6,23		0,062	
98	0,349		6,66			
135	0,456		6,03			
159	0,527	38,32	5,19		0,823	
184	0,555		4,67			
208	0,631		2,80		1,781	0,079
233	0,788	33,13	0,39		2,601	
261	0,840		0,42		2,831	
303	0,845		0,08	0,640	3,113	0,267
327	0,857	29,77			2,764	
351	0,894	28,10			2,677	0,356
375	0,905	27,53			2,500	
400	0,943	26,00		0,426		0,408



(a)



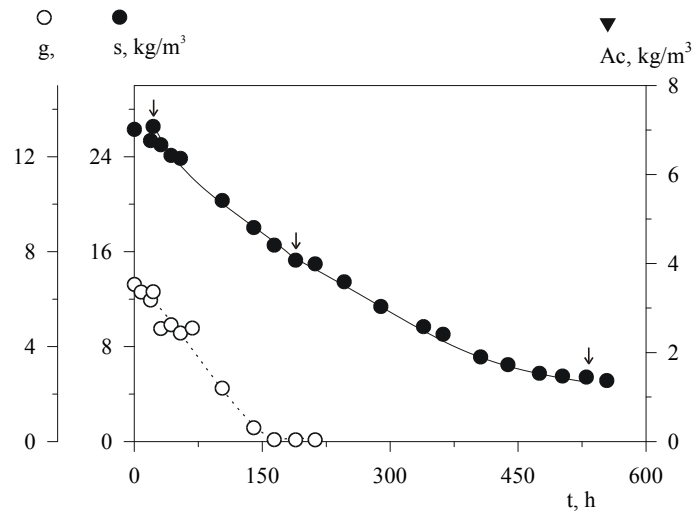
(b)

Fig. IV.4 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FS4:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

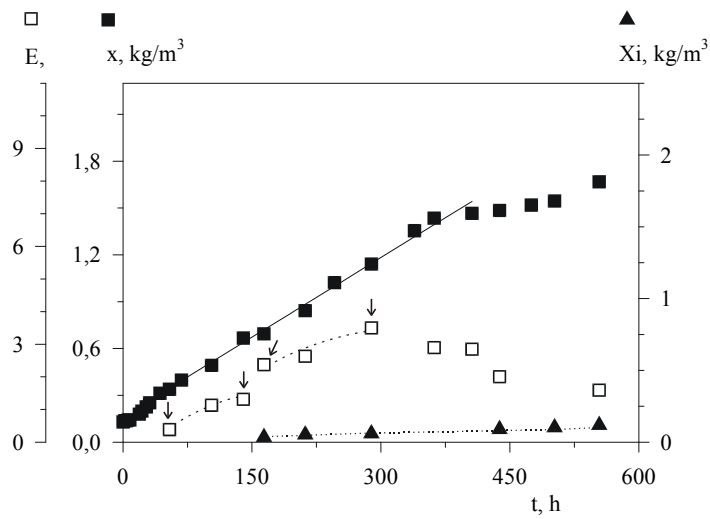
TABLA IV.41
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON H₂SO₄
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto: FS5 $C_A = 4 N$

t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,130	26,30	6,62			
2	0,137					
4	0,137					
6	0,142					
8	0,142		6,30			
19	0,179	25,36	5,96			
22	0,199	26,55	6,31			
27	0,226					
31	0,252	25,01	4,76			
43	0,313	24,11	4,92			
54	0,339	23,86	4,57		0,386	
68	0,398		4,78			
103	0,492	20,31	2,25		1,129	
140	0,667	18,03	0,58		1,312	
164	0,694	16,55	0,08		2,374	0,035
189		15,28	0,07			
212	0,843	14,97			2,633	0,052
246	1,022	13,46				
289	1,141	11,38			3,500	0,060
339	1,355	9,68				
362	1,435	9,04			2,897	
406	1,466	7,13			2,849	
438	1,484	6,48			2,005	0,090
475	1,519	5,75				
502	1,545	5,52				0,102
530		5,43				
554	1,668	5,14			1,591	0,118



(a)



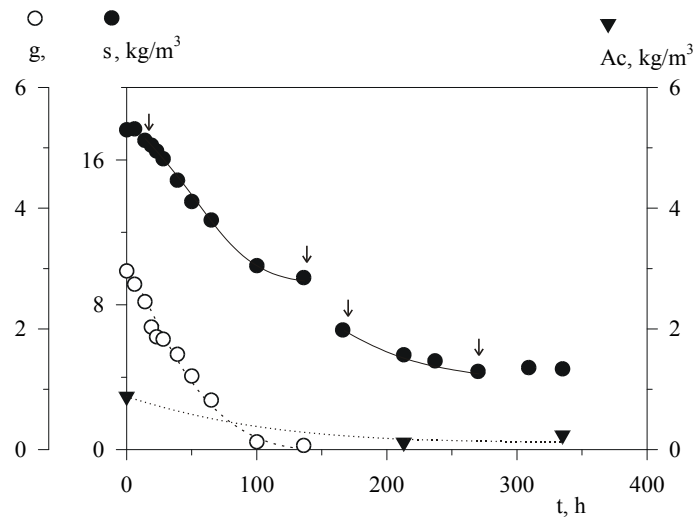
(b)

Fig. IV.5 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FS5:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

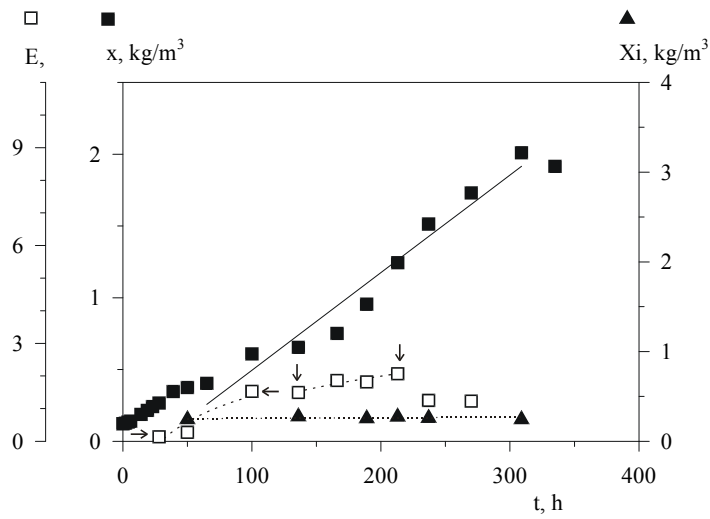
TABLA IV.42
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON H₂SO₄
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto: FS6 $T_H = 343 K$

t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,122	17,66	2,96	0,879		
2	0,126					
4	0,133					
6	0,140	17,71	2,74			
14	0,187	17,08	2,45			
19	0,215	16,81	2,03			
23	0,242	16,49	1,87			
28	0,266	16,06	1,83		0,138	
39	0,346	14,88	1,58			
50	0,375	13,70	1,22		0,276	0,243
65	0,403	12,68	0,82			
100	0,608	10,16	0,13		1,529	
136	0,654	9,50	0,07		1,495	0,275
166	0,751	6,61			1,863	
189	0,955				1,817	0,253
213	1,244	5,24		0,120	2,070	0,273
237	1,513	4,90			1,254	0,258
270	1,730	4,32			1,231	
309	2,010	4,53				0,243
335	1,915	4,46		0,239		



(a)



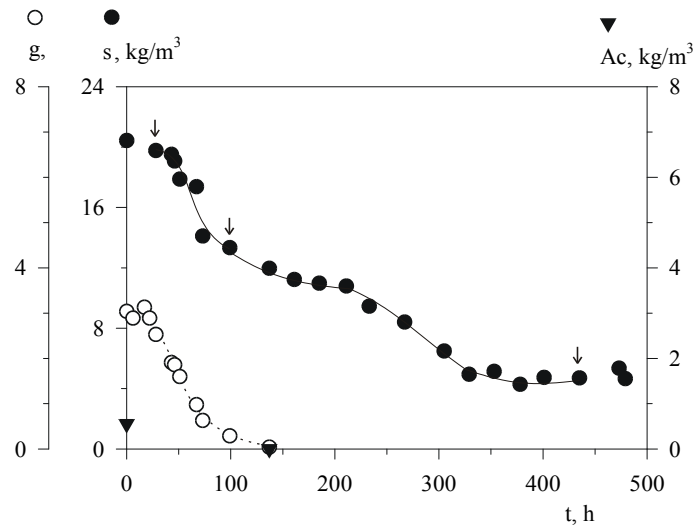
(b)

Fig. IV.6 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FS6:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

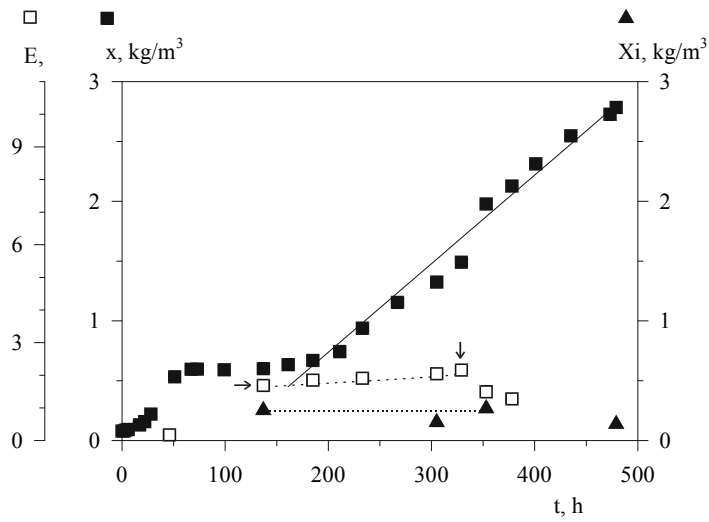
TABLA IV.43
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON H₂SO₄
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto: FS7 $T_H = 353 K$

t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,079	20,44	3,04	0,555		
2	0,081					
4	0,089					
6	0,092		2,89			
17	0,131		3,13			
22	0,158		2,89			
28	0,221	19,77	2,53			
43		19,52	1,91			
46		19,08	1,86		0,178	
51	0,533	17,88	1,60			
67	0,596	17,38	0,98			
73	0,597	14,11	0,63			
99	0,592	13,34	0,29			
137	0,601	11,97	0,04	0,000	1,690	0,253
161	0,635	11,23				
185	0,669	10,98			1,850	
211	0,744	10,80				
233	0,939	9,46			1,909	
267	1,155	8,41				
305	1,325	6,49			2,047	0,152
329	1,490	4,95			2,162	
353	1,977	5,14			1,495	0,268
378	2,127	4,28			1,277	
401	2,312	4,74				
435	2,547	4,71				
473	2,727	5,35				
479	2,784	4,66				0,138



(a)



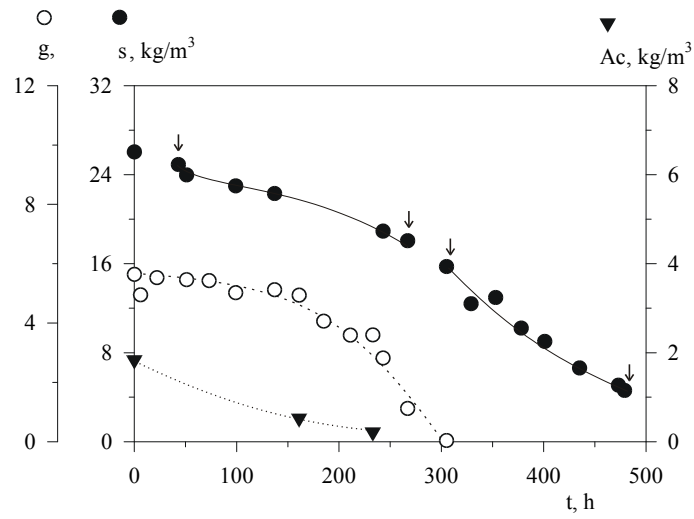
(b)

Fig. IV.7 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FS7:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

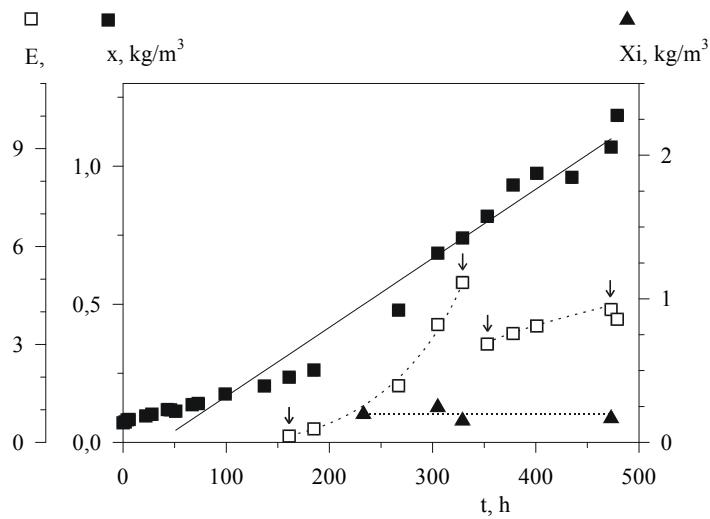
TABLA IV.44
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON H₂SO₄
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto: FS8 $T_H = 373 K$

t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,071	26,04	5,64	1,835		
2	0,074					
4	0,082					
6	0,083		4,95			
17			5,93			
22	0,096		5,53			
28	0,102		5,69			
43	0,119	24,91	5,87			
46	0,118					
51	0,113	23,98	5,46			
67	0,137		5,68			
73	0,141		5,43			
99	0,175	22,99	5,02			
137	0,204	22,30	5,12			
161	0,236		4,94	0,524	0,193	
185	0,262		4,06		0,412	
211			3,59			
233			3,60	0,214		0,196
243		18,92	2,82			
267	0,479	18,06	1,12		1,737	
305	0,685	15,74	0,04		3,611	0,245
329	0,740	12,40			4,899	0,151
353	0,819	12,96			3,013	
378	0,932	10,21			3,335	
401	0,974	9,01			3,565	
435	0,960	6,62				
473	1,069	5,08			4,071	0,167
479	1,184	4,60			3,772	



(a)



(b)

Fig. IV.8 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FS8:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

IV.3.1.2 Ácido fosfórico

En este apartado se muestran los resultados de la fermentación de hidrolizados obtenidos con ácido fosfórico. La utilización de este ácido en la hidrólisis puede suponer una cierta ventaja en relación con otros agentes hidrolíticos ya que es nutriente en la posterior fermentación que se realiza.

Se trata de analizar la influencia de la concentración de ácido fosfórico, en la hidrólisis de residuo de poda de olivo, sobre la posterior fermentación. Se han empleado las concentraciones de 0,3, 0,5, 0,75, 1, 2 y 8 N. Las variables, tanto de hidrólisis como de fermentación, son las mismas que en las series de ácido sulfúrico.

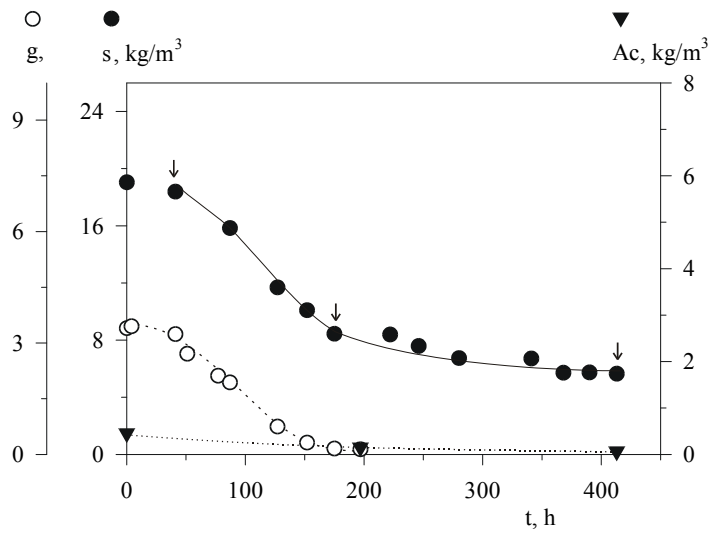
Los resultados obtenidos de las diferentes fermentaciones realizadas en esta serie se muestran en las Tablas IV.45 a IV.50 y se han representado en las Figuras IV.9 a IV.14, respetando el orden creciente de concentración. En ellas puede observarse, en el transcurso del tiempo, el consumo de sustrato y D-glucosa, la formación de biomasa y bioproductos tales como etanol y xilitol.

En los experimentos de esta serie (FP1 a FP6) se ha partido de concentraciones en azúcares reductores totales que han oscilado en el rango de 14 a 22 kg/m³. Las concentraciones de inóculo en el cultivo están en el rango 0,12-0,15 kg/m³; con estas concentraciones iniciales de azúcares y biomasa, en general, se observa que la concentración de biomasa formada al final de los cultivos es mayor que la obtenida en los hidrolizados de ácido sulfúrico. También en este caso las concentraciones de D-glucosa se consumen por *P. tannophilus* en su totalidad, mientras que al final del experimento queda sin asimilar un porcentaje alto de azúcares. La mayor concentración de etanol, del orden de 5 kg/m³, se obtiene en el cultivo FP2, procedente de una hidrólisis realizada con H₃PO₄ 0,5 N. Cabe destacar, que las concentraciones de xilitol determinadas son, en todos los casos, inferiores a 0,1 kg/m³. Las concentraciones de ácido acético al comienzo del experimento son inferiores a 1 kg/m³ y también en este caso es consumido por la levadura en el transcurso del bioproceso.

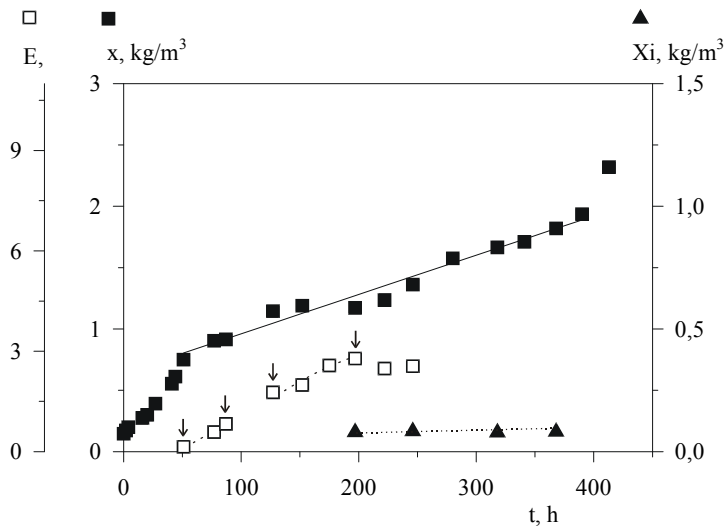
TABLA IV.45
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON H₃PO₄
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto: FPI $C_A = 0,3 N$

t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,146	19,04	3,40	0,457		
2	0,173					
4	0,199		3,45			
16	0,275					
20	0,300					
27	0,391					
41	0,553	18,39	3,24			
44	0,612					
51	0,750		2,71		0,144	
77	0,904		2,12		0,587	
87	0,915	15,84	1,94		0,828	
127	1,146	11,69	0,75		1,771	
152	1,189	10,09	0,32		1,990	
175		8,44	0,16		2,576	
197			0,14	0,150	2,783	0,079
222	1,236	8,39			2,484	
246	1,362	7,59			2,553	0,083
280	1,576	6,74				
318	1,665					0,078
341	1,710	6,71				
368	1,819	5,72				0,081
390	1,936	5,74				
413	2,319	5,65		0,065		



(a)



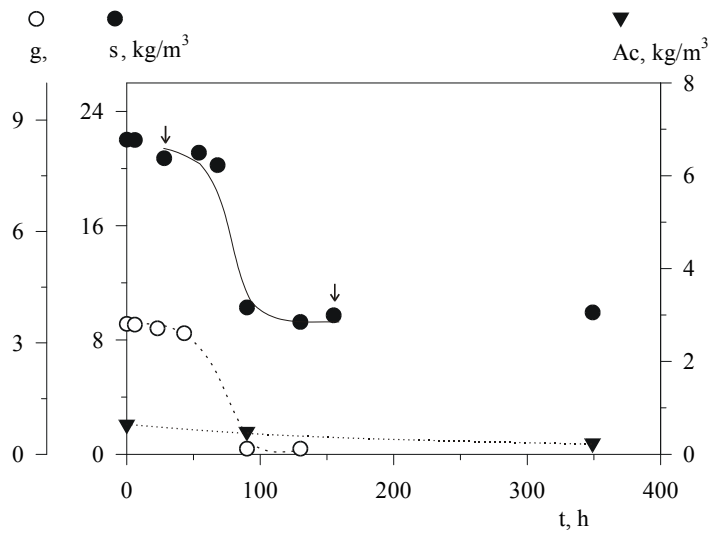
(b)

Fig. IV.9 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FP1:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

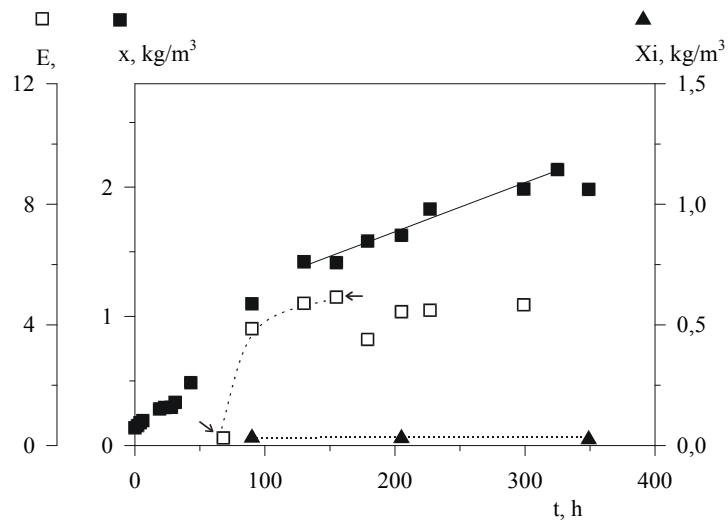
TABLA IV.46
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON H₃PO₄
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto: FP2 $C_A = 0,5 N$

t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,137	22,02	3,51	0,638		
2	0,155					
4	0,177					
6	0,193	22,00	3,49			
11						
19	0,284					
23	0,295		3,39			
28	0,296	20,72				
31	0,334					
43	0,487		3,26			
54		21,11				
68		20,24			0,253	
90	1,097	10,28	0,15	0,483	3,875	0,032
130	1,422	9,26	0,15		4,715	
155	1,415	9,73			4,922	
179	1,582				3,519	
205	1,627				4,439	0,030
227	1,830				4,485	
299	1,985				4,669	
325	2,136					
349	1,982	9,93		0,237		0,025



(a)



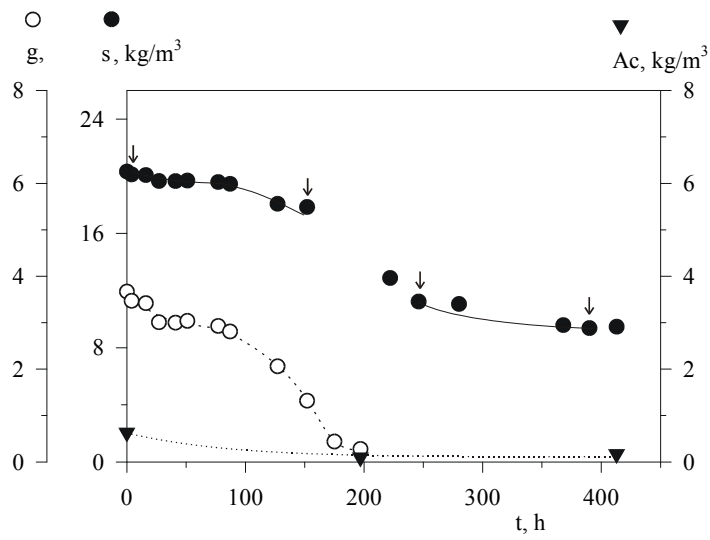
(b)

Fig. IV.10 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FP2:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

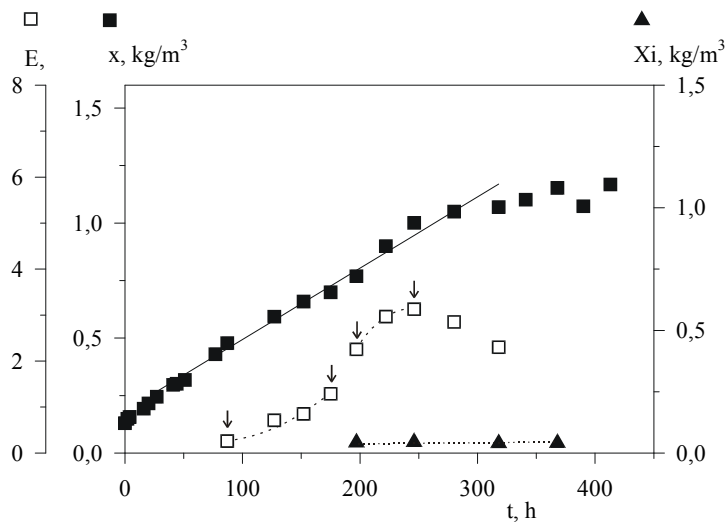
TABLA IV.47
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON H₃PO₄
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

*Expto: FP3**C_A = 0,75 N*

t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,130	20,33	3,67	0,633		
2	0,149					
4	0,157	20,13	3,47			
16	0,193	20,08	3,42			
20	0,216					
27	0,245	19,67	3,01			
41	0,297	19,66	3,00			
44	0,301					
51	0,318	19,70	3,04			
77	0,430		2,93			
87	0,478		2,81		0,259	
127	0,593	18,07	2,06		0,713	
152	0,659	17,85	1,32		0,851	
175	0,699		0,44		1,288	
197	0,769		0,28	0,098	2,254	0,043
222	0,900	12,88			2,967	
246	1,001	11,23			3,128	0,045
280	1,050	11,06			2,852	
318	1,070				2,300	0,040
341	1,102					
368	1,153	9,58				0,041
390	1,073	9,37				
413	1,168	9,47		0,168		



(a)



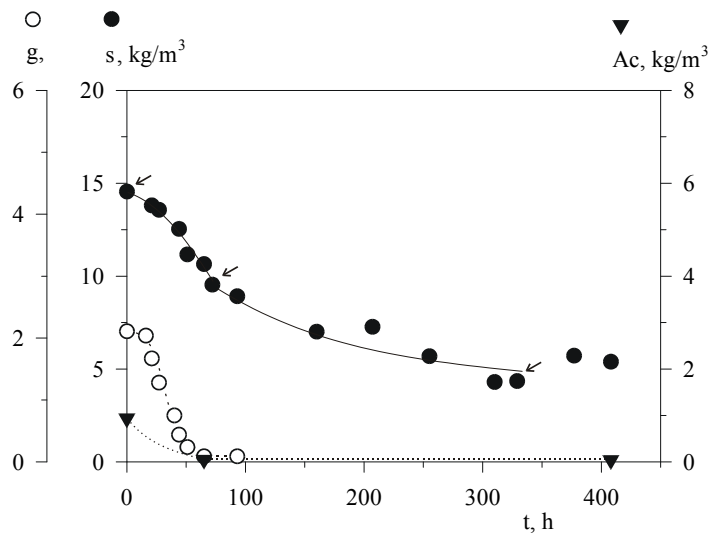
(b)

Fig. IV.11 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FP3:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

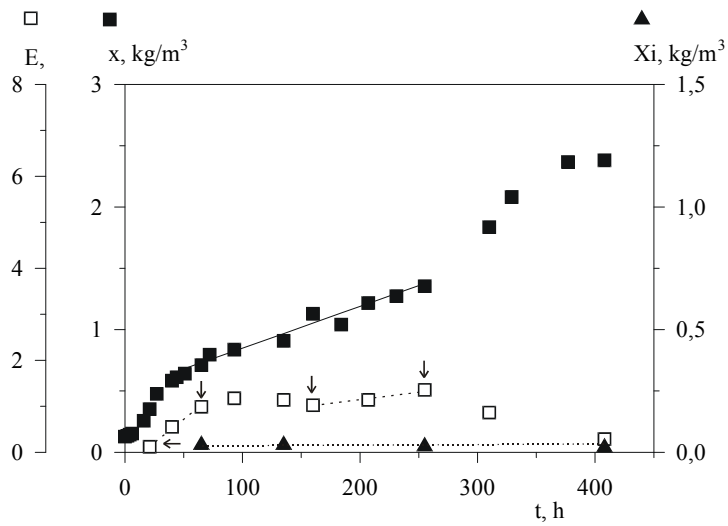
TABLA IV.48
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON H₃PO₄
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto: FP4 $C_A = 1 N$

t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,127	14,55	2,11	0,935		
2	0,134					
4	0,144					
6	0,152		2,19			
16	0,257		2,04			
21	0,352	13,81	1,67		0,121	
27	0,476	13,57	1,28			
40	0,584		0,75		0,552	
44	0,612	12,54	0,44			
51	0,642	11,17	0,24			
65	0,711	10,65	0,09	0,045	0,989	0,030
72	0,796	9,54				
93	0,837	8,92	0,09		1,173	
135	0,909				1,139	0,030
160	1,129	7,01			1,024	
184	1,041					
207	1,217	7,27			1,139	
231	1,273					
255	1,355	5,69			1,357	0,024
310	1,836	4,30			0,863	
329	2,082	4,35				
353	2,628					
377	2,367	5,72				
408	2,381	5,39		0,037	0,288	0,019



(a)



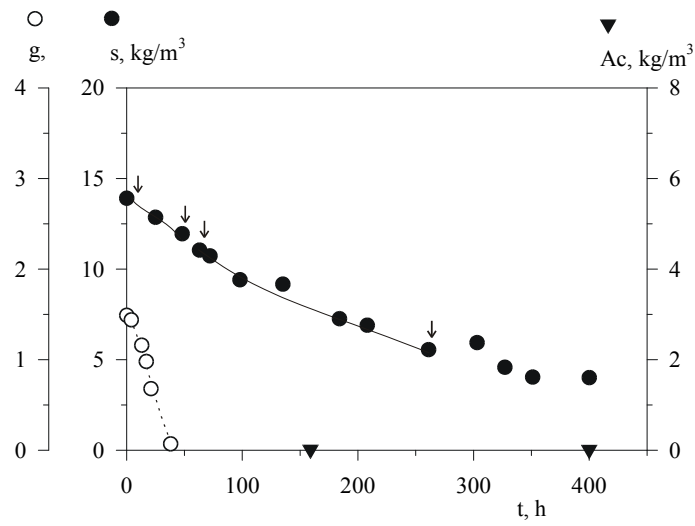
(b)

Fig. IV.12 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FP4:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

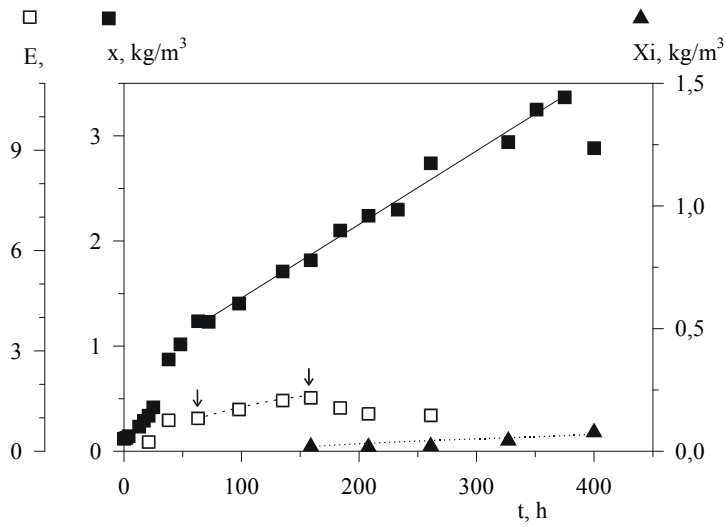
TABLA IV.49
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON H₃PO₄
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto: FP5 $C_A = 2 N$

t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,119	13,91	1,49			
2	0,127					
4	0,144	13,76	1,44			
13	0,235		1,16			
17	0,290		0,98			
21	0,338		0,68		0,276	
25	0,418	12,86				
38	0,873		0,07		0,927	
48	1,017	11,95				
63	1,237	11,05			0,983	
72	1,231	10,73				
98	1,405	9,41			1,248	
135	1,711	9,17			1,518	
159	1,817			0,016	1,599	0,019
184	2,100	7,26			1,294	
208	2,240	6,90			1,116	0,018
233	2,299					
261	2,740	5,55			1,070	0,021
303		5,94				
327	2,941	4,58				0,043
351	3,250	4,04				
375	3,367					
400	2,884	4,01		0,010		0,077



(a)



(b)

Fig. IV.13 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FP5:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

TABLA IV.50
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON H₃PO₄
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto: FP6 $C_A = 8 N$

t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,117	18,13	2,99		
2	0,130				
4	0,153				
6		18,10			
8	0,134		2,92		
19	0,154		2,87		
22	0,158				
27	0,174				
31	0,221		2,95		
43	0,280	17,26			
54	0,328	17,25	2,75		
68	0,371	16,65	2,51		
103	0,486	14,39	1,32	0,435	
140	0,639	12,69	0,27	0,938	
164	0,801	11,73	0,09	1,309	0,024
189		10,95	0,07		
212	0,936	10,49		1,723	0,028
246	1,119	8,02			
289	1,336	6,85		1,633	0,052
339	1,697	6,00			
362	1,816	5,86		1,150	0,076
406	2,092	5,24			
438	2,191	4,88		0,552	0,056
475	2,220	4,98			
502	2,423	4,91			0,064
530	2,453	5,28			
554	2,511	5,34		0,149	0,057

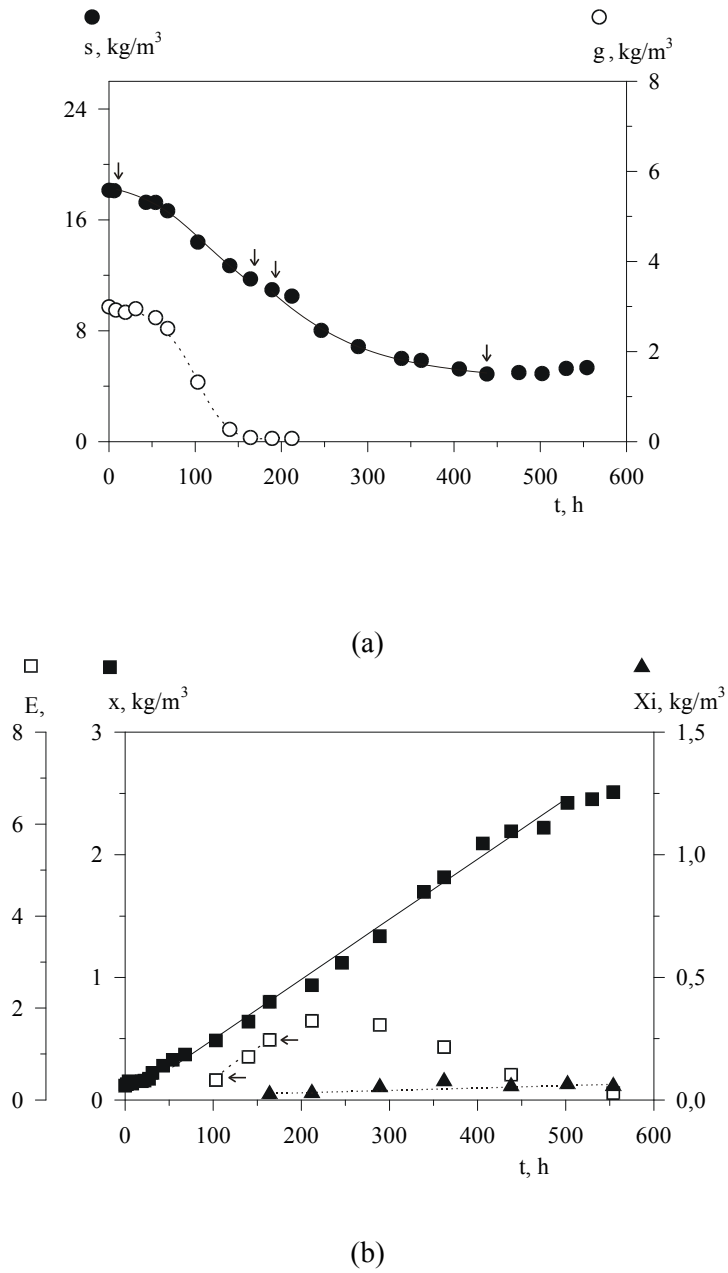


Fig. IV.14 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FP6:
 a) Azúcares reductores totales y D-glucosa
 b) Biomasa, etanol y xilitol

IV.3.2 Hidrolizados enzimáticos

De las diferentes series de hidrólisis enzimática realizadas se ha escogido, en primer lugar, la serie donde se ha modificado el tampón empleado (experimentos FE1 a FE3), y de las restantes se han seleccionado los valores de las variables de hidrólisis más favorables para realizar una nueva serie (experimentos FE4 a FE6) con el fin único de su posterior fermentación. El pH ha sido de 4,8 y la temperatura de operación, 318 K para todos los experimentos, el resto de variables de hidrólisis han sido tabulados en la Tabla IV.51.

TABLA IV.51
VARIABLES MODIFICADAS EN LAS HIDRÓLISIS
ENZIMÁTICAS POSTERIORMENTE FERMENTADAS

Expto.	Tampón	t _p , h	d _p , mm	(E/S) ₀ , g/g	EC/EH, g/g
FE1	Acetato	5	0,075	0,005	2
FE2	Citrato	5	0,075	0,005	2
FE3	Sin tampón	5	0,075	0,005	2
FE4	Sin tampón	3	0,513	0,002	2
FE5	Sin tampón	2	0,513	0,01	2
FE6	Sin tampón	3	0,513	0,002	1

Se han fermentado los hidrolizados correspondientes a la serie en la que se ha modificado el tampón empleado, Apartado IV.2.1, al objeto de estudiar la influencia que pudiera tener éste en la fermentación. En las Tablas IV.52 a IV.54 se recogen los resultados obtenidos de análisis de las muestras extraídas del biorreactor en el transcurso del cultivo, valores que se representan en las Figuras IV.15 a IV.17.

En estas dos series de experimentos las concentraciones iniciales de biomasa (inóculo) han oscilado en el rango 0,12-0,17 kg/m³. En los experimentos donde se modifica la naturaleza del tampón se parte de concentraciones de azúcares del orden de 21-25 kg/m³, lo que da lugar a cultivos con una duración próxima a las 400 horas, alcanzándose niveles de biomasa superiores a los detectados en la fermentación de hidrolizados ácidos; en este sentido, cabe señalar que en el experimento FE3 se alcanza, al final del cultivo, una concentración de biomasa del orden de 6,2 kg/m³, valor excesivamente alto si se considera que se parte (t = 0 h) de una concentración de azúcares reductores totales de 21,1 kg/m³, de los cuales al final del cultivo restan sin consumir aproximadamente 5,3 kg/m³.

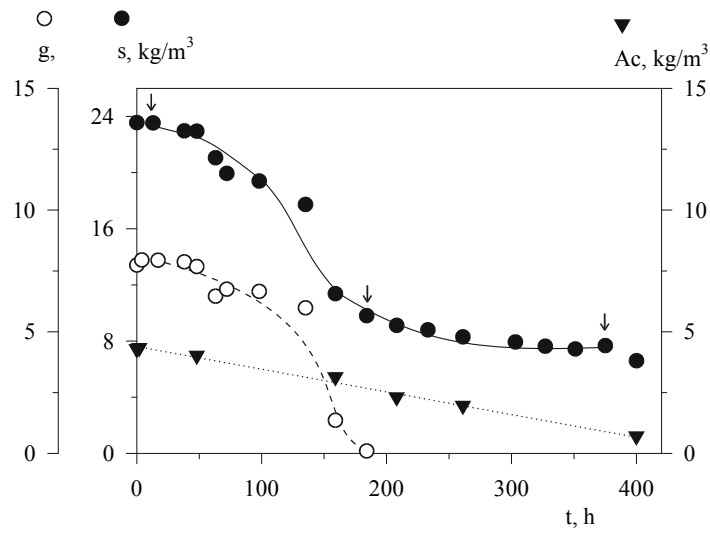
En los experimentos en los que no se utiliza disolución tampón, y se modifican las relaciones $(E/S)_0$ y EC/EH (Tablas IV.55 a IV.57 y Figuras IV.18 a IV.20), se inicia el cultivo con concentraciones de azúcares inferiores, en el rango 8,8-13,5 kg/m³; en estos experimentos el nivel de biomasa alcanzado al final del cultivo es del orden de 1,2-1,4 kg/m³.

En ambas series, se observa un consumo total de D-glucosa por *P. tannophilus* y, al igual que con los hidrolizados ácidos, los azúcares reductores totales no son consumidos completamente, aunque las concentraciones de azúcares al final del experimento son menores.

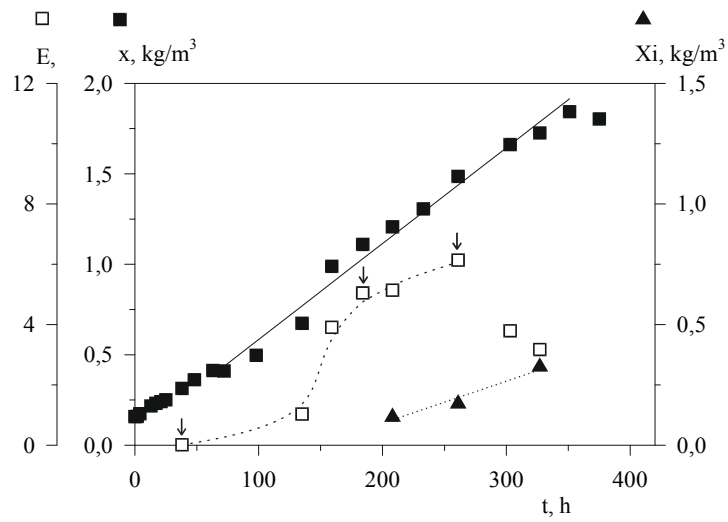
La máxima concentración de etanol, $E = 5,7$ kg/m³, se alcanza en el experimento FE1, cultivo en el que se utiliza como disolución tampón ácido acético/acetato sódico y por tanto se detectan concentraciones excepcionalmente elevadas de ácido acético en el transcurso de todo el experimento. Finalmente, cabe destacar que las concentraciones de xilitol, en general, son inferiores a 0,35 kg/m³, excepto en la fermentación del hidrolizado con disolución tampón de citrato, donde se detectan niveles de xilitol próximos a 0,45 kg/m³.

TABLA IV.52
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

<i>Expto: FE1</i>	<i>Tampón acetato</i>					
t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,158	23,56	7,74	4,292		
2	0,159			4,334		
4	0,174		7,95			
13	0,217	23,54				
17	0,231		7,94			
21	0,241					
25	0,251					
38	0,314	22,97	7,87		0,017	
48	0,362	22,95	7,68	4,023		
63	0,413	21,06	6,46			
72	0,410	19,94	6,75			
98	0,497	19,40	6,66			
135	0,674	17,73	5,98		1,035	
159	0,989	11,38	1,36	3,139	3,910	
184	1,110	9,81	0,10		5,049	
208	1,207	9,12		2,310	5,141	0,117
233	1,306	8,80				
261	1,486	8,30		1,965	6,141	0,172
303	1,662	7,94			3,795	
327	1,726	7,63			3,174	0,325
351	1,844	7,44				
375	1,804	7,68				
400	2,086	6,60		0,707		



(a)

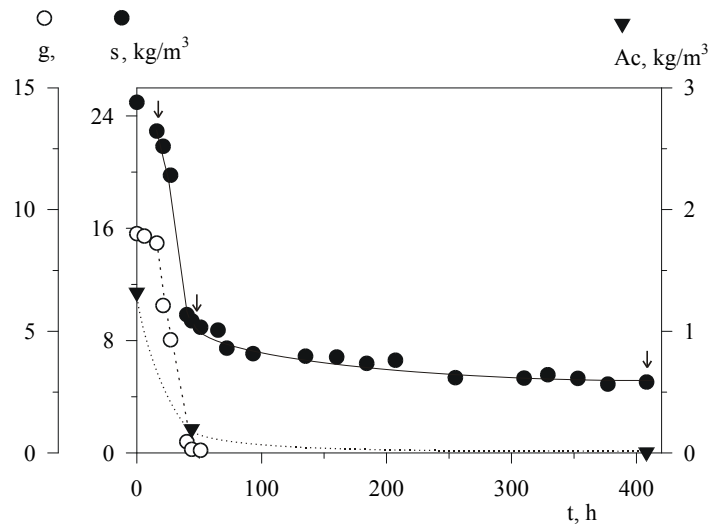


(b)

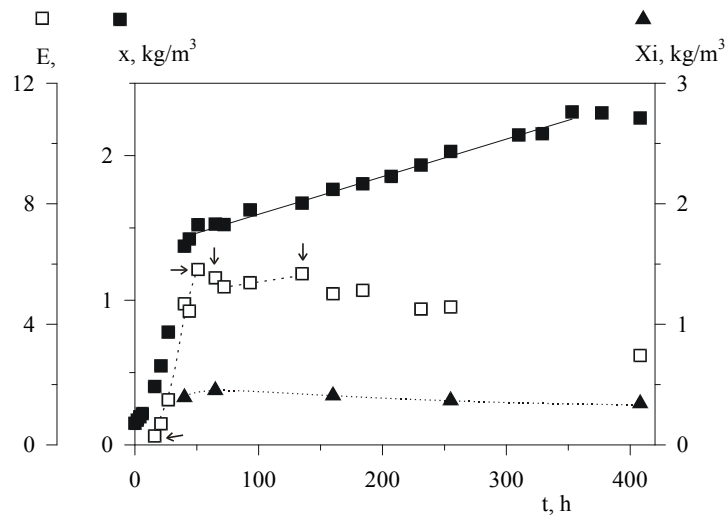
Fig. IV.15 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FE1:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

TABLA IV.53
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

<i>Expto: FE2</i>	<i>Tampón citrato</i>					
t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,149	24,97	9,01	1,318		
2	0,171					
4	0,195					
6	0,217		8,91			
16	0,404	22,92	8,62		0,296	
21	0,546	21,84	6,06		0,702	
27	0,780	19,78	4,65		1,495	
40	1,373	9,85	0,46		4,681	0,394
44	1,423	9,41	0,15	0,197	4,439	
51	1,522	8,95	0,11		5,819	
65	1,526	8,75			5,543	0,453
72	1,523	7,46			5,244	
93	1,625	7,07			5,382	
135	1,671	6,89			5,681	
160	1,766	6,83			5,014	0,409
184	1,805	6,38			5,129	
207	1,856	6,60				
231	1,934				4,508	
255	2,028	5,36			4,577	0,368
310	2,142	5,33				
329	2,151	5,57				
353	2,302	5,31				
377	2,295	4,90				
408	2,260	5,05		0,006	2,967	0,343



(a)

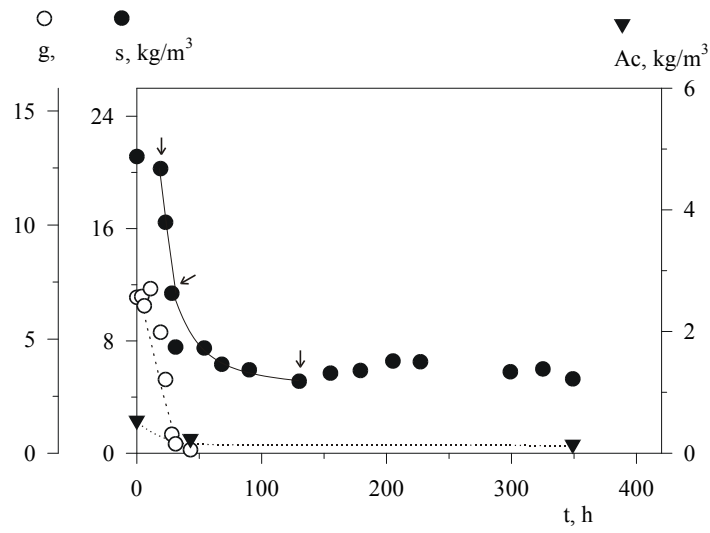


(b)

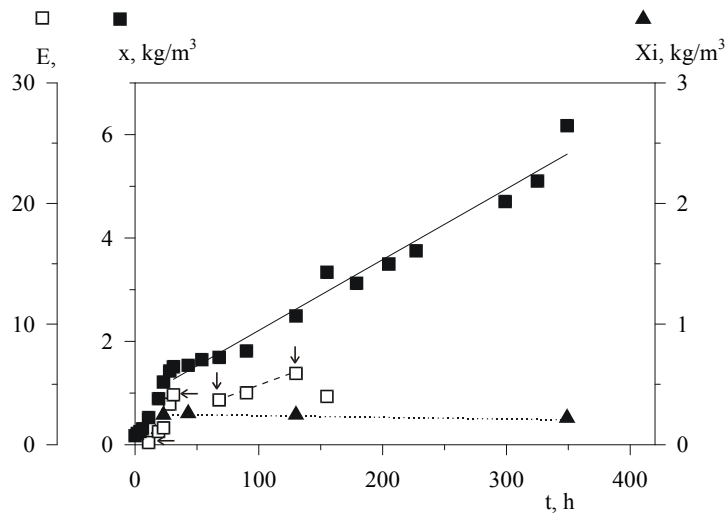
Fig. IV.16 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FE2:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

TABLA IV.54
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

<i>Expto: FE3</i>						<i>Sin tampón</i>
t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,173	21,13	6,83	0,536		
2	0,217					
4	0,253		6,87			
6	0,307		6,46			
11	0,524		7,21		0,173	
19	0,890	20,27	5,30		1,081	
23	1,211	16,44	3,23		1,391	0,246
28	1,426	11,39	0,83		3,358	
31	1,507	7,56	0,41		4,140	
43	1,535		0,15	0,235		0,260
54	1,646	7,49				
68	1,688	6,33			3,703	
90	1,811	5,94			4,301	
130	2,489	5,12			5,911	0,247
155	3,336	5,70			4,002	
179	3,121	5,89				
205	3,496	6,56				
227	3,751	6,51				
299	4,703	5,80				
325	5,101	6,00				
349	6,171	5,29		0,143		0,222



(a)

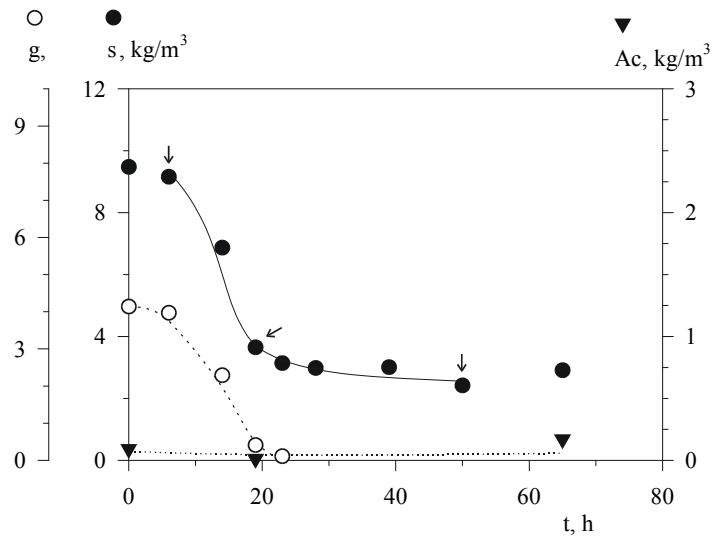


(b)

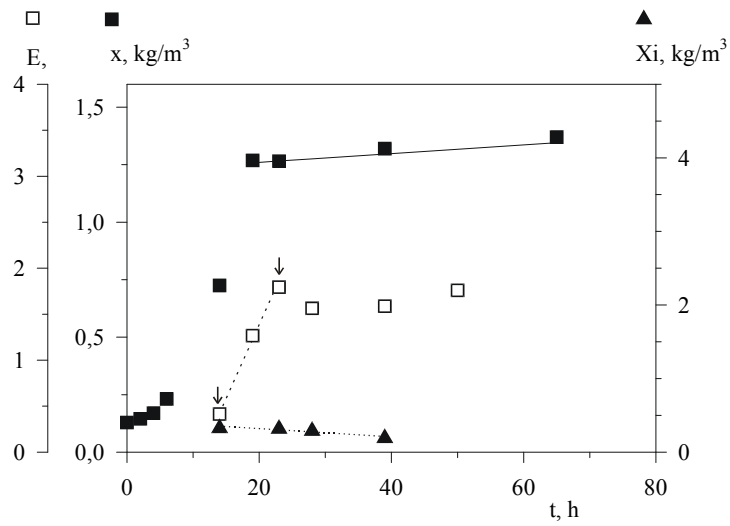
Fig. IV.17 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FE3:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

TABLA IV.55
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

<i>Expto: FE4</i>	$(E/S)_0 = 0,002$				$EC/EH = 2/1$	
t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,129	9,48	4,14	0,091		
2	0,144					
4	0,169					
6	0,231	9,14	3,96			
14	0,722	6,84	2,28		0,414	0,325
19	1,263	3,63	0,41	0,011	1,267	
23	1,257	3,12	0,11		1,794	0,315
28		2,95			1,564	0,287
39	1,305	2,98			1,587	0,189
50		2,39			1,760	
65	1,345	2,86		0,166		



(a)

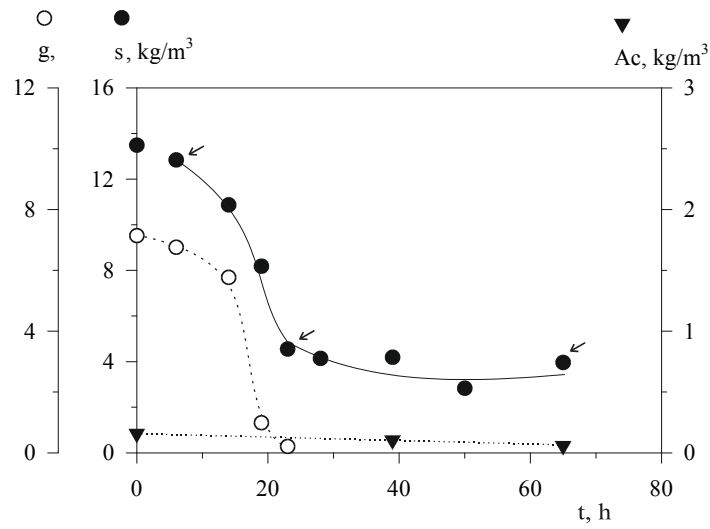


(b)

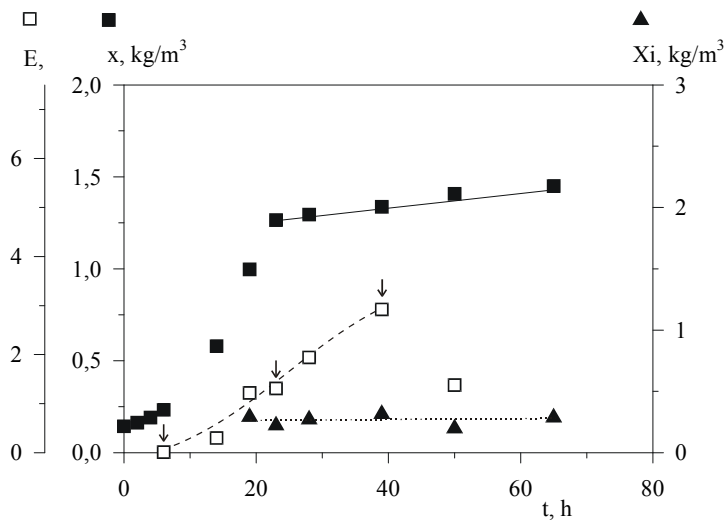
Fig. IV.18 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FE4:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

TABLA IV.56
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

<i>Expto: FE5</i>	$(E/S)_0 = 0,01$					$EC/EH = 2/1$
t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,144	13,49	7,14	0,158		
2	0,163					
4	0,191					
6	0,233	12,82	6,75		0,012	
14	0,578	10,83	5,75		0,299	
19	0,992	8,13	0,99		1,219	0,290
23	1,257	4,52	0,21		1,311	0,220
28	1,284	4,10			1,943	0,268
39	1,322	4,14		0,101	2,231	0,311
50	1,388	3,90			1,380	0,195
65	1,423	2,79		0,057		0,281



(a)

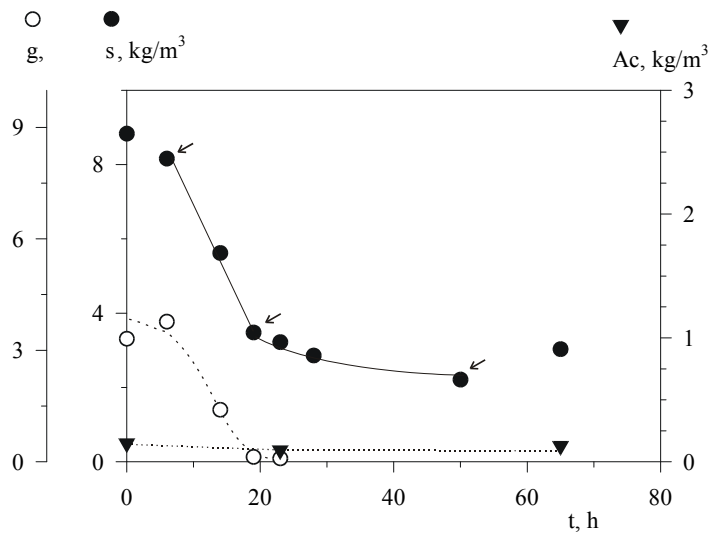


(b)

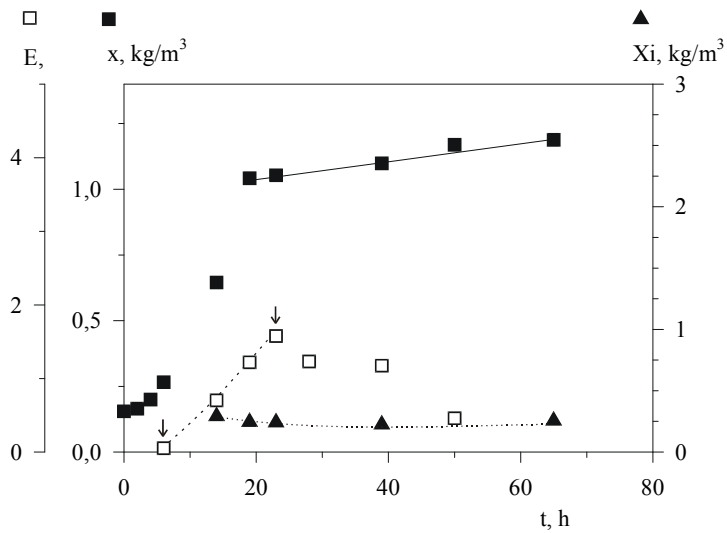
Fig. IV.19 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FE5:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

TABLA IV.57
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS
 VARIACIÓN DE BIOMASA, ETANOL, XILITOL Y ÁCIDO ACÉTICO,
 SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

<i>Expto: FE6</i>	$(E/S)_0 = 0,002$					$EC/EH = 1/1$
t, h	x, kg/m ³	s, kg/m ³	g, kg/m ³	Ac, kg/m ³	E, kg/m ³	Xi, kg/m ³
0	0,155	8,83	3,31	0,149		
2	0,165					
4	0,200					
6	0,266	8,16	3,77		0,052	
14	0,645	5,62	1,40		0,702	0,293
19	1,042	3,48	0,13		1,219	0,246
23	1,053	3,22	0,09	0,092	1,576	0,241
28		2,86			1,231	
39	1,098				1,173	0,224
50	1,169	2,21			0,460	
65	1,188	3,03		0,127		0,256



(a)



(b)

Fig. IV.20 Concentraciones de sustratos y productos en el expto FE6:
 a) Azúcares reductores totales, D-glucosa y ácido acético
 b) Biomasa, etanol y xilitol

V. Discusión de resultados

V.1 HIDRÓLISIS

El estudio realizado sobre la hidrólisis del residuo de poda de olivo se ha centrado tanto en hidrólisis ácida como en hidrólisis enzimática.

En el hidrolizado obtenido al final de cada experimento se han determinado las concentraciones de azúcares reductores totales (s, kg/m³) y D-glucosa (g, kg/m³) empleando los métodos descritos en el Apartado III de esta Memoria. A partir de dichas concentraciones se han determinado los rendimientos Y_T e Y_G definidos según las relaciones:

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

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

Con respecto al residuo sólido obtenido tras el proceso de hidrólisis, se ha calculado la conversión fraccional en hemicelulosa, X_H , y en celulosa, X_C , partiendo del hecho de que la lignina permanece inalterada a lo largo de dicho proceso. Por tanto, de acuerdo con la definición de conversión se puede escribir para la fracción hemicelulósica:

$$X_H = \frac{\text{moles hemicelulosa transformados}}{\text{moles hemicelulosa iniciales}} 100 \quad (5.3)$$

y de la misma forma, para la fracción de celulosa:

$$X_C = \frac{\text{moles celulosa transformados}}{\text{moles celulosa iniciales}} 100 \quad (5.4)$$

Con el fin de estudiar la cinética de las reacciones de hidrólisis tanto ácida como enzimática, en los distintos experimentos de este trabajo, se han ajustado las concentraciones de azúcares, determinadas a lo largo del proceso hidrolítico, con el tiempo de operación mediante una ecuación tipo potencial:

$$s - s_0 = m t^z \quad (5.5)$$

que cumple con la condición inicial de que para $t = 0$, $s = s_0$

Para evaluar los parámetros m y z de la ecuación (5.5) se ha linealizado en la forma,

$$\log (s - s_0) = \log m + z \log t \quad (5.6)$$

Teniendo en cuenta esta ecuación se han representado en escala logarítmica $(s - s_0)$ vs t para cada experimento de la serie y, posteriormente mediante ajuste por mínimos cuadrados de los valores del primer miembro frente al logaritmo de t se han podido determinar los parámetros m y z .

Una vez que se dispone de una ecuación que relaciona las concentraciones de azúcares reductores totales con el tiempo de operación, ecuación (5.5), se puede determinar de forma inmediata la velocidad de hidrólisis de acuerdo con la expresión:

$$r = \frac{d(s - s_0)}{dt} = m z t^{z-1} \quad (5.7)$$

V.1.1 Hidrólisis ácida

En el estudio de la hidrólisis ácida del residuo de poda se han contemplado dos ácidos, sulfúrico y fosfórico, variando la concentración de cada uno de ellos en un amplio rango, entre 0 y 8 N. Asimismo se ha estudiado, en una tercera serie, la influencia de la temperatura en el medio de reacción sobre el proceso hidrolítico.

Según se indica en el Apartado II.5.2, la hidrólisis de hemicelulosa por un ácido no es más que la ruptura aleatoria de la estructura del polímero, hecho que se ha observado en la hidrólisis ácida del residuo de poda de olivo incluso para concentraciones mínimas de ácido.

La hidrólisis de la fracción de hemicelulosa implica la solubilización y posible destrucción parcial de los azúcares producidos. Como consecuencia, la cantidad de azúcares recuperados del residuo depende del tiempo de reacción, temperatura y concentración de ácido, siendo este último parámetro el que afecta, en mayor medida, al rendimiento en azúcares, mientras que en la formación de productos de degradación, la temperatura causa el mayor efecto (Roberto *et al.*, 2003).

V.1.1.1 Influencia de distintos pretratamientos

Al estudiar el pretratamiento con vapor del residuo de poda y su posterior hidrólisis con ácido sulfúrico 0,5 N se observa una leve influencia sobre el rendimiento en azúcares reductores totales, Y_T , aunque esta ligera mejoría no se corresponde con una mayor conversión de la fracción de hemicelulosa, X_H , tal y como se pone de manifiesto en la Tabla V.1.

TABLA V.1
HIDRÓLISIS ÁCIDA. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO A PRESIÓN
Conversión fraccional, rendimientos en
azúcares reductores totales y D-glucosa

$P = 196,32 \text{ kPa}$

	t_p , min	X_H , %	Y_T 10 ² , kg/kg	Y_G 10 ² , kg/kg
HAS-3	0	84,3	19,20	3,35
HASP-1	30	83,4	22,22	3,37
HASP-2	60	81,9	23,74	3,52
HASP-3	120	82,3	23,27	3,67

En cuanto al pretratamiento del residuo de poda mediante ultrasonidos en las condiciones especificadas en el Apartado IV.1.1.2, se aprecia cierto efecto sobre el rendimiento en azúcares reductores totales y en D-glucosa, lo cual no se corresponde con una mayor conversión de la fracción hemicelulósica, Tabla V.2. Es en la hidrólisis ácida (HASU-1) donde se observa que el pretratamiento con ultrasonidos puede aumentar el rendimiento en azúcares reductores totales en una pequeña proporción que puede llegar a ser hasta de 4 puntos. En parte este resultado está de acuerdo con lo indicado por Rolz (1988) quien encuentra que un pretratamiento con ultrasonidos del sistema reaccionante incrementa la velocidad y extensión de la hidrólisis del bagazo de la caña de azúcar.

TABLA V.2
**HIDRÓLISIS ÁCIDA. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO
 CON ULTRASONIDOS**

Conversión fraccional, rendimientos en
 azúcares reductores totales y D-glucosa

$$\nu = 23,3 \text{ kHz}$$

	$X_H, \%$	$Y_T 10^2, \text{ kg/kg}$	$Y_G 10^2, \text{ kg/kg}$
Hw	9,1	3,21	0,43
HwU	3,4	3,95	0,59
HAS-3	83,1	19,20	3,35
HASU-1	81,0	23,41	4,29

V.1.1.2 Influencia de la concentración de ácido sulfúrico

En esta serie se emplea ácido sulfúrico en la hidrólisis del residuo de poda de olivo con el objetivo de determinar los efectos de la concentración de dicho ácido en la producción de azúcares (xilosa, glucosa y arabinosa fundamentalmente).

Se han realizado los experimentos de hidrólisis que se recogen en la Tabla IV.7, manteniendo en todos los casos una temperatura de 363 K y un tiempo de operación de 240 minutos. Al final de cada experimento se caracteriza tanto el residuo sólido como la disolución de azúcares resultante.

En la Tabla V.3 se recoge la conversión fraccional en hemicelulosa y en celulosa, determinadas de acuerdo con las expresiones (5.3) y (5.4), respectivamente, para cada experimento de la serie. Se observa que para concentraciones iguales o superiores a 1 N de ácido sulfúrico la conversión de la fracción de hemicelulosa es total, tal y como ocurre con otros ácidos empleados para el residuo de poda de olivo, como son los ácidos clorhídrico y trifluoroacético, Moya (1997); si bien es cierto que, con estos dos ácidos, la degradación de la fracción hemicelulósica comienza a concentraciones inferiores, el ácido clorhídrico tiene el inconveniente de ser muy corrosivo y el ácido trifluoroacético presenta cierta peligrosidad, tal y como se indica en el Apartado II.5.2.

Con respecto a la fracción celulósica, se alcanza un valor máximo de conversión próximo al 36% cuando la concentración del ácido empleada es 8 N, con un rendimiento en azúcares próximo a 0,30 kg/kg. Estos azúcares proceden tanto de la fracción celulósica como de la fracción hemicelulósica.

Los rendimientos en D-glucosa, Y_G , alcanzados para concentraciones de ácido sulfúrico superiores a 0,5 N son debidos a la contribución conjunta de las fracciones hemicelulósica y celulósica, ya que a partir de dicha concentración se observa degradación de la celulosa.

En relación con otros residuos, Parajó *et al.* (1995) hidrolizando madera de pino, obtienen del orden de 12 kg/m³ de azúcares para una concentración de ácido sulfúrico de 0,4 N y hasta 18,7 kg/m³ empleando ácido sulfúrico 2 N, todos ellos azúcares hemicelulósicos. Para ese mismo residuo, estos autores determinan la concentración de furfural que se produce en el proceso de hidrólisis con ácido sulfúrico, obteniendo cantidades que van desde 0,027 hasta 0,32 kg/m³.

Con respecto a los rendimientos en azúcares reductores totales (Y_T) y D-glucosa (Y_G), ecuaciones (5.1) y (5.2) respectivamente, alcanzados al final de cada hidrólisis, se detecta un incremento en ambos rendimientos al aumentar la concentración de ácido, con valores máximos cercanos a 0,30 kg de azúcares reductores totales y 0,07 kg de D-glucosa por cada kg de residuo seco inicial, respectivamente, Tabla V.3. Se observa cierta degradación de azúcares en las hidrólisis realizadas con concentraciones de ácido sulfúrico superiores a 2 N, y esto se puede apreciar claramente en la Figura V.1.

Aunque las mayores conversiones, X_H y X_C , se consiguen con las concentraciones más elevadas de ácido, este hecho no se corresponde con los rendimientos en azúcares reductores totales o en D-glucosa, debido a que para estas concentraciones tan altas de ácido existe una competencia entre la generación de azúcares y su degradación ya que, por las condiciones de operación, estos azúcares son rápidamente degradados a compuestos como furfural e hidroximetilfurfural, reacción que puede avanzar hasta ácido fórmico y levulínico, Lavarack *et al.* (2002).

Parajó *et al.* (1993), con madera de eucalipto, proporcionan valores de concentración de furfural a diferentes tiempos de hidrólisis y concentraciones iniciales de ácido sulfúrico, operando a temperatura de ebullición. Indican que para concentraciones próximas a 0,2 N sólo a partir de las cuatro horas de hidrólisis se supera el valor de 0,1 kg/m³ de furfural, y cuanto menor es la concentración del ácido mayor es el tiempo necesario de hidrólisis para que se supere esa concentración.

TABLA V.3
**HIDRÓLISIS ÁCIDA. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN
 DE ÁCIDO SULFÚRICO**

Conversión fraccional, rendimientos en
 azúcares reductores totales y D-glucosa

	$T_H = 363 K$			$t = 240 min$	
	C_A, N	$X_H, \%$	$X_C, \%$	$Y_T 10^2, kg/kg$	$Y_G 10^2, kg/kg$
Hw	0,0	11,0	0,3	2,86	0,43
HAS-1	0,1	22,9	0,0	8,27	1,36
HAS-2	0,3	66,6	0,0	15,87	3,65
HAS-3	0,5	84,3	12,6	19,20	3,35
HAS-4	0,75	91,9	14,7	21,23	4,59
HAS-5	1,0	100,0	13,9	24,94	6,69
HAS-6	2,0	100,0	24,1	25,69	6,30
HAS-7	4,0	100,0	24,0	26,06	6,26
HAS-8	6,0	100,0	27,2	29,92	7,47
HAS-9	8,0	100,0	35,9	29,67	6,94

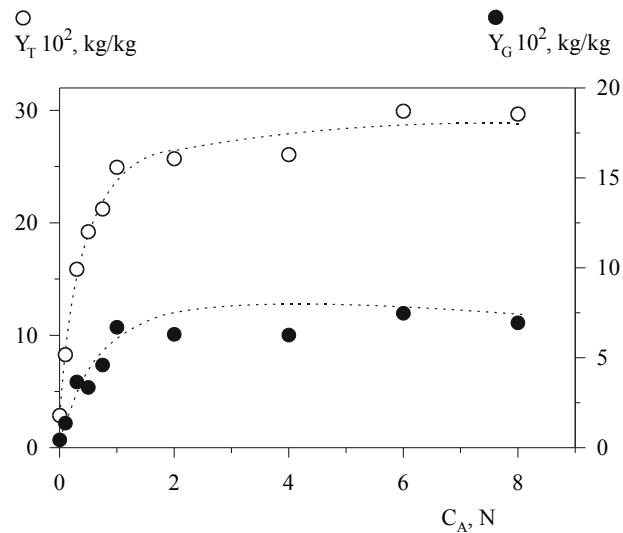


Fig. V.1 Rendimientos en azúcares reductores totales y D-glucosa alcanzados con distintas concentraciones de ácido sulfúrico

Con respecto a otros residuos, tales como la paja de trigo, hay que indicar que los rendimientos obtenidos son menores. En este sentido, Delgenes *et al.* (1990) empleando ácido sulfúrico 2% (p/v), normalidad próxima a 0,4, hidrolizan la fracción hemicelulósica obteniendo un rendimiento del orden de 0,25 kg/kg. Sin embargo, hay que destacar que el residuo de poda de olivo corresponde a una madera dura, además estos autores utilizan una temperatura ligeramente superior 364,5 K y un tiempo de operación mucho mayor, 23 h. Estos autores logran la hidrólisis completa de las fracciones hemicelulósica y celulósica del residuo de paja de trigo empleando ácido sulfúrico a una concentración próxima a 14,7 N (72% p/v), alcanzando un rendimiento en azúcares del 59%.

En la Figura V.1 puede apreciarse que la degradación hidrolítica no es proporcional a la concentración de ácido ya que el efecto hidrolítico es mayor a concentraciones de ácido inferiores a 1 N que al incrementar la concentración de ácido desde 1 a 8 N.

Por aplicación del método diferencial de análisis de datos, y realizando un análisis parcial de la ecuación cinética mediante el denominado método de las velocidades iniciales, se ha tratado de determinar el valor de la constante cinética, k_1' (referida al sustrato), y el orden de la reacción, n_1 . En principio, se supone una ecuación tipo potencial de la forma:

$$r_0 = k_1' C_A^{n_1} \quad (5.8)$$

dónde r_0 representa la velocidad de reacción inicial determinada por la ecuación (5.7) con base en la formación de producto.

Es necesario considerar que los parámetros m y z de la ecuación (5.7) se determinan previamente mediante la expresión (5.6). A título de ejemplo, y para dos procesos de hidrólisis de esta serie experimental, en la Figura V.2 se representa en escala logarítmica, $(s-s_0)$ frente a t , observándose un buen ajuste en el intervalo ensayado.

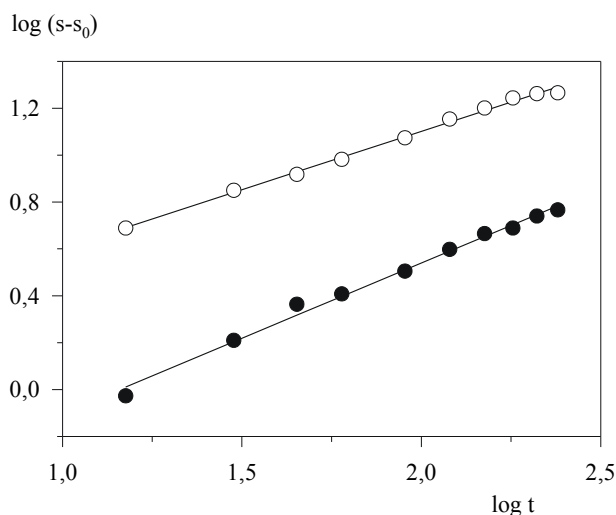


Fig. V.2 Reproducción con la ecuación (5.6) de los experimentos HAS-1 (●) y HAS-4 (○)

A partir de la pendiente y la ordenada en el origen de estas rectas se determinan los parámetros m y z , respectivamente. Con estos valores y utilizando la ecuación (5.7) para un tiempo muy próximo a cero ($t = 1$ s) se determina en cada uno de los experimentos la velocidad inicial de hidrólisis, r_0 .

Una vez evaluadas las velocidades iniciales y, partiendo de la ecuación (5.8) en su forma linealizada,

$$\ln r_0 = \ln k_1' + n_1 \ln C_A \quad (5.9)$$

mediante una representación gráfica de $\ln r_0$ versus $\ln C_A$, tal y como se muestra en la Figura V.3, se determina el valor de n_1 a partir de la pendiente y el valor de k_1' a partir de la ordenada en el origen, obteniendo un ajuste aceptable, en el cual no se ha incluido el experimento correspondiente a la hidrólisis con ácido sulfúrico 8 N ya que, tal y como se ha

indicado anteriormente, a esa concentración tan elevada se detecta degradación de los azúcares presentes en la disolución.

Los valores de k_1' y n_1 sustituidos en la ecuación (5.8) nos llevan a la expresión:

$$r_0 = 6,22 C_A^{0,97} \quad (5.10)$$

ecuación que corresponde a la recta de la Figura V.3 para el intervalo de concentraciones de ácido sulfúrico comprendido entre 1 y 6 N, experimentos HAS-1 y HAS-8, respectivamente.

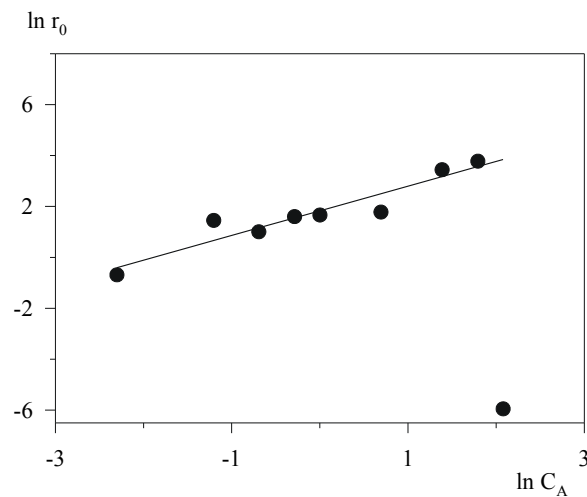


Fig. V.3 Ajuste de las velocidades iniciales de hidrólisis en los experimentos realizados con distintas concentraciones de ácido sulfúrico, de acuerdo con la ecuación (5.9)

V.1.1.3 Influencia de la concentración de ácido fosfórico

Manteniendo constante la temperatura en 363 K y un tiempo de hidrólisis de 240 minutos, se han realizado ocho experimentos variando la concentración de ácido fosfórico. En los residuos obtenidos tras filtración al finalizar el proceso de hidrólisis ácida se ha determinado, de acuerdo con la ecuación (5.1), la conversión de la fracción hemicelulósica alcanzando un valor máximo del 77% para la hidrólisis efectuada con ácido fosfórico 8 N, mientras que la fracción de celulosa parece no ser atacada a las concentraciones de ácido ensayadas, Tabla V.4

También se muestran en la Tabla V.4 los rendimientos en azúcares reductores totales (Y_T) y D-glucosa (Y_G) para cada experimento de la serie alcanzándose, respectivamente, unos valores máximos de 0,19 y 0,039 kg por cada kg de residuo seco inicial, Figura V.4.

TABLA V.4
**HIDRÓLISIS ÁCIDA. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN
DE ÁCIDO FOSFÓRICO**

Conversión fraccional, rendimientos en
azúcares reductores totales y D-glucosa

	$T_H = 363 K$		$t = 240 min$	
	C_A, N	$X_H, \%$	$Y_T 10^2, kg/kg$	$Y_G 10^2, kg/kg$
Hw	0,0	11,0	2,86	0,43
HAP-1	0,1	23,6	4,65	1,02
HAP-2	0,3	34,1	6,95	1,15
HAP-3	0,5	40,2	8,07	1,18
HAP-4	1,0	51,4	8,30	1,24
HAP-5	2,0	52,8	13,74	1,58
HAP-6	4,0	69,5	15,25	1,76
HAP-7	8,0	77,0	18,89	3,88

Comparando con las hidrólisis realizadas con ácido sulfúrico, en esta serie las conversiones alcanzadas son menores en todos los casos, tal y como ocurre con los rendimientos, Y_T e Y_G ; este hecho pone de manifiesto el menor efecto hidrolítico del ácido fosfórico frente al sulfúrico. Sin embargo, de cara al posterior proceso de fermentación, hay que tener presente que la presencia de inhibidores en los hidrolizados de ácido fosfórico es menor que cuando el ácido empleado es el sulfúrico lo cual presenta una serie de ventajas a considerar.

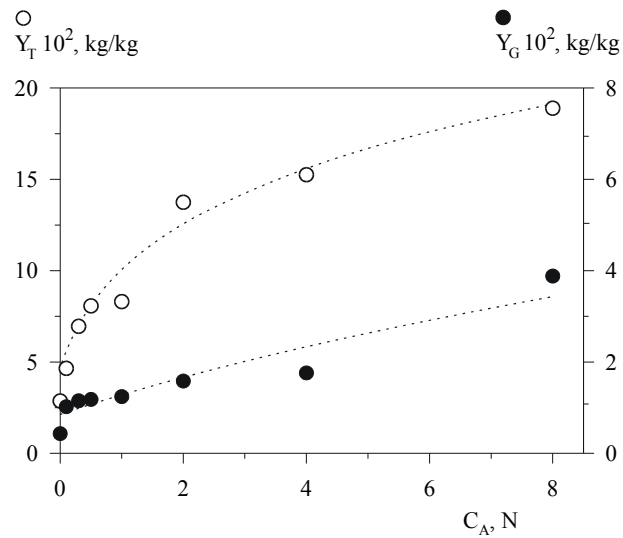


Fig. V.4 Rendimientos en azúcares reductores totales y D-glucosa alcanzados con distintas concentraciones de ácido fosfórico

Aplicando el mismo tratamiento cinético que en la serie anterior, se supone una ecuación potencial de la forma

$$r_0 = k_2' C_A^{n_2} \quad (5.11)$$

donde la velocidad inicial de hidrólisis, r_0 , en la forma en que se definió anteriormente, se ha determinado a partir de la ecuación (5.7) para un tiempo próximo a cero y una vez evaluados los parámetros m y z de la ecuación (5.5) mediante representación gráfica de la ecuación (5.6). A título de ejemplo, en la Figura V.5 se muestra esta representación para dos experimentos de esta serie.

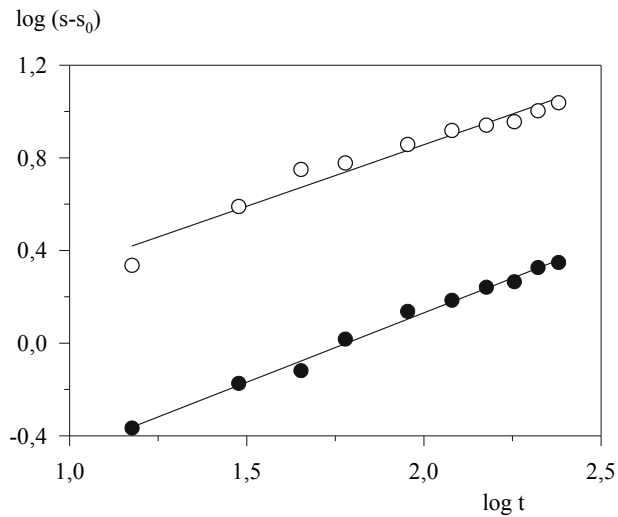


Fig. V.5 Reproducción con la ecuación (5.6) de los experimentos HAP-1 (●) y HAP-5 (○)

El orden de reacción, n_2 , y la constante cinética, k_2' , se determinan al linealizar la ecuación (5.11) tomando logaritmos neperianos:

$$\ln r_0 = \ln k_2' + n_2 \ln C_A \quad (5.12)$$

y, mediante representación gráfica, $\ln r_0$ vs $\ln C_A$, se obtienen los valores para esos dos parámetros, valores que sustituidos en la ecuación (5.11) conducen a la siguiente expresión:

$$r_0 = 1,42 C_A^{0,75} \quad (5.13)$$

a la que corresponde la línea recta de la Figura V.6, observándose un ajuste aceptable en el intervalo de concentraciones ensayado.

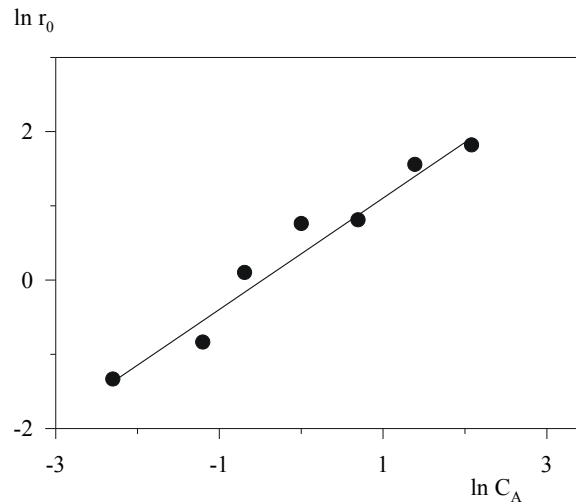


Fig. V.6 Ajuste de las velocidades iniciales de las hidrólisis realizadas con distintas concentraciones de ácido fosfórico, de acuerdo con la ecuación (5.12)

V.1.1.4 Efecto de la temperatura

En una tercera serie de hidrólisis ácida se ha estudiado la influencia de la temperatura de hidrólisis en la conversión fraccional y los rendimientos en azúcares reductores totales (Y_T) y D-glucosa (Y_G) ya que, tal y como indica Lis *et al.* (2000), el incremento de la temperatura del medio de reacción, para una determinada concentración inicial de ácido y sustrato, permite un mayor rendimiento en la hidrólisis.

La Tabla V.5 recoge la conversión en hemicelulosa alcanzando una conversión completa a partir de 363 K mientras que la fracción de celulosa prácticamente no resulta hidrolizada en las condiciones de operación ensayadas.

Con respecto a los rendimientos en azúcares reductores totales, se obtienen valores comprendidos entre 0,11 y 0,30 kg/kg para 333 y 373 K, respectivamente; y en cuanto a D-glucosa, el máximo rendimiento alcanzado es de 0,072 kg/kg para la hidrólisis realizada a la temperatura de 373 K.

TABLA V.5
HIDRÓLISIS ÁCIDA. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA
 Conversión fraccional, rendimientos en
 azúcares reductores totales y D-glucosa

<i>Ácido sulfúrico</i>	$C_A = 1,0 N$		$t = 240 min$	
	T_H, K	$X_H, \%$	$Y_T 10^2, kg/kg$	$Y_G 10^2, kg/kg$
HAST-1	333	7,2	10,81	1,51
HAST-2	343	28,7	14,51	1,76
HAST-3	353	67,5	21,00	2,90
HAS-5	363	100,0	24,94	6,69
HAST-4	373	100,0	29,53	7,19

En la Figura V.7 se detecta cierta degradación de D-glucosa para la temperatura de 373 K ya que debido a la presencia de ácido y temperatura elevadas, puede existir degradación de azúcares en el proceso de hidrólisis tal y como indican Lavarack *et al.* (2002).

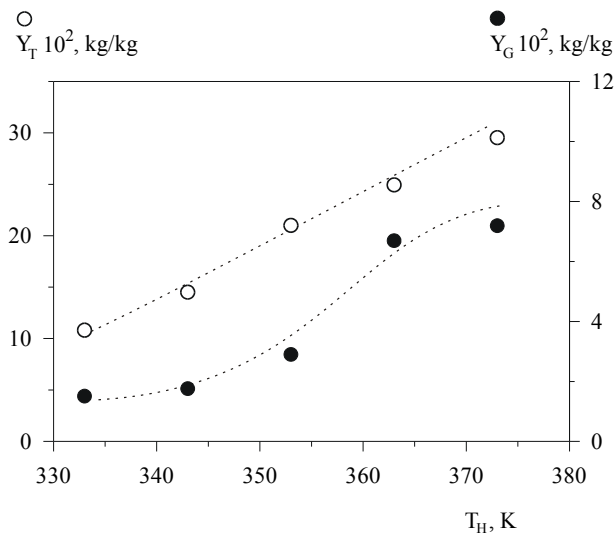


Fig. V.7 Rendimientos en azúcares reductores totales y D-glucosa alcanzados con distintas temperaturas de hidrólisis, empleando ácido sulfúrico 1 N

A título de ejemplo, también en esta serie se muestra la representación gráfica de la ecuación (5.6) para dos de los procesos de hidrólisis realizados. Mediante la aplicación del método de mínimos cuadrados a los valores de $\log (s-s_0)$ vs $\log t$, se observa un ajuste aceptable que permite determinar los parámetros m y z , Figura V.8.

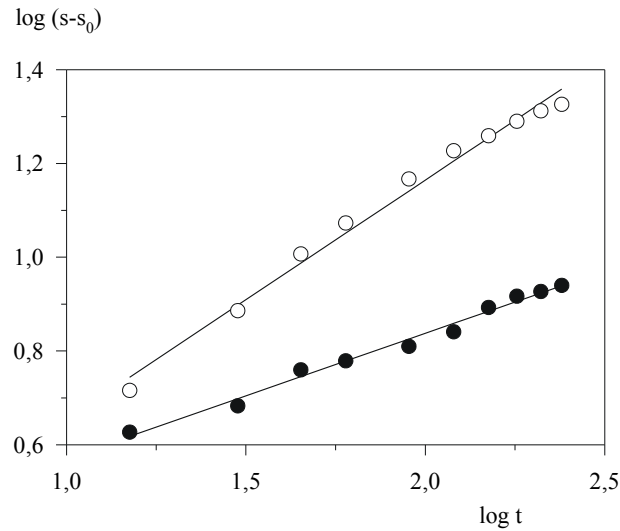


Fig. V.8 Reproducción con la ecuación (5.6) de los experimentos HAST-1 (●) y HAS-5 (○)

A partir de estos parámetros se puede determinar la velocidad de reacción para cada hidrólisis, y a diferentes tiempos, utilizando la ecuación (5.7). La Tabla V.6 recoge valores de r a diferentes tiempos de operación (15, 60, 90, 150 y 240 minutos) en hidrólisis con ácido sulfúrico 1 N y a diferentes temperaturas. Puede apreciarse cómo la velocidad de hidrólisis aumenta con la temperatura de hidrólisis y cómo los valores más elevados para cada experimento se alcanzan al principio del mismo decayendo el valor de dicho parámetro a medida que va avanzando el proceso hidrolítico.

TABLA V.6
VELOCIDADES DE HIDRÓLISIS ALCANZADAS EN
EXPERIMENTOS REALIZADOS A DISTINTAS TEMPERATURAS

T _H , K	333	343	353	363	373
t, min	r, kg/(m ³ min)				
15	0,074	0,100	0,151	0,189	0,296
60	0,027	0,038	0,061	0,096	0,133
90	0,020	0,028	0,046	0,079	0,105
150	0,014	0,020	0,033	0,061	0,078
240	0,010	0,014	0,024	0,049	0,060

V.1.2 Hidrólisis enzimática

Esta parte de la investigación se ha destinado al estudio de la hidrólisis enzimática por ser una de las principales vías en el aprovechamiento de residuos lignocelulósicos debido a las suaves condiciones de operación. Las variables de proceso que se han modificado en la hidrólisis enzimática del residuo de poda de olivo han sido las siguientes:

- disolución tampón
- tiempo de pretratamiento
- diámetro de partícula
- relación enzima/sustrato
- relación celulasas/hemicelulasas
- pH de operación
- temperatura

V.1.2.1 Efecto de la disolución tampón

En esta serie se han efectuado tres experimentos de hidrólisis enzimática en los que la variable modificada ha sido la disolución tampón puesta en el medio de reacción. En la Tabla V.7 se observa como la conversión de hemicelulosa permanece prácticamente invariable, con una ligera subida en la hidrólisis realizada con tampón citrato mientras que

para el rendimiento global en D-glucosa, se aprecia un máximo en las hidrólisis realizadas con tampón acetato, Figura V.9.

TABLA V.7
**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA. EFECTO DE
LA DISOLUCIÓN TAMPÓN**
Conversión fraccional, rendimientos en
azúcares reductores totales y D-glucosa

	Tampón	X _H , %	Y _T 10 ² , kg/kg	Y _G 10 ² , kg/kg
HEtp-1	acetato	51,2	16,19	7,98
HEtp-2	citrato	53,0	17,93	6,35
HEtp-3	sin tampón	51,6	16,60	6,39

Por otra parte, el rendimiento global en azúcares reductores totales resulta ligeramente más elevado cuando se usa como disolución tampón ácido cítrico/citrato. Estos resultados ponen de manifiesto que prácticamente no es necesaria la utilización de una disolución tampón, si se considera además que el pH apenas se modifica en el transcurso del proceso de hidrólisis.

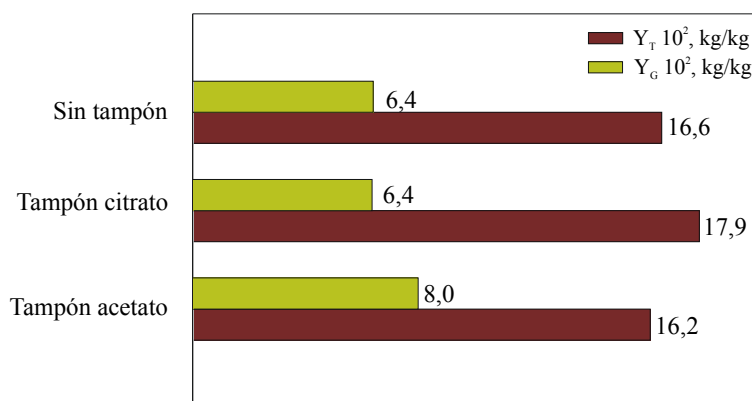


Fig. V.9 Rendimientos en azúcares reductores totales y D-glucosa alcanzados para diferentes disoluciones tampón empleadas en la hidrólisis enzimática

V.1.2.2 Pretratamiento a presión

En esta serie de hidrólisis enzimática se ha estudiado la influencia del pretratamiento con vapor tanto sobre el residuo sólido como sobre la disolución de azúcares resultantes del posterior proceso hidrolítico.

Esta influencia se pone de manifiesto al determinar la conversión fraccional de hemicelulosa de acuerdo con la ecuación (5.3), observándose cómo aumenta el ataque enzimático sobre esta fracción con el tiempo de pretratamiento, con una conversión máxima del 31,4%, mientras que sobre la fracción de celulosa no se detecta degradación enzimática. Esta tendencia está de acuerdo con los máximos rendimientos alcanzados en azúcares reductores totales y D-glucosa, 0,14 y 0,064 kg/kg, respectivamente, Tabla V.8.

TABLA V.8
**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: INFLUENCIA DEL
TIEMPO DE PRETRATAMIENTO**
Conversión fraccional, rendimientos en
azúcares reductores totales y D-glucosa

<i>pH = 4,8 T_H = 318 K (E/S)₀ = 0,002 EC/EH = 2/1 d_p = 513 μm</i>				
	<i>t_p, h</i>	<i>X_H, %</i>	<i>Y_T 10², kg/kg</i>	<i>Y_G 10², kg/kg</i>
HEP-1	0	3,8	4,43	1,58
HEP-2	1	16,8	9,27	3,02
HEP-3	2	21,4	11,13	4,91
HEP-4	3	29,1	13,26	6,16
HEP-5	5	31,4	13,88	6,37

En la Figura V.10 se observa prácticamente la misma tendencia en los rendimientos en D-glucosa que en el total de azúcares, al ir incrementando el tiempo de pretratamiento con vapor al que se somete el residuo de poda a fin de prepararlo para el posterior proceso hidrolítico. Se aprecia que este incremento de azúcares y D-glucosa no es lineal ya que a partir de 3 horas la variación es mínima.

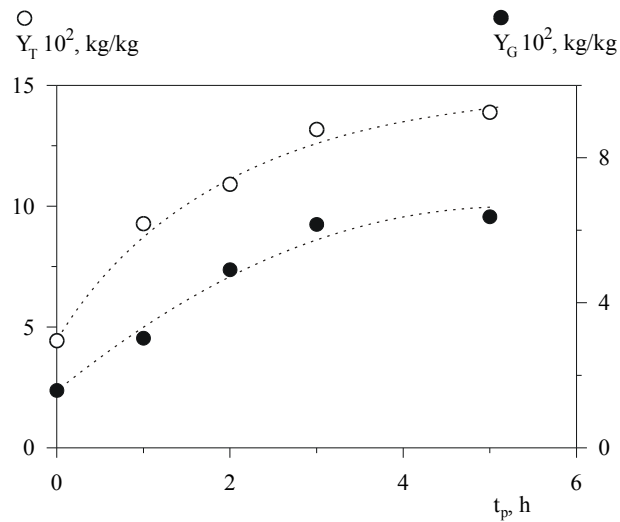


Fig. V.10 Rendimientos en azúcares reductores totales y D-glucosa alcanzados con distintos tiempos de pretratamiento

Por otra parte, utilizando las ecuaciones (5.5) a (5.7) y el procedimiento de cálculo descrito para la hidrólisis ácida (Apartado V.1), se han determinado las velocidades iniciales de reacción, r_0 , para cada uno de los experimentos de esta serie (Figura V.11). En general, se observa que r_0 aumenta conforme se incrementa el tiempo de pretratamiento. Este hecho parece indicar que el transporte de la enzima hasta los puntos claves de reacción, al menos en la fracción hemicelulósica, se ha facilitado con este pretratamiento con vapor. Posiblemente, tal como se indica en la bibliografía, (Wong *et al.*, 1988), la estructura lignocelulósica se ha esponjado y se favorece el acceso de las enzimas al interior de las partículas sólidas. Cabe pensar que este esponjamiento o apertura de la estructura sólida puede ser función del tiempo de pretratamiento hasta un cierto valor a partir del cual no sea el transporte de la enzima (etapa de transferencia de materia) sino la etapa de reacción la que controle el proceso global.

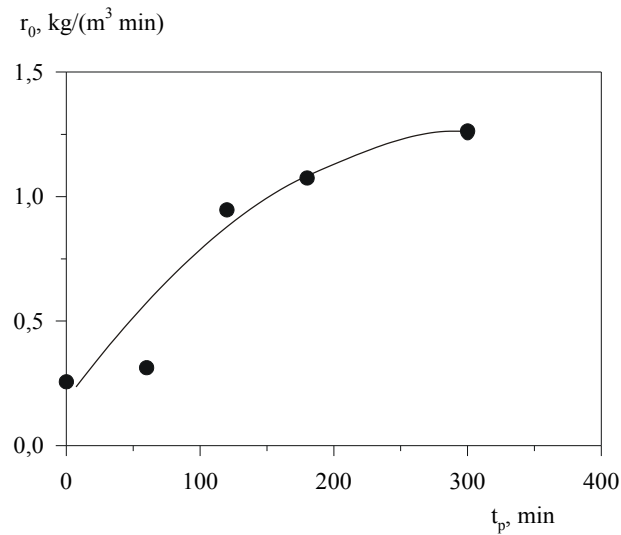


Fig. V.11 Velocidades iniciales de hidrólisis alcanzadas con distintos tiempos de pretratamiento con vapor

V.1.2.3 Tamaño de partícula

A partir de la expresión (5.3) se ha determinado la conversión de la fracción hemicelulósica para los residuos sólidos obtenidos en los experimentos de esta serie en la que se ha variado el tamaño de partícula del residuo de poda. De igual forma, a partir de la expresión (5.4) se ha determinado que no existe transformación de la celulosa y por tanto, la conversión fraccional referida a esta fracción es cero en estos experimentos.

La Tabla V.9 recoge la conversión de hemicelulosa, con un valor máximo de 40,8% para la hidrólisis realizada con el menor tamaño medio de partícula, 75 μm , en dicho experimento el residuo de poda ha sido sometido a un pretratamiento físico más fuerte en la operación de molienda. Se observa que la conversión aumenta conforme disminuye el tamaño de partícula. Este resultado se podría justificar considerando que al disminuir el tamaño de partícula se aumenta al menos el área superficial externa y con ello el número de centros activos donde el enzima puede reaccionar.

TABLA V.9
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA. EFECTO DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

Conversión fraccional, rendimientos en
 azúcares reductores totales y D-glucosa

$t_p = 2 h$	$pH = 4,8$	$T_H = 318 K$	$(E/S)_0 = 0,002$	$EC/EH = 2/1$
	$d_p, \mu m$	$X_H, \%$	$Y_T 10^2, kg/kg$	$Y_G 10^2, kg/kg$
HED-1	75	40,8	14,18	6,94
HED-2	213	33,5	11,95	5,53
HED-3	363	26,2	11,76	5,02
HEP-3	513	21,4	11,13	4,91

En la Figura V.12 se observa cómo los rendimientos apenas sufren variación en los tamaños medios de partícula de 513, 363 y 213 μm , sin embargo para el diámetro medio de 75 μm sí se aprecia una subida considerable, llegando a alcanzar valores de 0,14 y 0,069 kg/kg, para azúcares reductores totales y D-glucosa, respectivamente.

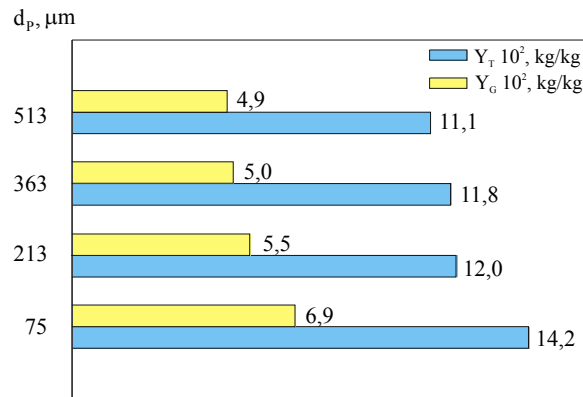


Fig. V.12 Rendimientos en azúcares reductores totales y D-glucosa alcanzados con distintos tamaños de partícula

Teniendo en cuenta la ecuación (5.6), en la Figura V.13 se ha representado $\log(s-s_0)$ vs $\log t$, para la hidrólisis realizada con residuo de poda de olivo de tamaño de partícula 213 μm (HED-2); se observa, en principio, una aceptable relación lineal entre ambas magnitudes en el intervalo 0-240 min. Posteriormente, mediante ajuste por mínimos cuadrados

de los valores del primer miembro frente al logaritmo del tiempo, se han podido determinar los parámetros m y z , valores que sustituidos en la ecuación (5.5) conducen a la expresión:

$$s - s_0 = 1,294 t^{2,66} \quad (5.14)$$

a la que corresponde la línea recta de la Figura V.13.

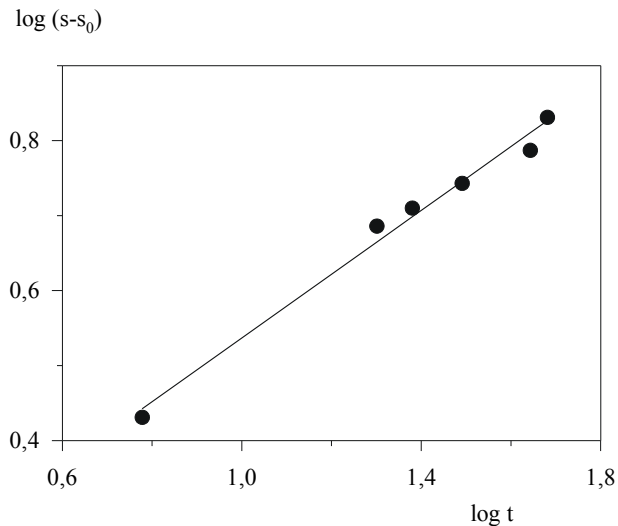


Fig. V.13 Reproducción con la ecuación (5.6) del experimento HED-2 (●)

Una vez que se han determinado las velocidades de hidrólisis, r , utilizando un tiempo muy próximo a cero ($t = 1$ s) se obtienen los valores de r_0 para cada experimento, que se muestran en la Figura V.14. Se observa que las velocidades de hidrólisis más elevadas se alcanzan con los tamaños de partícula más pequeños. Este hecho concuerda con el rendimiento obtenido para el tamaño medio de partícula de $75 \mu\text{m}$, pero difiere cuando $d_p = 213 \mu\text{m}$ ya que cabría pensar, en principio, que a mayor velocidad de hidrólisis se obtendrían mayores rendimientos en azúcares, siempre que el tiempo de proceso sea igual.

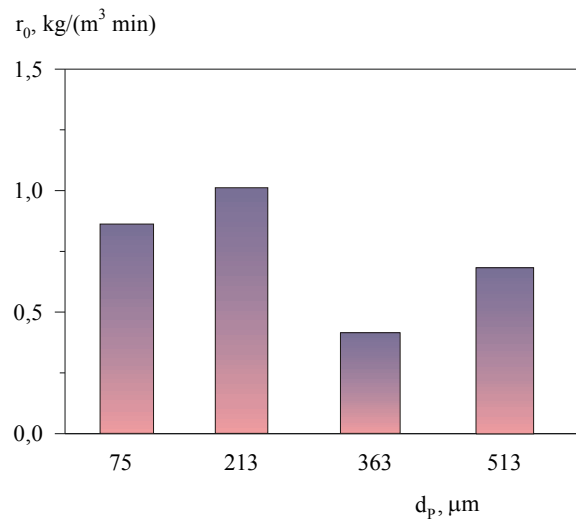


Fig. V.14 Velocidades iniciales de hidrólisis alcanzadas para los experimentos realizados con distintos tamaños de partícula

V.1.2.4 Relación enzima/sustrato

En esta serie de hidrólisis enzimática la concentración de sustrato y la relación sólido/líquido se ha mantenido constante en todos los experimentos, de modo que para variar la relación enzima/sustrato lo que se ha modificado ha sido la concentración de enzima, empleando distintas cantidades de enzima para una cantidad fija de sustrato.

Dado el carácter específico y selectivo de las enzimas, podemos tener la certeza de que la fracción de lignina no se hidroliza, y basándonos en las composiciones de los distintos residuos sólidos obtenidos tras las hidrólisis que se recogen en la Tabla IV.25 para esta serie, se ha determinado la degradación de la única fracción que resulta parcialmente hidrolizada, la hemicelulosa, de acuerdo con la ecuación (5.3).

TABLA V.10
**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA. EFECTO DE
 LA RELACIÓN ENZIMA/SUSTRATO**

Conversión fraccional, rendimientos en
 azúcares reductores totales y D-glucosa

	<i>t_p = 2 h pH = 4,8 T_H = 318 K EC/EH = 2/1 d_p = 513 μm</i>			
	(E/S) ₀	X _H , %	Y _T 10 ² , kg/kg	Y _G 10 ² , kg/kg
HEE/S-1	0,000	11,2	6,65	1,35
HEP-3	0,002	21,5	11,13	4,91
HEE/S-3	0,005	29,1	12,98	6,44
HEE/S-4	0,010	20,1	11,47	8,46

Tal y como se ha indicado anteriormente, la fracción de hemicelulosa se hidroliza con bastante facilidad, lo que se pone de manifiesto en la Tabla V.10 donde se observa cómo incluso para la hidrólisis realizada sin enzimas, se hidroliza un 11,2% de hemicelulosa, aumentando de manera importante dicha conversión al incrementar la concentración de enzimas.

Con respecto a los rendimientos en azúcares reductores y D-glucosa el comportamiento es similar, alcanzando valores próximos a 0,067 y 0,014 kg/kg cuando no interviene enzima alguno e incrementándose estos valores con la concentración de enzima, Figura V.15, fundamentalmente en relación al rendimiento en D-glucosa. Este hecho se podría justificar si se considera que la relación celulasas/hemicelulasas es el doble para cada relación (E/S) inicial. En este sentido, es necesario destacar que a la relación (E/S)₀ más alta, los rendimientos en azúcares reductores totales (Y_T = 0,11 kg kg⁻¹) y en D-glucosa (Y_G = 0,085 kg kg⁻¹) se aproximan lo cual puede indicar que en la fracción celulósica ha existido cierta conversión fraccional, al menos en relación a la celulosa amorfa.

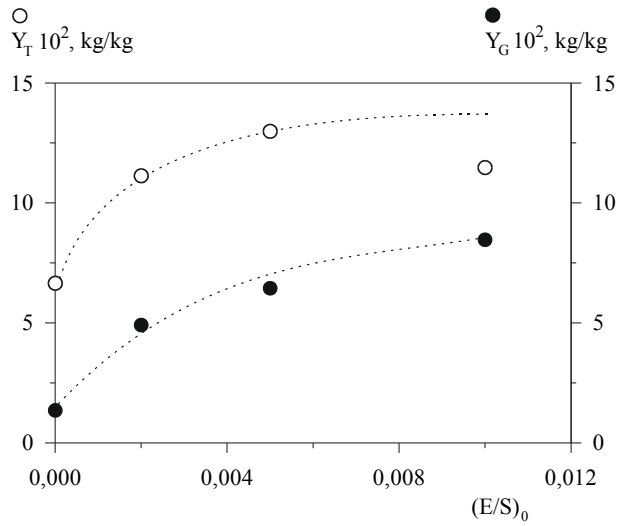


Fig. V.15 Rendimientos en azúcares reductores totales y D-glucosa alcanzados con distintas relaciones enzima/sustrato

Por un procedimiento análogo al descrito en apartados anteriores, mediante representaciones gráficas similares a las que se muestran en la Figura V.16 para dos experimentos de esta serie, y empleando las ecuaciones (5.5) a (5.7) se han calculado los valores de las velocidades de hidrólisis a tiempos próximos a cero ($t = 1$ s), deduciéndose los valores de r_0 que se recogen en la Tabla V.11.

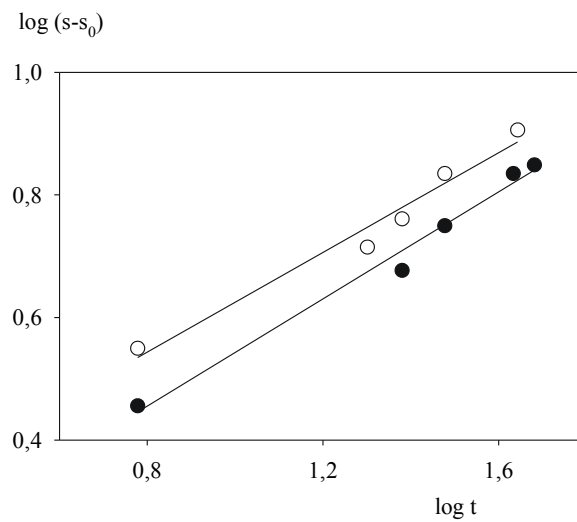


Fig. V.16 Reproducción con la ecuación (5.6) de los experimentos HEP-3 (●) y HEE/S-4 (○)

TABLA V.11
VELOCIDADES INICIALES DE HIDRÓLISIS
OBTENIDAS CON DISTINTAS RELACIONES ENZIMA/SUSTRATO

(E/S) ₀	0,000	0,002	0,005	0,010
r ₀ , kg/(m ³ min)	0,000	0,935	2,168	1,449

A partir de la ecuación de Michaelis-Menten y considerando, en lugar de la concentración de sustrato, la relación inicial enzima/sustrato, se puede obtener la siguiente ecuación:

$$r_0 = \frac{r_{\text{máx}} (E/S)_0}{(E/S)_0 + K_m} \quad (5.15)$$

Si (E/S)₀ es muy pequeño, entonces la ecuación (5.15) se puede expresar de la siguiente forma:

$$r_0 = \frac{r_{\text{máx}} (E/S)_0}{K_m} \quad (5.16)$$

Esta última ecuación está plenamente justificada cuando (E/S)₀ « K_m, y una representación de r₀ frente a (E/S)₀ debe conducir a una línea recta de pendiente r_{máx}/K_m. En esta investigación, este hecho se manifiesta con claridad hasta una relación (E/S)₀ ≤ 0,005 tal cómo se puede observar en la Figura V.17, obteniéndose la expresión:

$$r_0 = 431,85 (E/S)_0 \quad r^2 = 0,999 \quad (5.17)$$

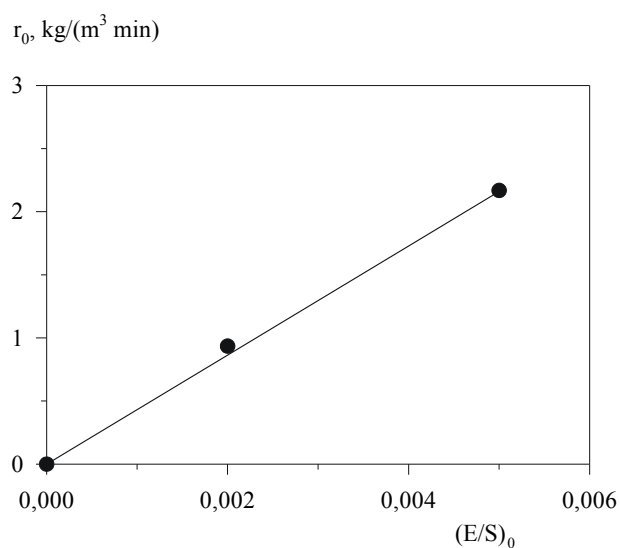


Fig. V. 17 Velocidades iniciales de hidrólisis alcanzadas a distintas relaciones enzima/sustrato

V.1.2.5 Relación celulasas/hemicelulasas

Con objeto de determinar la relación óptima entre las enzimas empleadas, celulasas y hemicelulasas, se procede a realizar una serie en la se modifica ese parámetro. La Figura V.18 pone de manifiesto cómo con la relación 2/1 se obtienen los mejores Y_T e Y_G , alcanzando valores de 0,13 y 0,062 kg/kg, respectivamente.

TABLA V.12
**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA. EFECTO DE LA
 RELACIÓN CELULASAS/HEMICELULASAS**

Conversión fraccional, rendimientos en
 azúcares reductores totales y D-glucosa

$t_p = 3 h$ $pH = 4,8$ $T_H = 318 K$ $(E/S)_0 = 0,002$ $d_p = 513 \mu m$

	EC/EH	$X_H, \%$	$Y_T 10^2, \text{kg/kg}$	$Y_G 10^2, \text{kg/kg}$
HEC/H-1	2/0	26,0	10,67	5,07
HEC/H-2	3/1	42,5	11,34	5,00
HEP-4	2/1	29,1	13,26	6,16
HEC/H-3	1/1	28,3	12,47	5,37
HEC/H-4	0/2	29,3	9,87	4,24

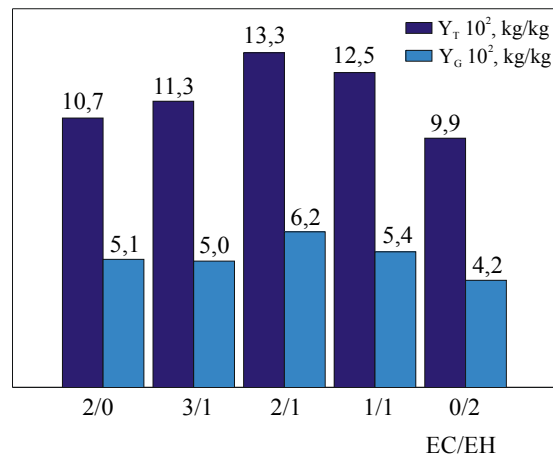


Fig. V.18 Rendimientos en azúcares reductores totales y D-glucosa alcanzados con distintas relaciones de enzimas celulasas/hemicelulasas

Mediante ajuste por mínimos cuadrados se han determinado los parámetros m y z de la ecuación (5.5) para los cinco experimentos de esta serie. A modo de ejemplo se muestran en la Figura V.19 los ajustes realizados para las hidrólisis realizadas con una relación celulasas/hemicelulasas de 2/0 (HEC/H-1) y de 3/1 (HEC/H-2). En dicha figura los puntos representan valores experimentales y las líneas rectas corresponden a los ajustes que como puede verse resultan aceptables en los intervalos de tiempo considerados.

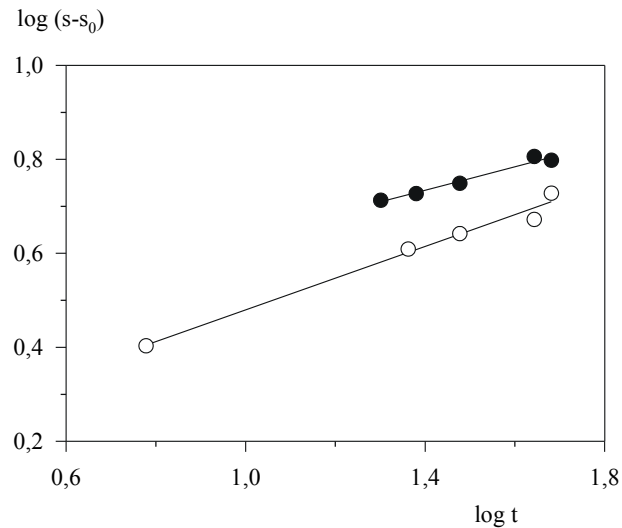


Fig. V.19 Reproducción con la ecuación (5.6) de los experimentos HEC/H-1 (○) y HEC/H-2 (●)

Tras obtener una expresión para la velocidad de hidrólisis según la ecuación (5.7), se determinan las velocidades iniciales de hidrólisis, r_0 , representadas en la Figura V.20. Se observa que los valores más elevados de r_0 se alcanzan cuando existe una proporción elevada de uno de las enzimas. Sólo cuando la relación EC/EH es 3/1 se detecta un cierto efecto sinérgico entre ambas enzimas.

Estos valores máximos de r_0 , próximos a $5 \text{ kg}/(\text{m}^3 \text{ min})$ para las relaciones EC/EH de 3/1 y 0/2, son del mismo orden que los determinados por Belkacemi y Hamoudi (2003) en la hidrólisis de tallos de maíz, utilizando una mezcla de enzimas constituidas por celulasas y β -D-xilosidasas. Estos autores determinan que las velocidades máximas son dependientes de la concentración de celulasas mediante una ecuación tipo potencial, determinando valores de velocidades de hidrólisis máximas en el rango aproximado de 0,05 a $5,0 \text{ kg}/(\text{m}^3 \text{ min})$.

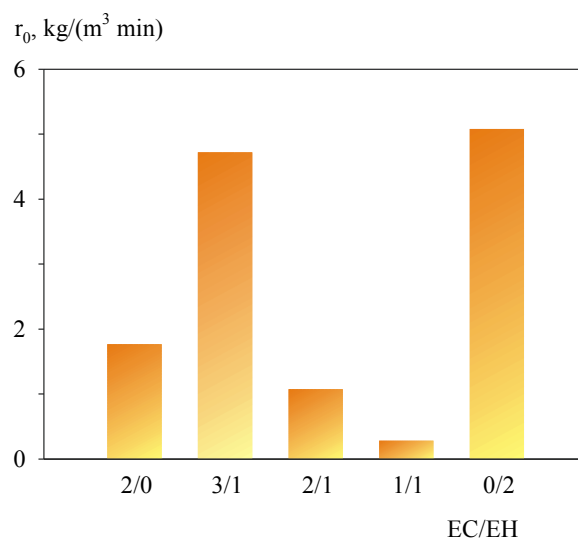


Fig. V. 20 Velocidades iniciales de hidrólisis en los experimentos realizados con distintas relación entre enzimas

V.1.2.6 pH de operación

En la Tabla IV.31 se recoge la composición química de los distintos residuos sólidos que resultan tras el proceso de hidrólisis en los experimentos realizados a diferentes pH. Al igual que en las series anteriores, partiendo de la hipótesis de que la lignina permanece inalterada, y a partir de la ecuación (5.3), se han determinado las conversiones referidas a la fracción de hemicelulosa para las hidrólisis enzimáticas de esta serie, Tabla V.13.

TABLA V.13
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA. INFLUENCIA DEL pH

Conversión fraccional, rendimientos en
 azúcares reductores totales y D-glucosa

$$t_p = 3 \text{ h} \quad T_H = 318 \text{ K} \quad (E/S)_0 = 0,002 \quad EC/EH = 2/1 \quad d_p = 513 \mu\text{m}$$

	pH	X _H , %	Y _T 10 ² , kg/kg	Y _G 10 ² , kg/kg
HEpH-1	2,5	17,5	11,45	2,80
HEpH-2	3,5	17,3	9,44	3,15
HEpH-3	4,0	18,8	11,68	3,42
HEpH-4	4,4	10,9	13,10	4,25
HEP-4	4,8	29,1	13,26	6,16
HEpH-5	5,5	16,6	11,09	3,93

Se observa cómo la máxima conversión de hemicelulosa corresponde a un pH de operación de 4,8, con un valor de 29,1 %. Este hecho también queda patente en la Figura V.21 donde puede apreciarse un máximo en el rendimiento de azúcares correspondiente al intervalo de pH 4,4-4,8.

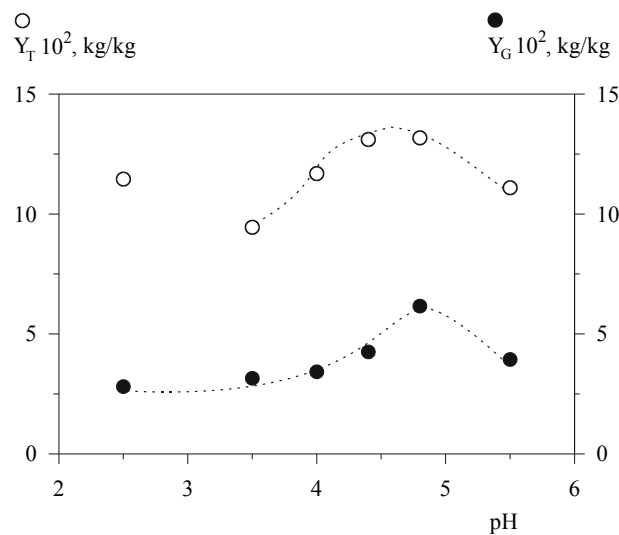


Fig. V.21 Rendimientos en azúcares reductores totales y D-glucosa alcanzados a distintos pH de operación

Para estudiar la cinética de la hidrólisis enzimática, en esta serie realizada a diferentes pH del medio de operación, se ajustan los valores de sustrato frente al tiempo de operación, tomando logaritmos, según la ecuación (5.6). La Figura V.22 muestra el ajuste realizado para las hidrólisis efectuadas a pH 2,5 (HEpH-1) y 5,5 (HEpH-5).

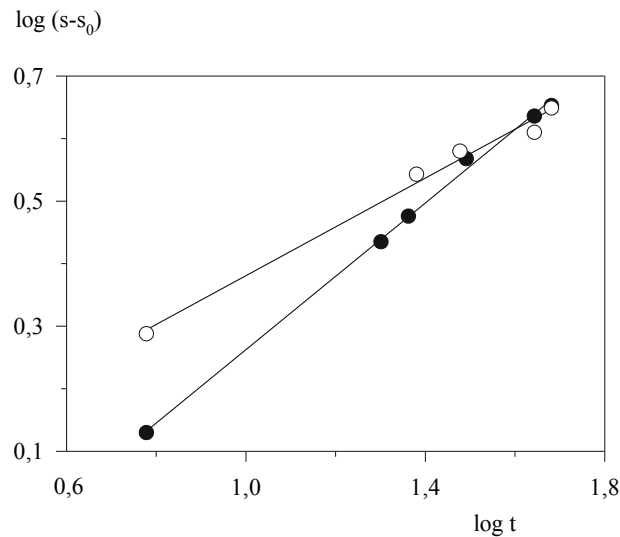


Fig. V.22 Reproducción con la ecuación (5.6) de los experimentos HEpH-1 (●) y HEpH-5 (○)

La variación observada en los valores de la velocidad de hidrólisis con el pH se ha tratado de ajustar a una ecuación que es característica de la cinética enzimática y que está plenamente establecida,

$$r_0 = \frac{r_{\text{máx}}}{1 + \frac{A_1}{[\text{H}_3\text{O}^+]} + B_1 [\text{H}_3\text{O}^+]}$$
 (5.18)

donde $r_{\text{máx}}$ es la velocidad de hidrólisis máxima y A_1 , B_1 , constantes de equilibrio de disociación de diferentes etapas del mecanismo supuesto para la obtención de la ecuación cinética.

Para la aplicación de esta ecuación se recurre a determinar la velocidad de hidrólisis en cada uno de los experimentos en un tiempo próximo a $t = 0$ (r_0). Posteriormente, mediante regresión no lineal de los valores de r_0 frente al pH, utilizando el programa estadístico SIGMA-PLOT, se han obtenido los valores de las tres constantes características del modelo, que junto con el sumatorio de los residuos de los cuadrados (SSQ) se indican en la Tabla V.14.

TABLA V.14
PARÁMETROS CINÉTICOS

$r_{\text{máx}}$, kg/(m ³ min)	A_1 , kmol/m ³	B_1 , m ³ /kmol	SSQ
1,645	$2,40 \cdot 10^{-6}$	$1,39 \cdot 10^4$	0,12

Con los valores de los tres parámetros y utilizando la ecuación (5.18), en la misma Figura V.23 se reproduce la curva proporcionada por el modelo (mediante una línea continua). Como se observa el ajuste es aceptable en el rango de pH ensayado.

Por otra parte, a partir de estos resultados puede calcularse el pH óptimo,

$$[\text{H}_3\text{O}^+]_{\text{óp}} = \sqrt{\frac{A_1}{B_1}} \quad (5.19)$$

que resulta igual a 4,88. Sustituyendo este valor en la ecuación (5.18) se obtiene la velocidad de reacción correspondiente al máximo que resulta ser 1,21 kg/(m³ min), coincidiendo con la observada experimentalmente.

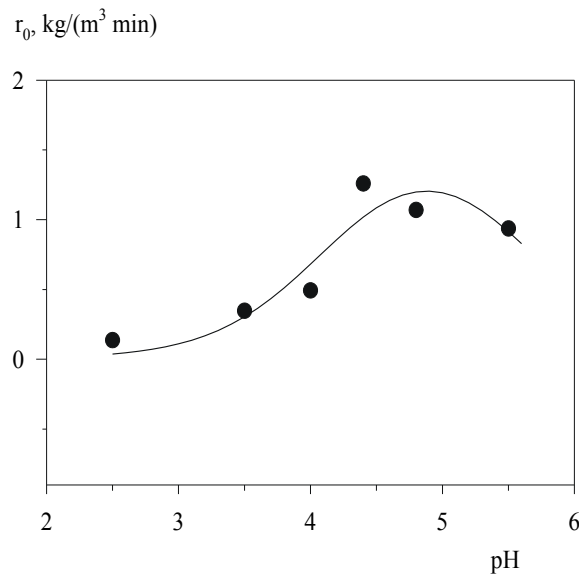


Fig. V.23 Ajuste de las velocidades iniciales de hidrólisis a diferentes pH de operación de acuerdo con la ecuación (5.18)

V.1.2.7 Temperatura de hidrólisis

En esta serie se ha estudiado la influencia que tiene la temperatura sobre la hidrólisis enzimática, en cuanto a conversión de la fracción hemicelulósica y sobre el rendimiento en azúcares reductores totales y en D-glucosa, Tabla V.15.

La conversión fraccional, X_H , se ha calculado a partir de la ecuación (5.3) considerando el contenido de hemicelulosa al principio y al final de la hidrólisis. Los valores de X_H se recogen en la Tabla V.15 donde se observa una conversión máxima a la temperatura de 318 K, con un valor de 29,1%. Esta mayor actividad enzimática a 318 K también se pone de manifiesto en los rendimientos en azúcares reductores totales y D-glucosa tal y como se aprecia en la Figura V.24, con valores máximos de 0,13 y 0,062 kg/kg.

TABLA V.15
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA. EFECTO DE LA TEMPERATURA
Conversión fraccional, rendimientos en
azúcares reductores totales y D-glucosa

$t_p = 3 h$ $pH = 4,8$ $(E/S)_0 = 0,002$ $EC/EH = 2/1$ $d_p = 513 \mu m$				
	T_H , K	X_H , %	Y_T 10 ² , kg/kg	Y_G 10 ² , kg/kg
HET-1	303	4,4	9,89	2,79
HET-2	308	2,8	13,40	3,13
HET-3	313	11,9	12,70	4,17
HEP-4	318	29,1	13,26	6,16
HET-4	323	9,9	11,86	3,66
HET-5	328	4,3	9,03	2,52
HET-6	333	0,0	10,93	2,79

van Wyk (1997b) indica que a bajas temperaturas la estructura cristalina de los enzimas es más rígida y su movilidad por tanto es menor, mientras que a temperaturas altas, la actividad enzimática decae bruscamente y, como proteínas que son, a partir de 333 K puede que se haya iniciado el proceso de desnaturalización.

La velocidad relativa de adsorción y sacarificación (actividad enzimática) se incrementa con la temperatura; a 333 K la adsorción de celulasas aumenta mientras que la actividad enzimática decrece ya que comienzan a desnaturalizarse.

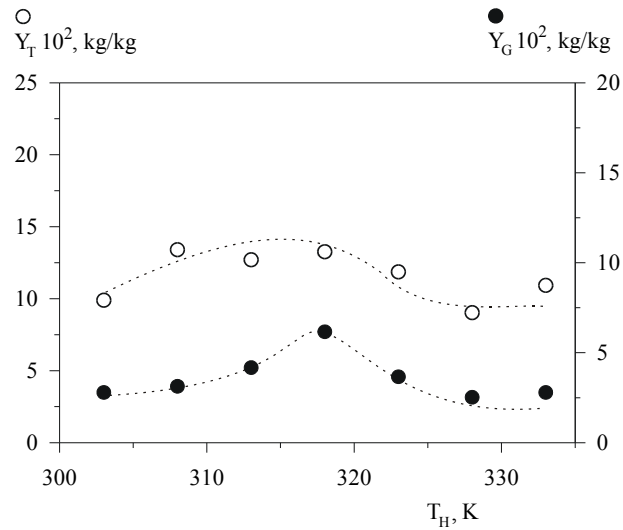


Fig. V.24 Rendimientos en azúcares reductores totales y D-glucosa alcanzados a distintas temperaturas de hidrólisis

Mediante representación gráfica, $\log (s-s_0)$ vs $\log t$, se determinan los parámetros m y z de la ecuación (5.7) para cada uno de los experimentos de la serie, lo cual permite obtener una expresión para la velocidad de hidrólisis, r , en cada uno de ellos. La Figura V.25 muestra, como ejemplo, el ajuste de las hidrólisis realizadas a las temperaturas de 313 y 333 K, observándose una aceptable concordancia entre los valores experimentales y la ecuación empírica propuesta (representada por una línea continua).

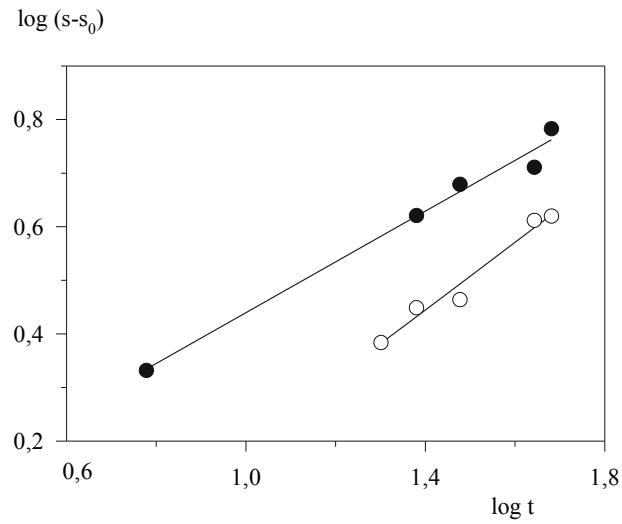


Fig. V.25 Reproducción con la ecuación (5.6) de los experimentos HET-3 (●) y HET-6 (○)

Determinadas las velocidades de hidrólisis, r , utilizando un tiempo muy próximo a cero ($t = 1$ s) se obtienen los valores de r_0 para cada experimento, resultados que se muestran en la Figura V.26. Se observa que las velocidades de hidrólisis más elevadas se alcanzan con las temperaturas intermedias del intervalo ensayado, correspondiendo los máximos valores de r_0 a las temperaturas de 318 y 323 K, con valores de 1,07 y 1,20 kg/(m³ min), respectivamente.

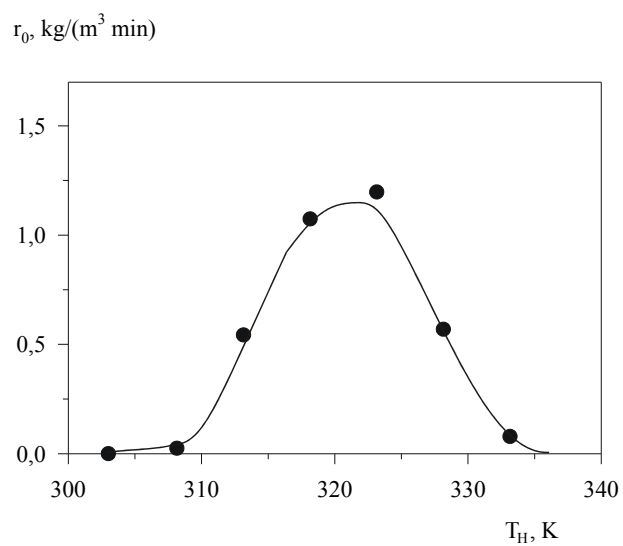


Fig. V.26 Velocidades iniciales de hidrólisis alcanzadas a distintas temperaturas

V.2 FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS CON *Pachysolen tannophilus*

El residuo de poda de olivo tras ser sometido a distintos procesos hidrolíticos, tanto con disoluciones ácidas como con enzimas, conduce a unos hidrolizados ácidos o enzimáticos, respectivamente, que, una vez acondicionados se fermentan con la levadura *Pachysolen tannophilus*.

V.2.1 F. de hidrolizados de ácido sulfúrico

Se ha estudiado la fermentación de hidrolizados de ácido sulfúrico procedentes de experimentos realizados a distintas concentraciones de ácido y a diferentes temperaturas.

V.2.1.1 Influencia de la concentración de ácido

En las Tablas IV.37 a IV.41 del apartado de resultados experimentales se recoge, para cada experimento de esta serie, la evolución en las concentraciones de biomasa, sustrato residual, etanol, xilitol y ácido acético, resultados representados en las Figuras IV.1 a IV.5.

A) Formación de biomasa

En un biorreactor discontinuo se lleva a cabo la inoculación y a partir de ese momento el número de células viables se va modificando con el tiempo. Ese crecimiento comienza con una fase de latencia o fase "lag" en la que el microorganismo adapta sus sistemas enzimáticos para metabolizar el nuevo sustrato. La duración de esta fase, en la que el microorganismo se desarrolla, depende generalmente de las diferencias existentes entre las condiciones del inóculo y las del medio.

A continuación tiene lugar la fase de crecimiento exponencial, etapa en la que el número de células aumenta exponencialmente con el tiempo, lo que puede cuantificarse mediante la ecuación:

$$x = x_1 e^{\mu_m t} \quad (5.20)$$

donde x_1 corresponde a la concentración de biomasa al inicio de la fase exponencial. Esta ecuación se puede expresar de la forma:

$$\ln \left[\frac{x}{x_1} \right] = \mu_m t \quad (5.21)$$

con lo que una representación de los valores del primer miembro frente al tiempo debe conducir a una línea recta que pasa por el origen de coordenadas, de cuya pendiente puede evaluarse el valor de la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m . Puesto que x_1 no es un valor conocido previamente, la ecuación (5.21) puede modificarse según:

$$\ln \left[\frac{x}{x_0} \right] = a + \mu_m t \quad (5.22)$$

donde se ha sustituido x_1 por la concentración de biomasa al inicio del experimento, x_0 , que sí es conocida *a priori*. De esta forma, aparece una ordenada en el origen no nula, a , que sería igual a cero en el caso en que la fase lag fuese totalmente despreciable, ya que x_1 tendería a x_0 .

En la Figura V.27 se muestran dos curvas de crecimiento, $\ln (x/x_0)$ vs t , correspondientes a los experimentos procedentes de hidrolizados con concentraciones 2 y 4 N de ácido sulfúrico pudiendo apreciarse en línea continua la bondad del ajuste para la fase exponencial de cada experimento.

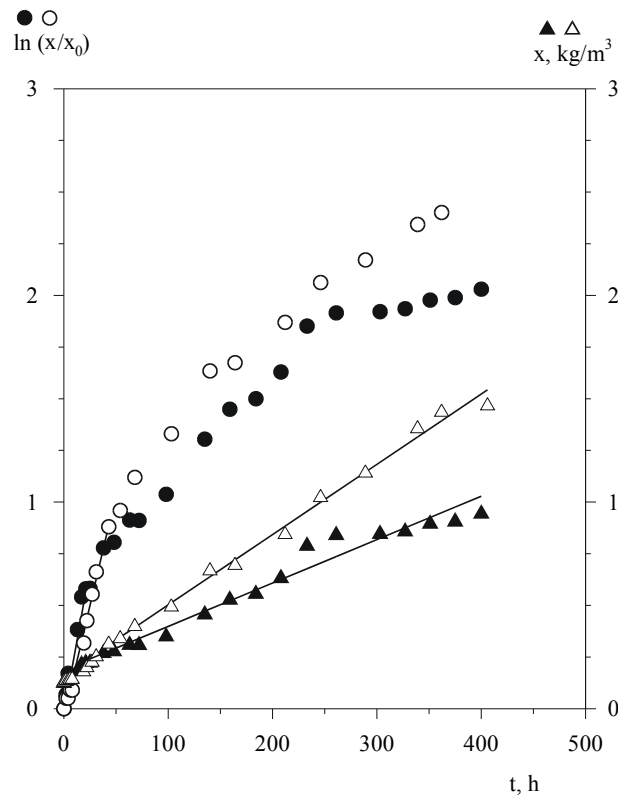


Fig.V.27 Curvas de crecimiento de los cultivos FS4 (●, ▲) y FS5 (○, △)

Mediante representaciones análogas para cada experimento de la serie se han determinado las velocidades específicas máximas de crecimiento, μ_m , ajustando por mínimos cuadrados los valores experimentales a la ecuación (5.22). En la Tabla V.16 se recogen los valores de μ_m obtenidos, junto con los correspondientes coeficientes de regresión lineal, r^2 , apreciándose que los ajustes, en general son aceptables.

TABLA V.16
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO
 Influencia de la concentración de H₂SO₄
 pH = 3,5 T_F = 303 K

Expto	C _A , N	μ _m , h ⁻¹	r ²	b, kg/(m ³ h)	r ²
FS1	0,5	0,017	0,994	0,0034	0,979
FS2	0,75	0,026	0,982	0,0032	0,985
FS3	1,0	0,019	0,992	0,0024	0,951
FS4	2,0	0,028	0,985	0,0021	0,964
FS5	4,0	0,022	0,989	0,0034	0,994

En los cultivos de esta serie se pone de manifiesto que la fase lag es prácticamente despreciable comenzando, por tanto, la fase exponencial al principio del cultivo.

En la Tabla V.16 se observa que no existen grandes variaciones en los valores de μ_m, oscilando entre 0,017 h⁻¹ para el experimento procedente del hidrolizado con ácido sulfúrico 0,5 N (expto FS1) y 0,028 h⁻¹ cuando se trata de hidrólisis con ácido sulfúrico 2 N (expto FS4).

En una fermentación discontinua el número de células no puede aumentar de forma indefinida, por lo tanto, a la fase de crecimiento exponencial descrita le sigue una fase de desaceleración, en la que algún nutriente del medio de cultivo empieza a limitar el crecimiento.

En esta investigación se ha comprobado que, para esta etapa puede admitirse un crecimiento lineal durante un intervalo de tiempo relativamente amplio, por lo que se podría cuantificar en la forma:

$$x = c + b t \quad (5.23)$$

donde b representa la productividad en biomasa, kg/(m³ h), durante ese período de tiempo.

Esta fase lineal, que sigue al período de crecimiento exponencial, se pone de manifiesto en los datos proporcionados por diferentes autores, Jeffries (1982) y Detroy *et al.* (1982), y es característica de las fermentaciones cinéticamente controladas por etapas de naturaleza física. Así, Slininger *et al.* (1982), en la fermentación de disoluciones de D-xilosa con

P. tannophilus, determinaron que la concentración de oxígeno disuelto se anula rápidamente al final de la fase exponencial, incluso cuando se airea el medio de cultivo, por lo que el crecimiento celular llega a estar limitado por la disponibilidad de oxígeno en el medio de forma que el control cinético reside en la transferencia de oxígeno en la suspensión de células.

Los valores de biomasa obtenidos experimentalmente se han representado frente al tiempo para cada uno de los cultivos, x vs t , con objeto de establecer el intervalo de tiempo en que el crecimiento es lineal. En la Figura V.27 se muestran como ejemplo dos de estas representaciones correspondientes a los experimentos FS4 y FS5, donde la línea continua corresponde al ajuste del tramo lineal.

De esta forma, se ha establecido para cada experimento la duración de la fase lineal y se han determinado los valores de la productividad en biomasa en esta etapa, b , mediante ajuste por mínimos cuadrados de los datos experimentales a la ecuación (5.23). En la Tabla V.16 se recogen los valores de b obtenidos para esta serie, junto con los correspondientes coeficientes de regresión lineal, r^2 , apreciándose que los ajustes son, en general, aceptables. En este período de comportamiento lineal el valor de la productividad en biomasa, para los experimentos realizados, varía en el rango 0,0021-0,0034 kg/(m³ h) sin llegar a observarse una tendencia definida.

Posteriormente a la fase de desaceleración, tiene lugar una fase estacionaria, en la que el nivel de biomasa que se alcanza es máximo y prácticamente constante durante un intervalo de tiempo determinado, estabilización que puede atribuirse a varios factores. En primer lugar, puede producirse un agotamiento del sustrato o de otros nutrientes necesarios para el crecimiento y esto supone que existe un metabolismo endógeno en el que las células metabolizan su propio protoplasma para mantenerse vivas. Otra posibilidad es que el crecimiento disminuya llegando a detenerse al aumentar la concentración en el medio de algún inhibidor. Por último, la posibilidad más frecuente es que las velocidades de crecimiento y de muerte del microorganismo se contrarresten durante cierto tiempo. En este último caso, la lisis de las células muertas libera carbohidratos, aminoácidos y otros componentes que pueden ser usados por las células activas para mantener su población, aunque la biomasa no puede sustentarse a sí misma de forma indefinida y por ello la fase estacionaria suele ser de duración relativamente reducida.

Con frecuencia se ha observado que, una vez consumido el sustrato, el propio bioproducto formado disminuía su concentración con el tiempo, lo que indica que éste era consumido por las células viables; es decir, que durante parte de la fase estacionaria, el sustrato utilizado por la levadura era el propio bioproducto de la fermentación.

Finalmente, sucede una fase de muerte en la que se detecta un descenso neto de la población microbiana, ya que el número de células que mueren en la unidad de tiempo es superior al de las que se generan. En este trabajo se han dado por concluidos los experimentos en la fase estacionaria, puesto que el sustrato no se sigue consumiendo y los bioproductos ya se han formado en su máxima concentración.

B) Consumo de sustrato

El consumo de sustrato ha sido estudiado a través de la determinación de dos parámetros: velocidad específica de consumo de sustrato, q_g y q_s , y rendimiento global en biomasa $Y_{x/s}^G$ y $Y_{x/g}^G$.

En la fermentación de los hidrolizados se ha observado una utilización secuencial de los dos azúcares mayoritarios; durante una primera fase *P. tannophilus* asimila D-glucosa hasta prácticamente su consumo total, iniciándose posteriormente la utilización de D-xilosa y del resto de los azúcares. Por tanto, q_g e $Y_{x/g}^G$ corresponden a esa primera etapa del cultivo en la que el sustrato consumido es D-glucosa y, una vez consumida esta, el microorganismo empieza a consumir el resto de azúcares presentes en el medio, fundamentalmente D-xilosa.

Para determinar la velocidad específica de consumo de sustrato, q_s , se ha aplicado inicialmente el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos. La velocidad de consumo de sustrato se define por:

$$q_s = \frac{1}{x} \frac{d(s_0 - s)}{dt} = - \frac{1}{x} \frac{ds}{dt} \quad (5.24)$$

por lo que para su determinación directa por el método diferencial es necesario evaluar la velocidad de consumo de sustrato por unidad de volumen (tasa volumétrica de consumo de sustrato, $d(s_0 - s)/dt$) a cada tiempo y posteriormente dividir por la concentración de biomasa, x . La dificultad intrínseca de un método diferencial reside en la evaluación de esta derivada. Se podría aplicar un método gráfico pero, cuando el número de puntos experimentales no es muy elevado, el trazado de la curva $(s_0 - s)$ es dificultoso y la precisión en la evaluación de la pendiente es pequeña. Por este motivo, se ha decidido realizar un ajuste empírico de los datos experimentales a una ecuación que proporcione la variación de la concentración de sustrato con el tiempo y después, analíticamente, calcular la derivada.

En las fermentaciones discontinuas se observa un comportamiento característico en cuanto al consumo de sustrato. En las primeras fases del crecimiento, su concentración disminuye lentamente para, a continuación, descender de forma brusca hasta que se encuentra muy agotado, momento a partir del cual vuelve a disminuir lentamente. Este hecho determina que sea difícil ajustar todo el intervalo mediante ecuaciones simples (tipo exponencial, potencial o parabólica), con las que sólo se consigue la reproducción en intervalos de tiempo reducidos. Por ello, se han ensayado expresiones algo más complejas como:

$$s = s_0 \alpha^{-t^\beta} \quad (5.25)$$

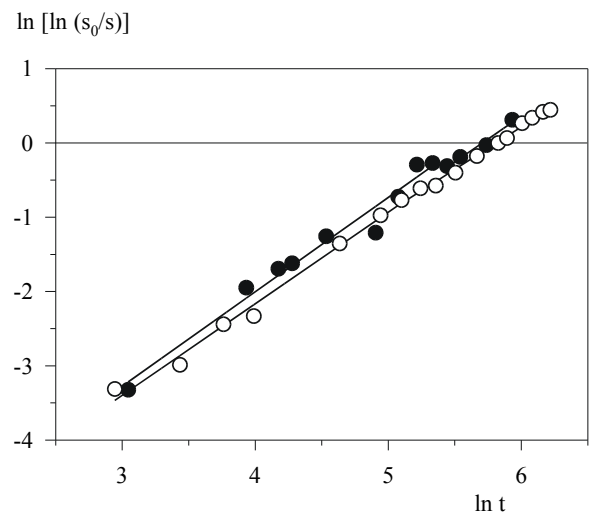
que cumple con la condición inicial de que para $t = 0$, $s = s_0$. Esta ecuación es la que permite obtener una mejor reproducibilidad de los datos de sustrato en mayores intervalos de tiempo.

Si se linealiza esta ecuación en la forma:

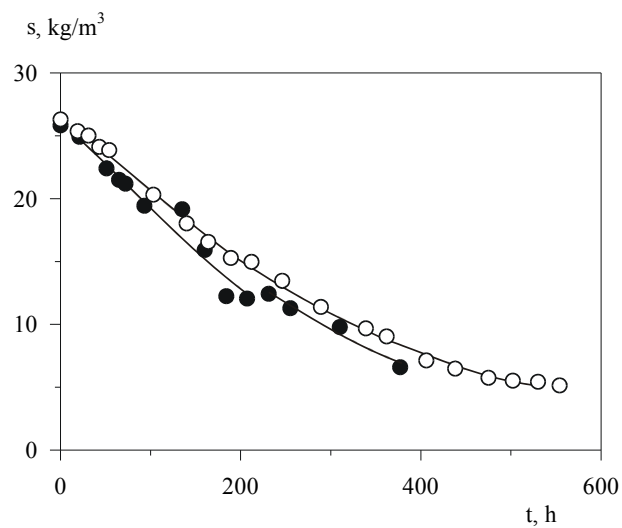
$$\ln \left(\ln \frac{s_0}{s} \right) = \ln(\ln \alpha) + \beta \ln t \quad (5.26)$$

se pueden determinar los parámetros α y β , mediante ajustes por mínimos cuadrados de los valores del primer miembro frente a los del logaritmo neperiano del tiempo.

Como ejemplo de los ajustes realizados, en la Figura V.28 (a) se recogen las representaciones correspondientes a la ecuación (5.26) para los experimentos FS3 y FS5. En esta figura se distinguen dos intervalos, correspondientes respectivamente al consumo de D-glucosa y al resto de azúcares del medio, principalmente D-xilosa. Así, se han calculado mediante ajuste por mínimos cuadrados los parámetros α y β de la ecuación (5.25) para cada uno de los intervalos, lo que ha permitido reproducir los datos s - t . A modo de ejemplo, en la Figura V.28 (b) se representan los valores de la concentración de sustrato frente al tiempo para los mismos experimentos. Las líneas continuas corresponden a la ecuación, mientras que los puntos son los valores experimentales s - t , observándose que, en los intervalos de tiempo empleados para los ajustes, la reproducción es aceptable.



(a)



(b)

Fig. V.28 a) Ajuste de los resultados experimentales de sustrato residual para los cultivos FS3 (●) y FS5 (○)
b) Reproducción con la ecuación (5.25) de los mismos cultivos

A partir de la ecuación (5.25) se puede obtener la velocidad específica de consumo de sustrato en función del tiempo determinando la derivada $d(s_0-s)/dt$ y sustituyendo posteriormente en la expresión (5.24):

$$q_s^D = \frac{s_0 \beta (\ln \alpha) (t^{\beta-1}) (\alpha^{-t^\beta})}{x} \quad (5.27)$$

De esta forma se determinan las velocidades específicas de consumo de D-glucosa y sustrato total, q_g^D y q_s^D , respectivamente, en función del tiempo para los distintos experimentos de la serie, valores que se recogen en la Tabla V.17 para varios tiempos de cada cultivo. Las velocidades de consumo de sustrato total corresponden fundamentalmente a D-xilosa que es el azúcar mayoritario en este segundo intervalo. Como se observa, la velocidad específica de consumo de sustrato disminuye en el transcurso de cada experimento, detectándose valores muy superiores en el período correspondiente al consumo de D-glucosa.

TABLA V.17
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO
Influencia de la concentración de H₂SO₄
pH = 3,5 T_F = 303 K

Expto	C _A , N	t, h	q _g ^D	q _g	t, h	q _s ^D	q _s
FS1	0,5	100	0,25	0,14	200	0,025	0,013
					300	0,013	0,0093
FS2	0,75	100	0,085	0,19	200	0,041	0,034
					300	0,022	0,023
FS3	1,0	100	0,17	0,12			
		200	0,081	0,074	300	0,044	0,068
FS4	2,0	100	0,099	0,076			
		200	0,078	0,050	300	0,11	0,09
FS5	4,0	100	0,12	0,12	200	0,057	0,052
					300	0,031	0,037

q, kg/(kg h)

El rendimiento instantáneo en biomasa, $Y_{x/s}$, se puede definir como el cociente entre la biomasa neta producida y el sustrato neto consumido en un instante dado del cultivo, por lo que se podría expresar como:

$$Y_{x/s} = \frac{dx}{d(s_0-s)} \quad (5.28)$$

Si el rendimiento permanece constante a lo largo del experimento, una representación de los valores de $(x-x_0)$ a distintos tiempos frente a (s_0-s) debería conducir a una recta de pendiente $Y_{x/s}$ y de ordenada en el origen nula. Aunque no sea nula, el rendimiento obtenido mediante la pendiente correspondería a todo el experimento (o a parte de él) y podría denominarse medio o global ($Y_{x/s}^G$), para distinguirlo del instantáneo. De forma análoga, se define $Y_{x/g}$ para la primera etapa del crecimiento en la que se genera biomasa a partir de D-glucosa.

Para comprobar si los rendimientos en biomasa permanecen constantes a lo largo del cultivo se han realizado las representaciones correspondientes de $(x-x_0)$ frente a (s_0-s) en todos los experimentos, obteniéndose gráficos como los que se muestran en la Figura V.29, donde pueden apreciarse los dos tramos correspondientes al consumo de D-glucosa en una primera fase, $Y_{x/g}$, y a D-xilosa y resto de azúcares, en una segunda fase, $Y_{x/s}$.

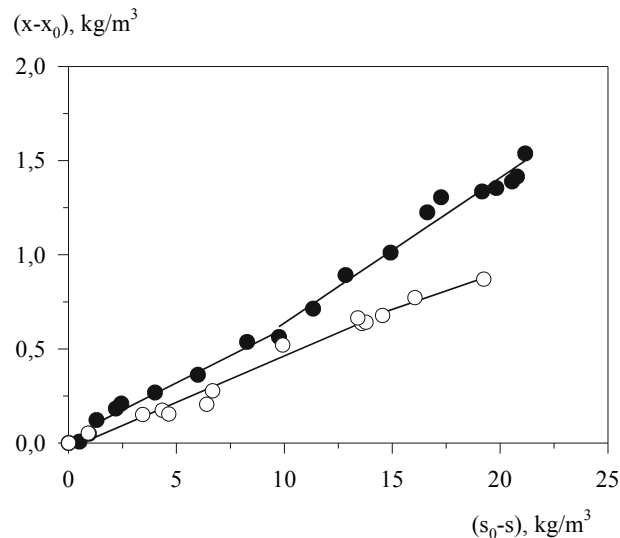


Fig. V.29 Rendimiento en biomasa en los cultivos FS3 (○) y FS5 (●)

En la Tabla V.18 se recogen ambos rendimientos en biomasa para los experimentos de esta serie con los mejores rendimientos para el cultivo procedente de hidrólisis con ácido sulfúrico 0,5 N alcanzando 0,055 y 0,33 kg de biomasa por cada kg de sustrato para $Y_{x/g}^G$ e $Y_{x/s}^G$, respectivamente.

TABLA V.18
RENDIMIENTOS EN BIOMASA
Influencia de la concentración de H_2SO_4
pH = 3,5 $T_F = 303$ K

Expto	C_A, N	$Y_{x/g}^G, \text{ kg/kg}$	$Y_{x/s}^G, \text{ kg/kg}$	$Y_{x/(Ac+s)}^G, \text{ kg/kg}$
FS1	0,5	0,055	0,33	0,12
FS2	0,75	0,049	0,14	0,086
FS3	1,0	0,049	0,040	0,043
FS4	2,0	0,069	0,023	0,049
FS5	4,0	0,058	0,077	----

Cuando el rendimiento en biomasa permanece constante en el transcurso del experimento (por lo tanto $Y_{x/s} = Y_{x/s}^G$) y, si admitimos que no existe mantenimiento celular o que éste es despreciable, a partir de las ecuaciones (5.24) y (5.28) y de la definición de velocidad específica de crecimiento ($\mu = (1/x) dx/dt$) se puede deducir de forma sencilla que:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}^G} \quad (5.29)$$

y de forma análoga,

$$q_g = \frac{\mu}{Y_{x/g}^G} \quad (5.30)$$

Así, con los valores de μ_m y b determinados previamente, Tabla V.16, y conocidos los rendimientos, Tabla V.18, se calculan q_s y q_g .

En la fase exponencial de crecimiento $\mu = \mu_m$, mientras que en el intervalo donde la biomasa tiene un comportamiento lineal, de acuerdo con la ecuación (5.23), se cumplirá que:

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{b}{x} \quad (5.31)$$

ecuación que permite determinar el valor de μ en la fase lineal y con ello q_s para los tiempos comprendidos dentro de este intervalo.

En la Tabla V.17 también se recogen los valores de q_g y q_s determinados por este procedimiento (método integral de tratamiento de datos cinéticos) con el fin de compararlos con los evaluados por el método diferencial, q_g^D y q_s^D , a los mismos tiempos. En general, se detecta una aceptable concordancia entre los valores de las velocidades específicas de consumo de sustrato calculadas por ambos procedimientos.

En el apartado de resultados experimentales se recoge la evolución en las concentraciones de ácido acético a lo largo de cada cultivo poniéndose de manifiesto como *P. tannophilus* asimila dicho compuesto que se encuentra presente en los distintos hidrolizados. Con el fin de definir un rendimiento en biomasa, a partir de los azúcares presentes en el medio (s) y del ácido acético (Ac), se establece que:

$$Y_{x/(s+Ac)} = \frac{d(s+Ac)}{dx} \quad (5.32)$$

En la última columna de la Tabla V.18 aparecen los rendimientos en biomasa a partir de ácido acético y azúcares totales, $Y_{x/(s+Ac)}^G$, para los experimentos de esta serie observándose rendimientos que oscilan entre 0,043 y 0,12 kg/kg. La Figura V.30 muestra el rendimiento en biomasa de la fermentación de los hidrolizados obtenidos con ácido sulfúrico 0,75 y 1 N, considerando el ácido acético como sustrato para el bioproceso.

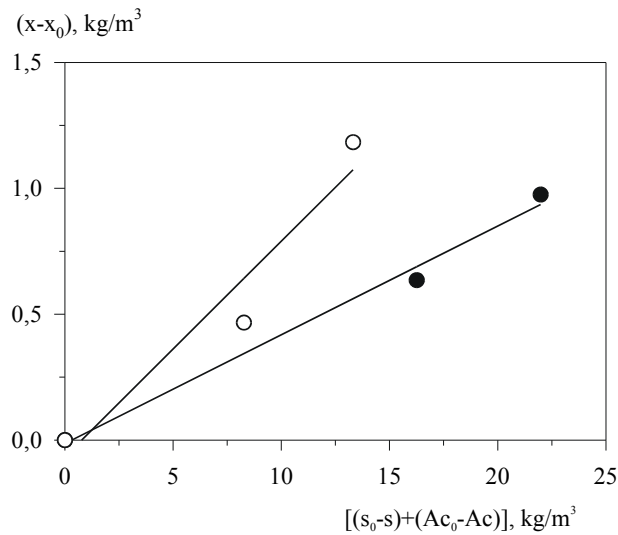


Fig. V.30 Rendimiento en biomasa en los cultivos FS2 (○) y FS3 (●) considerando como sustrato total las concentraciones de azúcares y ácido acético

C) Formación de bioproductos

La formación de los bioproductos mayoritarios, etanol y xilitol, se ha estudiado a través de los siguientes parámetros: velocidad específica de formación de etanol, q_E , rendimientos en etanol, $Y_{E/s}$, y xilitol, $Y_{Xi/s}$.

Para el cálculo de la velocidad específica de producción de etanol, q_E , del mismo modo que para q_s , se ha aplicado en primer lugar el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos. La velocidad específica de producción de etanol se define por:

$$q_E = \frac{1}{x} \frac{dE}{dt} \quad (5.33)$$

La dificultad reside nuevamente en la evaluación de la velocidad de producción de etanol por unidad de volumen, dE/dt . Por las mismas consideraciones realizadas para el cálculo de ds/dt , se ha optado por efectuar un ajuste empírico de los datos E-t de cada experimento que posteriormente permita la determinación analítica de la derivada.

La observación de la variación de los datos de concentración de etanol en función del tiempo pone de manifiesto que, en una primera fase, la concentración aumenta muy lentamente para a continuación hacerlo con gran rapidez hasta alcanzar un valor máximo. Seguidamente, se observa una disminución en la concentración de etanol que, en parte, sería debida a las pérdidas por evaporación, pero que también puede ser atribuible a la capacidad de *P. tannophilus* de asimilar etanol en ausencia de D-xilosa, Schneider *et al.* (1981) y Slininger *et al.* (1982).

El objetivo es establecer la velocidad específica de producción de etanol, por lo que se han ensayado diferentes ecuaciones empíricas que ajustaran exclusivamente la fase en que la concentración de etanol aumenta con el tiempo. Entre estas ecuaciones la que reproduce mejor las variaciones experimentales observadas es de la forma:

$$\frac{E_T}{E_T - E} = A t^B \quad (5.34)$$

donde E_T representa la concentración máxima alcanzable si el rendimiento de la transformación de D-xilosa en etanol fuese el teórico, de forma que siendo s_0 la concentración inicial de sustrato, E_T vendrá dado por:

$$E_T = s_0 \tau \frac{\text{PM (etanol)}}{\text{PM (sustrato)}} \quad (5.35)$$

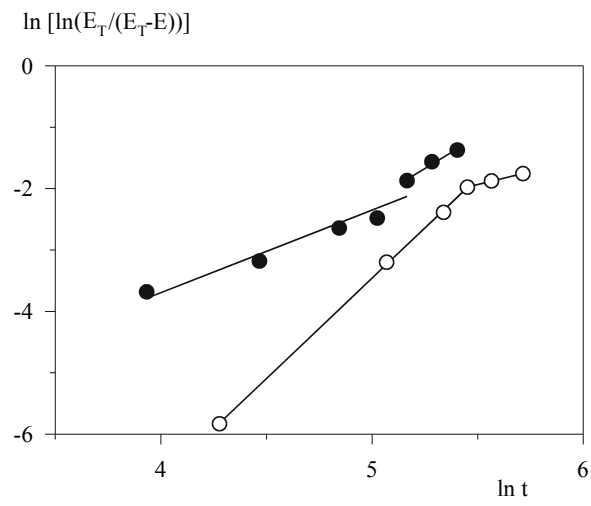
siendo τ igual a 2 cuando el sustrato es D-glucosa e igual a 5/3 si se trata de D-xilosa.

Para determinar los parámetros A y B se puede linealizar la ecuación (5.34), que cumple con la condición inicial de que para $t = 0 \rightarrow E = 0$, de la siguiente forma:

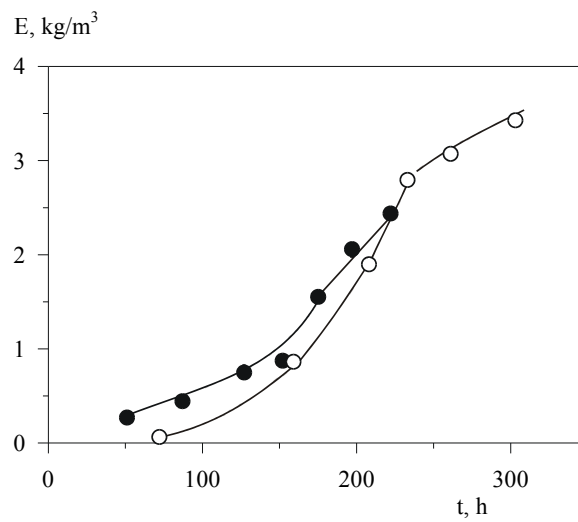
$$\ln \left(\ln \frac{E_T}{E_T - E} \right) = \ln (\ln A) + B \ln t \quad (5.36)$$

con lo que, mediante ajustes por mínimos cuadrados de los valores del primer miembro frente a los del logaritmo neperiano del tiempo, se pueden obtener los parámetros A y B. En la fermentación de los hidrolizados con *P. tannophilus*, en general, se pueden distinguir dos etapas de producción de etanol, fases que corresponden al consumo de D-glucosa, en la que se produce etanol de forma rápida, y al resto de azúcares, mayoritariamente D-xilosa, presentes en el medio, etapa en la que la concentración de etanol crece más lentamente. Así

pues, se ha procedido a ajustar los valores experimentales E-t mediante la ecuación (5.36) en dos intervalos. Como visualización de los ajustes realizados, en la Figura V.31 (a) se muestran, a título de ejemplo, las representaciones correspondientes a las fermentaciones de los hidrolizados obtenidos con ácido sulfúrico 0,75 y 2 N. La Figura V.31 (b) muestra las líneas reproducidas a partir de la ecuación (5.34), mientras que los puntos corresponden a los resultados experimentales, apreciándose una aceptable reproducción en los períodos de validez de la ecuación propuesta.



(a)



(b)

Fig. V.31 a) Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol para los cultivos FS2 (●) y FS4 (○)
 b) Reproducción con la ecuación (5.34) de los mismos cultivos

A partir de la ecuación (5.34) se puede determinar analíticamente la derivada dE/dt , y por tanto, sustituyendo en la ecuación (5.33), obtener la expresión para la velocidad específica de producción de etanol en función del tiempo:

$$q_E^D = \frac{E_T B (\ln A) (t^{B-1}) (A^{-t^B})}{x} \quad (5.37)$$

donde hay que sustituir la concentración de biomasa, x , por el valor correspondiente al tiempo considerado. Los valores calculados de q_E^D para varios tiempos del cultivo se recogen en la Tabla V.19. Cuando ha sido posible, se ha procurado elegir un tiempo próximo a las 100 horas, que corresponde en la mayoría de los casos a un período en el que existe consumo de D-glucosa. El otro tiempo, en la mayoría de los experimentos, corresponde a la etapa donde se consume D-xilosa y el resto de azúcares.

TABLA V.19
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL
Influencia de la concentración de H_2SO_4
utilizado en la obtención del hidrolizado
pH = 3,5 $T_F = 303 \text{ K}$

Expto	C_A, N	t, h	q_E^D	q_E
FS1	0,5	100	0,042	0,038
FS2	0,75	100	0,023	0,040
		200	0,029	0,021
FS3	1,0	100	0,031	0,046
		200	0,042	0,029
FS4	2,0	150	0,030	0,025
		300	0,011	0,016
FS5	4,0	100	0,026	0,027
		200	0,013	0,016

$q_E, \text{ kg}/(\text{kg h})$

Por otra parte, siendo nula la concentración de etanol a $t = 0$, la productividad instantánea en etanol se define por:

$$Y_{E/x} = \frac{dE}{dx} \quad (5.38)$$

Si este parámetro permanece constante en el transcurso del experimento, una representación de E frente a $(x-x_0)$ daría lugar a una línea cuya pendiente sería $Y_{E/x}$ y cuya ordenada en el origen debería ser nula. Esta pendiente constante correspondería a la productividad global, expresada en la forma $Y_{E/x}^G$. A partir de la definición de velocidad específica de crecimiento, de las ecuaciones (5.33) y (5.38), admitiendo una productividad instantánea en etanol constante e igual a $Y_{E/x}^G$ y suponiendo que no existe prácticamente mantenimiento celular, se puede deducir que la velocidad específica de producción de etanol es:

$$q_E = Y_{E/x}^G \mu \quad (5.39)$$

La representación del etanol producido, E, frente a la biomasa neta formada, $x-x_0$, ha conducido a una recta de cuya pendiente se ha determinado $Y_{E/x}^G$; un ejemplo de estas representaciones se muestra en la Figura V.32. Una vez evaluados estos parámetros se ha podido calcular q_E (método integral de tratamiento de datos cinéticos), cuyos valores se muestran en la Tabla V.19. En general, se detecta una buena concordancia entre los valores de las velocidades específicas de formación de etanol calculados por los métodos diferencial e integral.

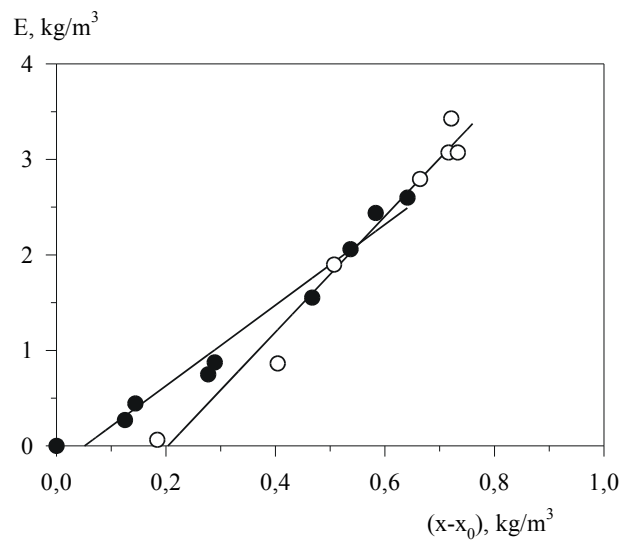


Fig. V.32 Representación del etanol producido frente a la biomasa neta en los experimentos FS2 (●) y FS4 (○)

De forma similar al rendimiento en biomasa, el rendimiento instantáneo en etanol se define por:

$$Y_{E/s} = \frac{d(E-E_0)}{d(s_0-s)} \quad (5.40)$$

Si este rendimiento, $Y_{E/s}$, permanece constante en el transcurso del cultivo, una representación de $(E-E_0)$, o bien de E (puesto que en los experimentos realizados $E_0 = 0$) frente a (s_0-s) debería conducir a una línea recta de pendiente $Y_{E/s}$ y de ordenada en el origen nula. Si esto sucede, este rendimiento constante corresponderá al medio o global que simbolizaremos como $Y_{E/s}^G$.

Asimismo, el rendimiento instantáneo en xilitol, $Y_{Xi/s}$, se puede definir de forma análoga a $Y_{E/s}$, y por tanto:

$$Y_{Xi/s} = \frac{d(Xi)}{d(s_0-s)} \quad (5.41)$$

ya que a $t = 0 \rightarrow Xi = 0$; si permanece constante a lo largo del experimento representará un rendimiento global que representaremos por $Y_{Xi/s}^G$.

Con objeto de comprobar si los rendimientos en etanol y xilitol permanecen constantes, de acuerdo con las ecuaciones (5.40) y (5.41), se han realizado representaciones de E y Xi frente a $(s_0 - s)$, obteniéndose gráficas similares a las que se muestran como ejemplo en la Figura V.33.

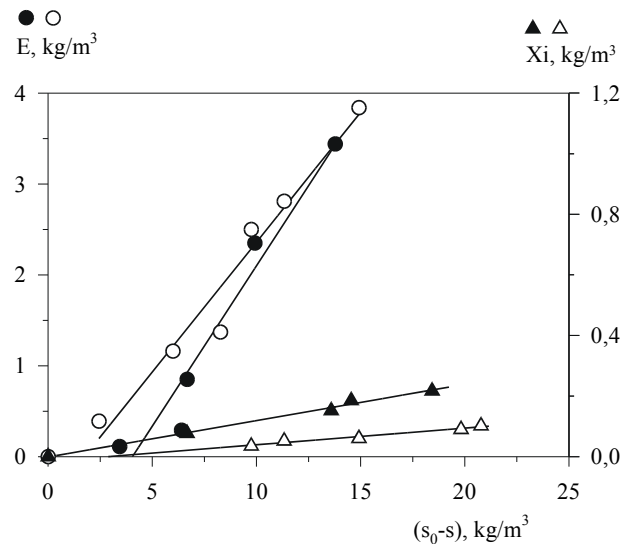


Fig. V.33 Rendimiento en etanol y en xilitol en los cultivos FS3 (●, ▲) y FS5 (○, △), respectivamente

A partir de las pendientes de las líneas de ajuste se han determinado los rendimientos en etanol, $Y_{E/s}^G$, y xilitol, $Y_{Xi/s}^G$, valores que se muestran en la Tabla V.20 donde puede observarse cómo los máximos rendimientos en etanol se alcanzan para los experimentos procedentes de hidrólisis con ácido sulfúrico 0,75 y 1 N, con valores de 0,35 y 0,38 kg de etanol por cada kg de sustrato, respectivamente, mientras que los rendimientos en xilitol oscilan entre 0,0055 y 0,025 kg/kg para hidrolizados obtenidos con concentraciones 4 y 2 N, respectivamente.

Cabe señalar que los máximos rendimientos en etanol alcanzados en la fermentación de hidrolizados de ácido sulfúrico son próximos a los obtenidos en trabajos previos a la fermentación de mezclas sintéticas de D-glucosa/D-xilosa utilizando esta misma levadura, *P. tannophilus*, y condiciones idénticas de operación donde se obtuvieron valores de $Y_{E/s}^G$ de 0,4 kg etanol/kg sustrato, Sánchez *et al.* (1999), Sánchez *et al.* (2002b). Por otra parte, estos rendimientos en etanol son superiores a los obtenidos en la fermentación de hidrolizados ácidos procedentes de macera de encina, donde Converti y Del Borghi (1998), utilizando dos especies de *Pachysolen tannophilus* (NRRL Y-2460 y CBS 4045) obtienen un rendimiento de 0,26 kg etanol/kg sustrato.

TABLA V.20
RENDIMIENTOS EN BIOPRODUCTOS
 Influencia de la concentración de H₂SO₄
 utilizado en la obtención del hidrolizado
 pH = 3,5 T_F = 303 K

Expto	C _A , N	Y _{E/s} ^G , kg/kg	Y _{Xi/s} ^G , kg/kg
FS1	0,5	0,26	0,012
FS2	0,75	0,38	0,023*
FS3	1,0	0,35	0,012
FS4	2,0	0,29	0,025
FS5	4,0	0,29	0,0055

* Valor medio de rendimientos puntuales

V.2.1.2 Influencia de la temperatura de hidrólisis

En una segunda serie de fermentación se ha estudiado la influencia de la temperatura de hidrólisis en experimentos realizados con ácido sulfúrico 1 N. Los resultados obtenidos para esta serie aparecen en las Tablas IV.39 y IV.42 a IV.44.

A) Formación de biomasa

La representación de los valores del logaritmo neperiano de la concentración adimensional de biomasa, $\ln(x/x_0)$, obtenidos a partir de los correspondientes valores de biomasa formada, frente al tiempo, permite obtener las curvas de crecimiento para todos los cultivos. La Figura V.34 muestra, a título de ejemplo, las correspondientes a los cultivos procedentes de hidrólisis con H₂SO₄ a 343 (expto FS6) y 373 K (expto FS8). En ellas puede observarse como no existe prácticamente fase de adaptación, sino que la fase exponencial comienza desde el principio del experimento.

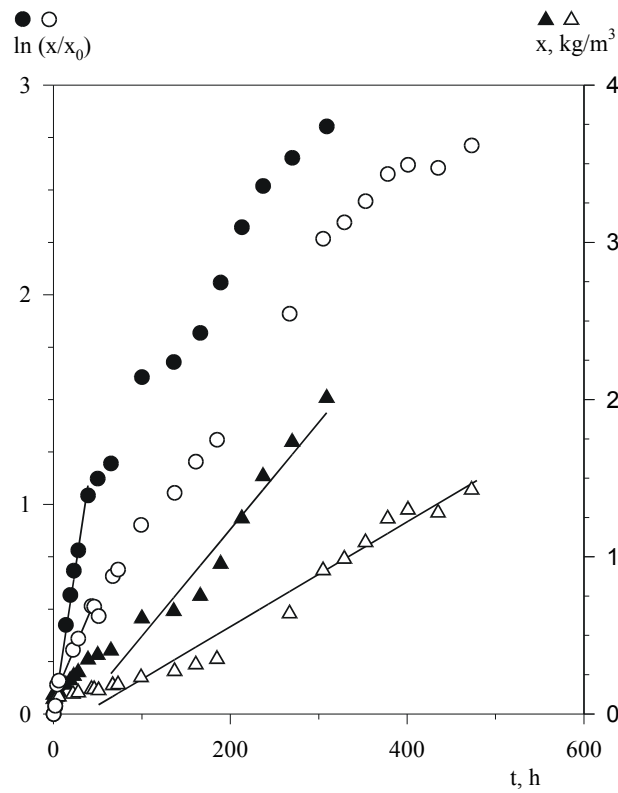


Fig. V.34 Curvas de crecimiento de los cultivos FS6 (●, ▲) y FS8 (○, △)

Los valores de las velocidades específicas máximas de crecimiento, μ_m , se han determinado mediante ajustes por regresión lineal de los valores de $\ln(x/x_0)$ vs t , recogiendo en la Tabla V.21. Se aprecia que los máximos valores corresponden a las fermentaciones cuyas hidrólisis fueron realizadas a temperaturas más suaves, 343 y 353 K. Con respecto a la fase de crecimiento lineal, caracterizada mediante la productividad en biomasa, b , coincide también los valores más elevados a temperaturas de 343 y 353 K.

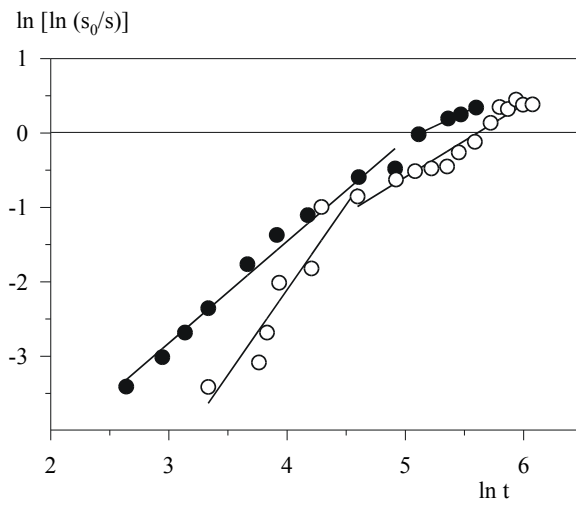
TABLA V.21
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO
 Influencia de la temperatura de hidrólisis
 $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 1\text{N}$ $\text{pH} = 3,5$ $T_F = 303\text{ K}$

Expto	T_H, K	μ_m, h^{-1}	r^2	$b, \text{kg}/(\text{m}^3 \text{ h})$	r^2
FS6	343	0,028	0,993	0,0068	0,951
FS7	353	0,038	0,995	0,0074	0,980
FS3	363	0,019	0,992	0,0024	0,951
FS8	373	0,010	0,976	0,0025	0,971

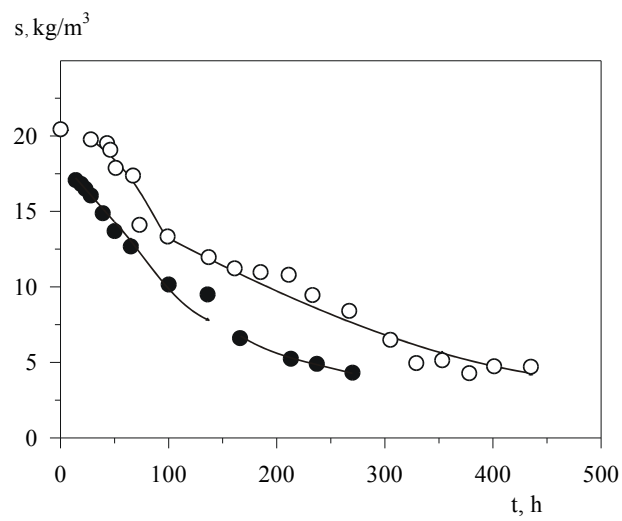
B) Consumo de sustrato

Como se muestra en la Figura V.35 (a), correspondientes a los cultivos FS6 y FS7, al ajustar los resultados experimentales de concentración de sustrato total a la ecuación (5.26) se distinguen dos intervalos, correspondientes respectivamente al consumo de D-glucosa y al resto de azúcares componentes del medio, observándose una mayor pendiente en las rectas correspondientes al primer intervalo. Así, se han calculado mediante ajuste por mínimos cuadrados, los parámetros α y β de la ecuación (5.25) para cada uno de los intervalos, lo que ha permitido reproducir los datos s-t que, para los mismos experimentos, se muestran en la Figura V.35 (b).

A partir de estos parámetros se han podido calcular las velocidades específicas de consumo de D-glucosa, q_g^D , y del consumo de sustrato total, q_s^D , según la ecuación (5.27), valores que se recogen en la Tabla V.22 donde se aprecia claramente esa mayor velocidad de consumo de sustrato en el primer tramo como ya se ponía de manifiesto también gráficamente.



(a)



(b)

Fig. V.35 a) Ajuste de los resultados experimentales de sustrato residual para los cultivos FS6 (●) y FS7 (○)
b) Reproducción con la ecuación (5.25) de los mismos cultivos

TABLA V.22
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO

Influencia de la temperatura de hidrólisis

[H₂SO₄] = 1 N pH = 3,5 T_F = 303 K

Expto	T _H , K	t, h	q _g ^D	q _g	t, h	q _s ^D	q _s
FS6	343	100	0,15	0,23	200	0,020	0,013
					250	0,012	0,010
FS7	353	50	0,17	0,23	200	0,048	0,054
					300	0,017	0,027
FS3	363	100	0,17	0,12			
		200	0,081	0,074	300	0,044	0,068
FS8	373	25	0,32	0,49	300	0,10	0,095
		100	0,18	0,29	400	0,069	0,069

q, kg/(kg h)

En la Tabla V.22 se observa como q_g y q_s disminuyen con el tiempo en todos los cultivos. Para el experimento FS7 sólo ha podido tomarse un tiempo bajo, 50 horas, ya que el consumo de D-glucosa se produjo antes de las 100 horas. Por el contrario, en experimentos como FS3 y FS8 la etapa de consumo de glucosa se prolongó hasta tiempos muy superiores, próximos a 200 y 300 horas, respectivamente.

Puede apreciarse como la velocidades de consumo de D-glucosa y del resto de azúcares aumentan con la temperatura, con una subida importante para el hidrolizado obtenido a 373 K, (expto FS8) que alcanza un valor de 0,32 kg/(kg h) en su fase exponencial.

Por otro lado, los rendimientos globales en biomasa, Y_{x/g}^G e Y_{x/s}^G, se han evaluado a partir de representaciones de (x-x₀) vs (s₀-s), similares a las que se muestran en la Figura V.36, correspondientes a los experimentos realizados tras hidrólisis a temperaturas de 353 y 373 K (exptos FS7 y FS8). Los valores obtenidos para los rendimientos aparecen en la Tabla V.23.

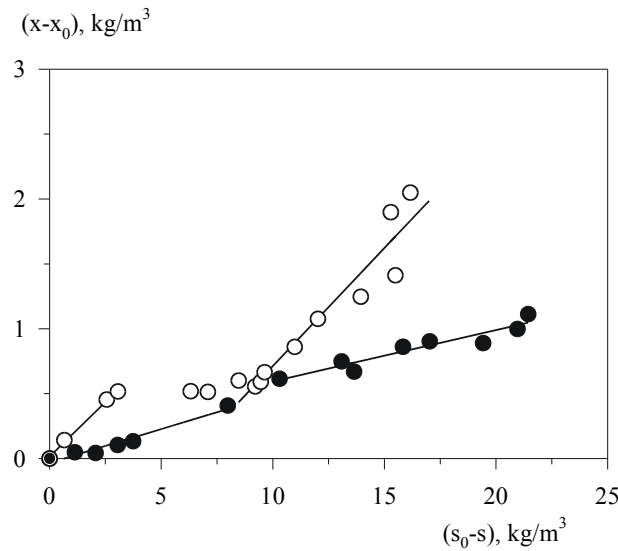


Fig. V.36 Rendimiento en biomasa en los cultivos FS7 (○) y FS8 (●)

Una vez que el microorganismo ha consumido la totalidad de D-glucosa presente en el medio, en algunos cultivos como es el caso del procedente del hidrolizado con ácido sulfúrico a 353 K (expto FS7), se observa una parada entre el consumo de D-glucosa y del resto de azúcares del medio en la cual el microorganismo se adapta a un nuevo sustrato, Figura V.36.

TABLA V.23
RENDIMIENTOS EN BIOMASA
 Influencia de la temperatura de hidrólisis
 $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 1 \text{ N}$ $\text{pH} = 3,5$ $T_F = 303 \text{ K}$

Expto	T_H, K	$Y_{x/g}^G, \text{kg/kg}$	$Y_{x/s}^G, \text{kg/kg}$	$Y_{x/(Ac+s)}^G, \text{kg/kg}$
FS6	343	0,060	0,43	0,11
FS7	353	0,17	0,19	----
FS3	363	0,049	0,040	0,043
FS8	373	0,052	0,040	----

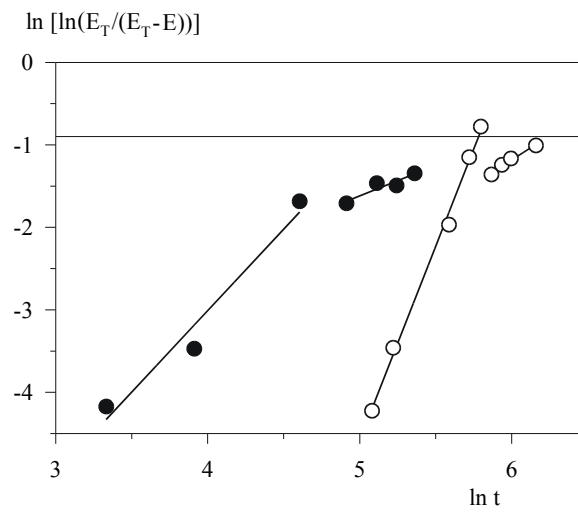
En esta serie de temperatura se observa cómo los rendimientos en biomasa más elevados se alcanzan para los cultivos procedentes de hidrólisis a menor temperatura (exptos FS6 y FS7), hecho que también se pone de manifiesto en el rendimiento en biomasa a partir de ácido acético y sustrato total, $Y_{x/Ac+s}^G$, alcanzándose un valor de 0,11 kg de biomasa por cada kg de sustrato para el cultivo procedente de hidrólisis a 343 K, Tabla V.23.

Finalmente, con los rendimientos globales en biomasa, $Y_{x/g}^G$ e $Y_{x/s}^G$, y las velocidades específicas de crecimiento determinadas en el período lineal, $\mu=b/x$, se han calculado las velocidades específicas de consumo de D-glucosa, q_g , y de sustrato total, q_s , mediante las ecuaciones (5.30) y (5.29), respectivamente. Estos valores se recogen en la Tabla V.22 a los mismos tiempos de operación que los tabulados para q_g^D y q_s^D con el fin de poder realizar una mejor comparación, observándose, en general, una aceptable concordancia entre ambos procedimientos.

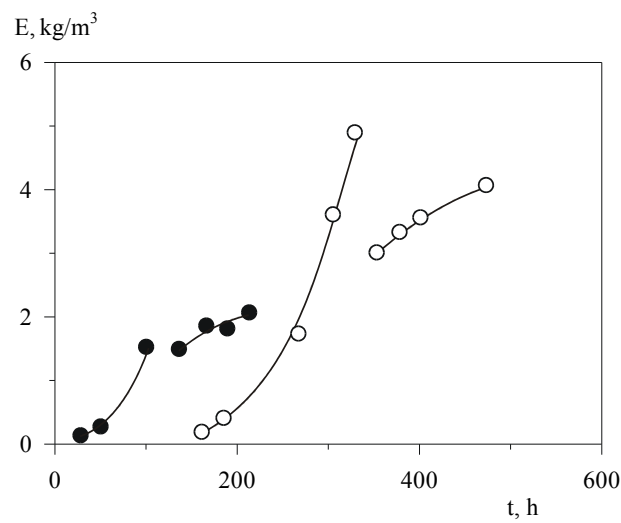
C) Formación de bioproductos

En la fermentación de hidrolizados con *P. tannophilus* se pueden distinguir dos etapas de producción de etanol, fases que corresponden al consumo de D-glucosa, en la que se produce etanol de forma rápida, y al consumo del resto de azúcares presentes en el medio, etapa en la que la concentración de etanol crece más lentamente. Así pues, se ha procedido a ajustar los valores experimentales E-t mediante la ecuación (5.34) a dos intervalos.

En la Figura V.37 (a) aparecen, a título de ejemplo, las linealizaciones realizadas con valores de la concentración de etanol vs tiempo a la ecuación (5.36) correspondientes a los cultivos FS6 y FS8. Al igual que en este caso, en los restantes experimentos, se han obtenido ajustes aceptables a la ecuación propuesta. La Figura V.37 (b) corresponde a las reproducciones de valores E-t para los mismos cultivos.



(a)



(b)

Fig. V.37 a) Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol para los cultivos FS6 (●) y FS8 (○)
 b) Reproducción con la ecuación (5.34) de los mismos cultivos

Una vez determinados los parámetros A y B de la ecuación (5.34) se han calculado los valores de la velocidad específica de producción de etanol, q_E^D , que aparecen en la Tabla V.24 para algunos tiempos de la fase de crecimiento lineal.

TABLA V.24
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL
Influencia de la temperatura de hidrólisis
[H₂SO₄] = 1 N pH = 3,5 T_F = 303 K

Expto	T _H , K	t, h	q_E^D	q_E
FS6	343	100	0,049	0,045
FS7	353	200	0,0034	0,0056
		300	0,0012	0,0028
FS3	363	100	0,031	0,046
		200	0,042	0,029
FS8	373	200	0,031	0,052
		300	0,067	0,033

q_E , kg/(kg h)

Como se observa en la Tabla V.24, la mayor velocidad de producción de etanol se alcanza con el experimento realizado a 343 K confirmándose así que la menor formación de productos de carácter tóxico o inhibitorio se produce a las temperaturas más bajas.

En relación a la productividad en etanol, definida por la ecuación (5.38) se detecta que permanece constante en el transcurso de cada cultivo, tal como pone de manifiesto la representación de E vs (x-x₀), Figura V.38. Se observa que los valores experimentales se ajustan a líneas rectas cuya pendiente será la productividad global en biomasa, $Y_{E/x}^G$; una vez calculado este parámetro, y por aplicación de la ecuación (5.39), puede determinarse la velocidad específica de producción de etanol, q_E , que se recoge en la Tabla V.24.

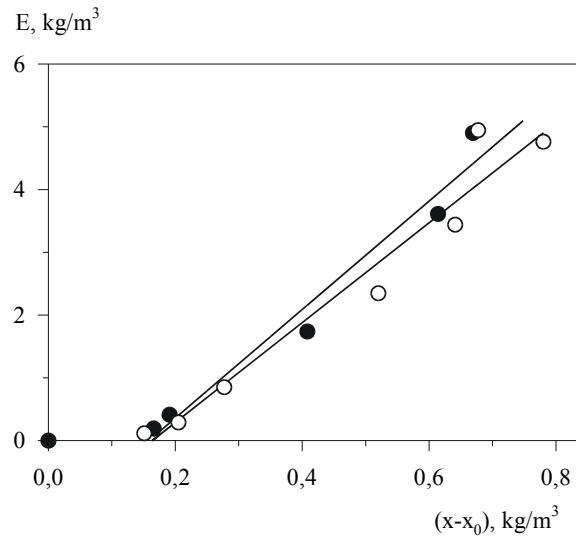


Fig. V.38 Variación del etanol producido frente a la biomasa neta formada en los cultivos FS3 (○) y FS8 (●)

Con objeto de comprobar si los rendimientos en etanol, $Y_{E/s}$, permanecen constantes, de acuerdo con la ecuación (5.40) se han realizado representaciones de E vs (s_0-s) , obteniéndose gráficos análogos a los que se muestran en la Figura V.39. Con respecto a los rendimientos en xilitol, $Y_{Xi/s}$, sólo han podido realizarse linealizaciones de acuerdo con la ecuación (5.41) para el cultivo FS3, mientras que para el resto de cultivos de la serie se han determinado rendimientos puntuales, Tabla V.25. Dicha Tabla pone de manifiesto un rendimiento más elevado para el cultivo del hidrolizado obtenido a 373 K.

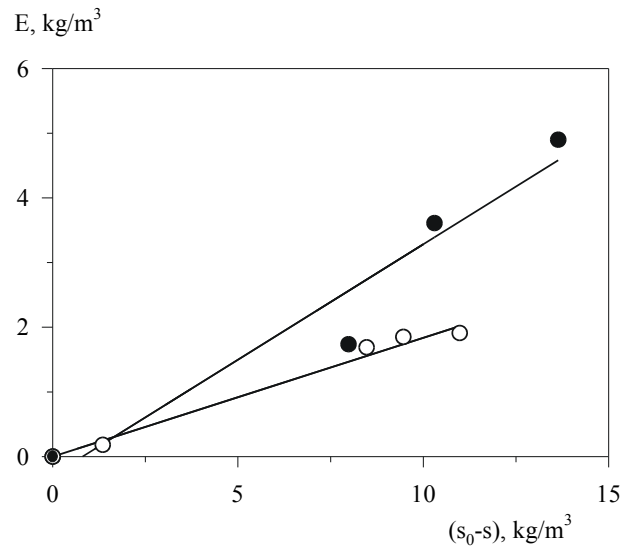


Fig. V.39 Rendimiento en etanol en los cultivos FS7 (○) y FS8 (●), respectivamente

TABLA V.25

RENDIMIENTOS EN BIOPRODUCTOS

Influencia de la temperatura de hidrólisis

[H₂SO₄] = 1 N pH = 3,5 T_F = 303 K

Expto	T _H , K	Y _{E/s} ^G , kg/kg	Y _{Xi/s} ^G , kg/kg
FS6	343	0,18	0,035*
FS7	353	0,18	0,017*
FS3	363	0,35	0,012
FS8	373	0,36	0,017*

* Valores medios de rendimientos puntuales

V.2.2 F. de hidrolizados de ácido fosfórico

En esta serie se han realizado seis experimentos, variando la concentración de ácido fosfórico desde 0,3 a 8 N, datos que aparecen en las Tablas IV.45 a IV.50 (Figuras IV.9 a IV.14). El pH de todos los cultivos se ha mantenido constante en un valor próximo a 3,5 y el nivel de aireación ha sido el suministrado por el vórtice de agitación a 750 rpm.

A) Formación de biomasa

Las curvas de crecimiento, $\ln(x/x_0)$ vs t , para dos de los experimentos de esta serie se muestran en la Figura V.40 correspondientes a los cultivos de hidrolizados de ácido fosfórico 0,3 y 2 N, ambos con una fase lag despreciable y una fase exponencial de duración próxima a las 50 horas. En los restantes experimentos de esta serie la evolución de estas curvas de crecimiento es similar.

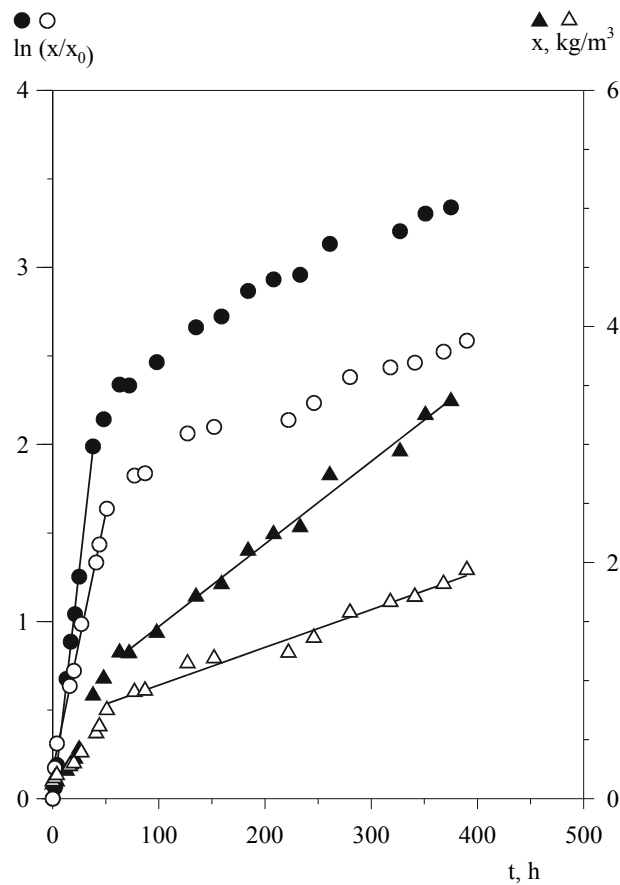


Fig. V.40 Curvas de crecimiento de los cultivos FP1 (○, △) y FP5 (●, ▲)

Para el período de crecimiento exponencial, se ha obtenido, según se ha descrito en las series anteriores, la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , cuyos valores para cada cultivo, se recogen en la Tabla V.26. Puede observarse cómo aumenta este parámetro con la concentración de ácido alcanzando un valor máximo de $0,053 \text{ h}^{-1}$ en el experimento realizado con ácido fosfórico 2 N, detectándose una bajada significativa para concentraciones superiores.

TABLA V.26
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO
 Influencia de la concentración de H₃PO₄
 pH = 3,5 T_F = 303 K

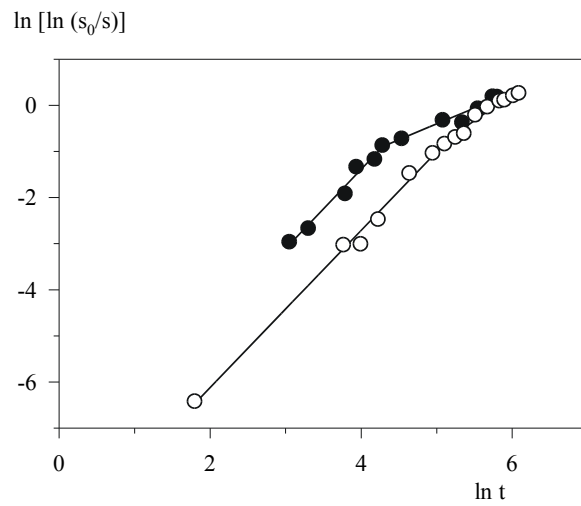
Expto	C _A , N	μ _m , h ⁻¹	r ²	b, kg/(m ³ h)	r ²
FP1	0,3	0,029	0,997	0,0032	0,977
FP2	0,5	0,022	0,979	0,0038	0,967
FP3	0,75	0,020	0,996	0,0031	0,985
FP4	1,0	0,043	0,967	0,0033	0,962
FP5	2,0	0,053	0,999	0,0070	0,991
FP6	8,0	0,023	0,964	0,0049	0,992

En relación a la fase lineal de crecimiento, caracterizada mediante la productividad en biomasa, *b*, la misma Tabla recoge los valores encontrados para los seis cultivos de la serie, así como los correspondientes coeficientes de regresión lineal, *r*². La influencia de la concentración de ácido fosfórico sobre el cultivo determina un aumento en la productividad en biomasa con la concentración alcanzando su máximo valor en el experimento FP5, 0,0070 kg/(m³ h) y bajando para concentraciones superiores, comportamiento similar al observado en la fase exponencial.

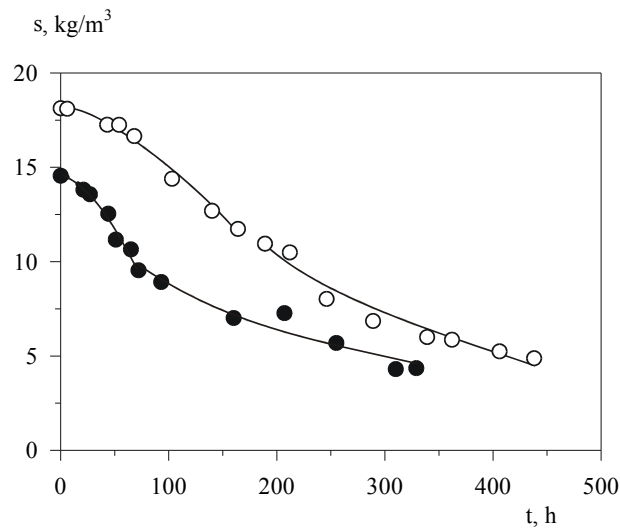
B) Consumo de sustrato

En la Figura V.41 (a) se muestran dos ejemplos del ajuste de los datos experimentales a la ecuación (5.26) utilizado para la determinación de las velocidades específicas de consumo de sustrato. En la Figura V.41 (b) aparece la reproducción de la evolución de la concentración de azúcares con el tiempo para los mismos experimentos (FP4 y FP6) a partir de la ecuación (5.25).

En la Tabla V.27 se recogen los valores de la velocidad específica de consumo de sustrato, *q*_g^D y *q*_s^D, obtenidos una vez que se determinan los parámetros de la ecuación (5.25) para un tiempo de la fase exponencial y dos de la fase lineal, a excepción del experimento FP1 para el cual aparecen tres tiempos de la etapa lineal.



(a)



(b)

Fig. V.41 a) Ajuste de los resultados experimentales de sustrato residual para los cultivos FP4 (●) y FP6 (○)
 b) Reproducción con la ecuación (5.25) de los mismos cultivos

TABLA V.27
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO
 Influencia de la concentración de H₃PO₄
 pH = 3,5 T_F = 303 K

Expto	C _A , N	t, h	q _g ^D	q _g	t, h	q _s ^D	q _s
FP1	0,3	60	0,064	0,052	200	0,014	0,010
					300	0,0075	0,0080
FP2	0,5	25	0,062	0,24	-----	----	----
		60	0,15	0,24			
FP3	0,75	25	0,072	0,095	300	0,013	0,051
FP4	1,0	25	0,17	0,18	100	0,036	0,024
					200	0,016	0,018
FP5	2,0	15	0,17	0,18	100	0,041	0,018
					200	0,0092	0,012
FP6	8,0	25	0,12	0,25	200	0,035	0,053
					300	0,018	0,0093

q, kg/(kg h)

Como puede observarse en dicha tabla, en todos los casos las velocidades en el consumo de D-glucosa son mayores que para el resto de azúcares. Por otra parte, en el período de comportamiento lineal se aprecia cómo q_s^D disminuye con el tiempo.

Los rendimientos globales en biomasa se han determinado a partir de representaciones de biomasa neta formada, (x-x₀), frente a sustrato neto consumido, (s₀-s), como las que se muestran en la Figura V.42 para los experimentos FP4 y FP6.

Los valores obtenidos por ajuste de mínimos cuadrados se reflejan en la Tabla V.28, en la que puede apreciarse cómo, en la etapa de consumo de D-glucosa, Y_{x/g}^G aumenta con la concentración hasta un valor máximo de 0,29 kg de biomasa por cada kg de D-glucosa para el cultivo realizado con hidrolizado 2 N, mientras que para una concentración superior de ácido fosfórico, 8 N, se aprecia una bajada en el valor de este parámetro. Con respecto a la etapa de consumo de D-xilosa y el resto de azúcares no se aprecia una tendencia definida en Y_{x/s}^G.

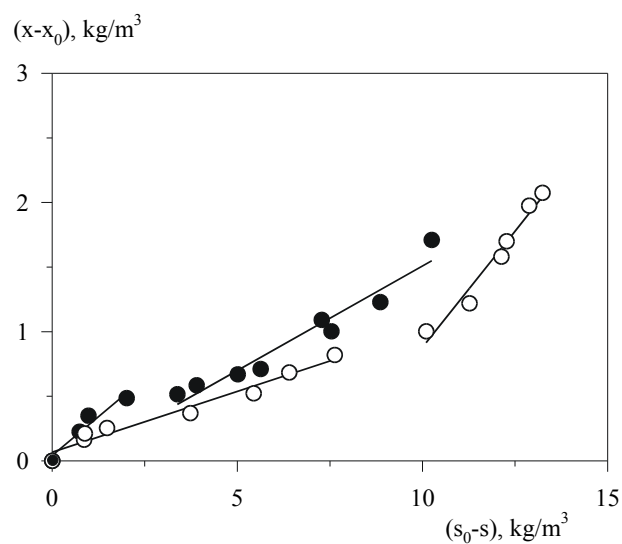


Fig. V.42 Rendimiento en biomasa en los cultivos FP4 (●) y FP6 (○)

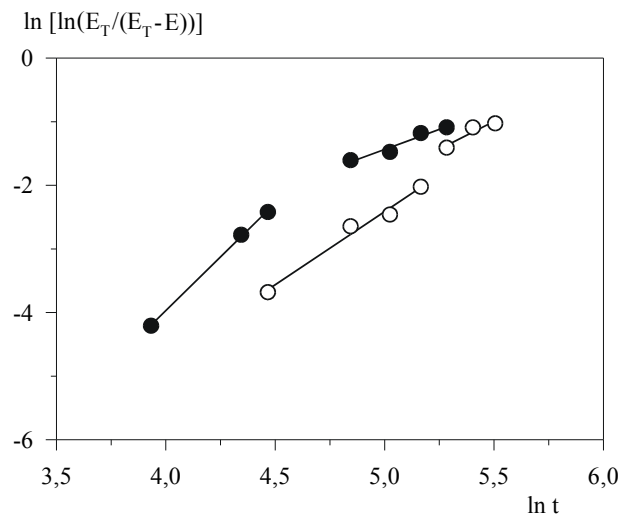
TABLA V.28
RENDIMIENTOS EN BIOMASA
 Influencia de la concentración de H₃PO₄
 pH = 3,5 T_F = 303 K

Expto	C _A , N	Y _{x/g} ^G , kg/kg	Y _{x/s} ^G , kg/kg	Y _{x/(Ac+s)} ^G , kg/kg
FP1	0,3	0,074	0,25	0,15
FP2	0,5	0,090	---	0,12
FP3	0,75	0,21	0,055	0,087
FP4	1,0	0,24	0,16	0,23
FP5	2,0	0,29	0,26	---
FP6	8,0	0,094	0,36	---

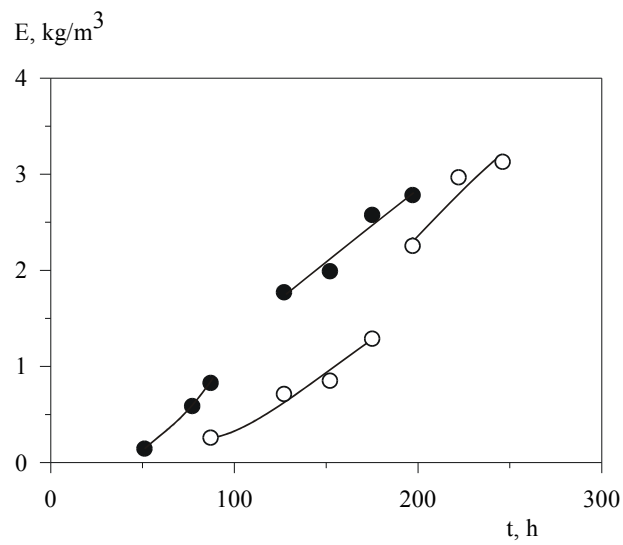
Puesto que el rendimiento en biomasa es constante en el transcurso de los experimentos, y admitiendo que no existe mantenimiento celular, a partir de este parámetro puede determinarse la velocidad específica de consumo de sustrato, q_g y q_s , a los mismos tiempos en que se hizo por el método diferencial, resultados que se muestran en la Tabla V.27.

C) Formación de bioproductos

En la Figura V.43 (a) se muestra, a título de ejemplo, la linealización realizada con los resultados experimentales de etanol-tiempo a la ecuación (5.36) correspondiente a los experimentos FP1 y FP3. De la misma forma en el resto de cultivos de la serie se han obtenido ajustes aceptables a la ecuación empírica propuesta. Para los mismos cultivos aparece en la Figura V.43 (b) la reproducción de los valores de la concentración frente al tiempo donde la línea continua corresponde a los valores deducidos de la ecuación (5.34) y los puntos representan los resultados experimentales.



(a)



(b)

Fig. V.43 a) Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol para los cultivos FP1 (●) y FP3 (○)
 c) Reproducción con la ecuación (5.34) de los mismos cultivos

Los valores de la velocidad específica de producción de etanol, q_E^D , una vez determinados los parámetros, aparecen en la Tabla V.29 para dos tiempos. Como se observa, el mayor valor se obtiene para el hidrolizado de ácido fosfórico 1 N en un tiempo de 25 horas perteneciente al período lineal.

TABLA V.29
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL
 Influencia de la concentración de H_3PO_4
 $pH = 3,5$ $T_F = 303 K$

Expto	C_A, N	t, h	q_E^D	q_E
FP1	0,3	75	0,026	0,016
		150	0,014	0,012
FP2	0,5	150	0,0097	0,0104
FP3	0,75	150	0,021	0,030
		200	0,023	0,024
FP4	1,0	25	0,039	0,075
		50	0,0092	0,0086
FP5	2,0	75	0,0062	0,0050
		150	0,0030	0,0035
FP6	8,0	150	0,023	0,019

$q_E, \text{kg}/(\text{kg h})$

Si la productividad instantánea en etanol, definida por la ecuación (5.38) permanece constante en el transcurso de los experimentos, representaciones de E frente a $(x-x_0)$, como las que se muestran en la Figura V.44 dan lugar a líneas rectas cuya pendiente será la productividad global en etanol $Y_{E/x}$; una vez calculado este parámetro, y por aplicación de la ecuación (5.37), puede determinarse la velocidad específica de producción de etanol, q_E , que se recoge en la Tabla V.29 con objeto de compararla con q_E^D , observándose una concordancia aceptable .

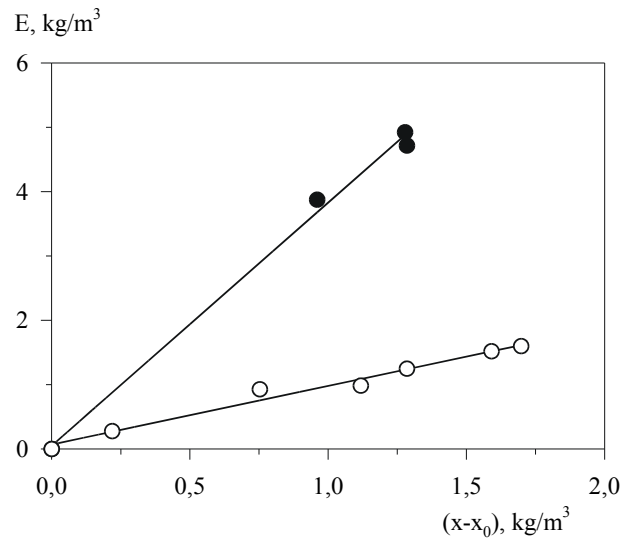


Fig. V.44 Representación del etanol producido frente a la biomasa neta en los cultivos FP2 (●) y FP5 (○)

Con objeto de comprobar si los rendimientos en etanol, $Y_{E/s}$ y xilitol, $Y_{Xi/s}$ permanecen constantes, de acuerdo con las ecuaciones (5.40) y (5.41) se han realizado representaciones de E y Xi vs (s_0-s) , obteniéndose gráficos análogos a los que se muestran en la Figura V.45 correspondientes a los cultivos FP5 y FP6. A partir de las pendientes de las líneas representadas se han determinado los rendimientos globales en etanol, $Y_{E/s}^G$ y xilitol, $Y_{Xi/s}^G$, valores que se recogen en la Tabla V.30.

Los máximos rendimientos en etanol obtenidos corresponden a los hidrolizados 0,5 y 0,75 N, alcanzando valores de 0,38 y 0,37 kg de etanol por cada kg de sustrato, respectivamente.

Con respecto a los rendimientos en xilitol, a excepción de los cultivos FP5 y FP6, sólo se han podido determinar valores medios de rendimientos puntuales con un valor excepcionalmente alto para el experimento realizado con la menor concentración de ácido fosfórico.

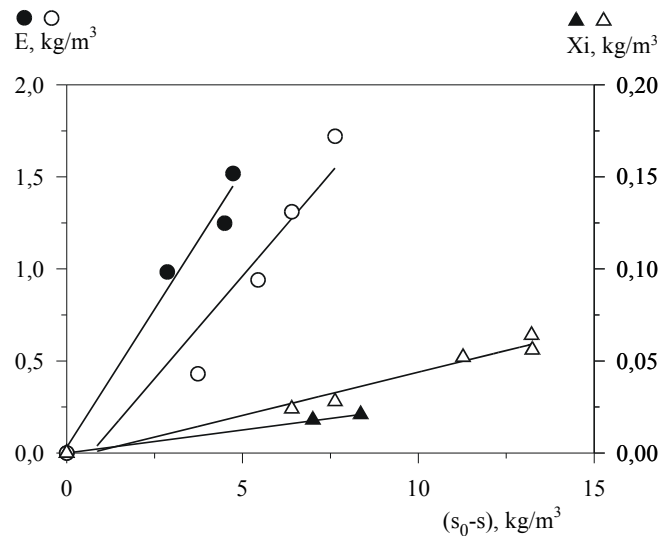


Fig. V.45 Rendimiento en etanol y xilitol en los cultivos FP5 (●, ▲) y FP6 (○, △)

TABLA V.30
RENDIMIENTOS EN BIOPRODUCTOS
 Influencia de la concentración de H₃PO₄
 pH = 3,5 T_F = 303 K

Expto	C _A , N	Y _{E/s} ^G , kg/kg	Y _{Xi/s} ^G , kg/kg
FP1	0,3	0,23	0,067*
FP2	0,5	0,38	0,0024*
FP3	0,75	0,37	0,0044*
FP4	1,0	0,22	0,0043*
FP5	2,0	0,30	0,0025
FP6	8,0	0,22	0,0047

* Valores medios de rendimientos puntuales

V.2.3 F. de hidrolizados enzimáticos

En esta última serie dedicada a la fermentación de hidrolizados enzimáticos se han fermentado tres hidrolizados en los que se ha modificado la disolución tampón, empleándose disolución acético/acetato (expto FE1), disolución cítrico/citrato (expto FE2) y, un último hidrolizado sin disolución tampón (expto FE3). Además en esta serie, se han fermentado otros tres hidrolizados obtenidos en las mejores condiciones de hidrólisis enzimática (exptos FE4, FE5 y FE6). En la Tabla IV.51 se recogen las variables de hidrólisis, con celulasas y hemicelulasas, de estos seis experimentos posteriormente fermentados. Las Figuras IV.15 a IV.20 muestran la evolución de sustratos y productos en los hidrolizados enzimáticos fermentados.

A) Formación de biomasa

La Figura V.46 muestra las curvas de crecimiento de dos experimentos de esta serie, FE1 y FE2, correspondientes a los hidrolizados enzimáticos con disolución tampón acético/acetato y cítrico/citrato, respectivamente.

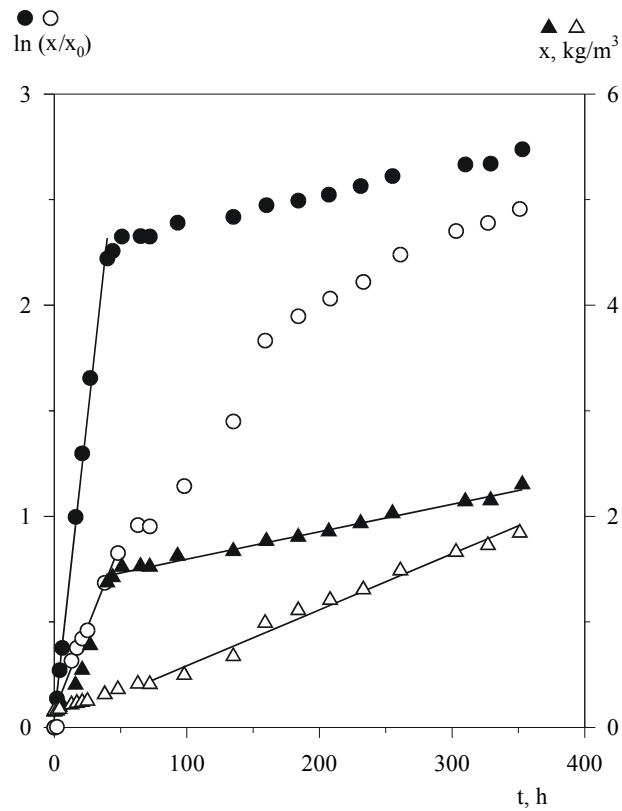


Fig. V.46 Curvas de crecimiento de los cultivos FE1 (○, △) y FE2 (●, ▲)

En todos los hidrolizados enzimáticos que se han fermentado se ha encontrado que la fase lag o de adaptación no existe o bien es muy reducida, inferior a 4 horas, lo cual se pone de manifiesto en la Figura V.46 en la que se muestran las curvas de crecimiento de dos experimentos de la serie.

A partir del período de crecimiento exponencial, marcado con una línea recta en la representación de $\ln(x/x_0)$ frente al tiempo, se ha obtenido mediante el método de mínimos cuadrados, la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , cuyos valores para cada cultivo se recogen en la Tabla V.31.

TABLA V.31
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO
 Fermentación de hidrolizados enzimáticos
 pH = 3,5 T_F = 303 K

Expto	μ_m, h^{-1}	r^2	b, kg/(m ³ h)	r^2
FE1	0,016	0,987	0,0053	0,982
FE2	0,057	0,995	0,0026	0,989
FE3	0,084	0,993	0,014	0,972
FE4	0,132	0,997	0,0019	0,964
FE5	0,100	0,995	0,0040	0,979
FE6	0,110	0,998	0,0034	0,960

Se observan valores elevados en la velocidad específica máxima de crecimiento comparados con los obtenidos en la fermentación de hidrolizados ácidos, alcanzándose los valores más altos cuando en el proceso de hidrólisis enzimática no se emplea disolución tampón. El máximo valor de μ_m se alcanza para el cultivo del experimento FE4, con un valor bastante elevado, 0,132 h⁻¹.

Por otra parte, según la ecuación (5.23) se ha caracterizado el período de crecimiento lineal mediante el cálculo de productividad en biomasa, b, cuyos valores se muestran también en la Tabla V.31 para todos los experimentos de esta serie con un valor máximo para el cultivo FE3 procedente del hidrolizado con menor tamaño de partícula del residuo de poda de olivo y con un mayor tiempo de pretratamiento con vapor.

B) Consumo de sustrato

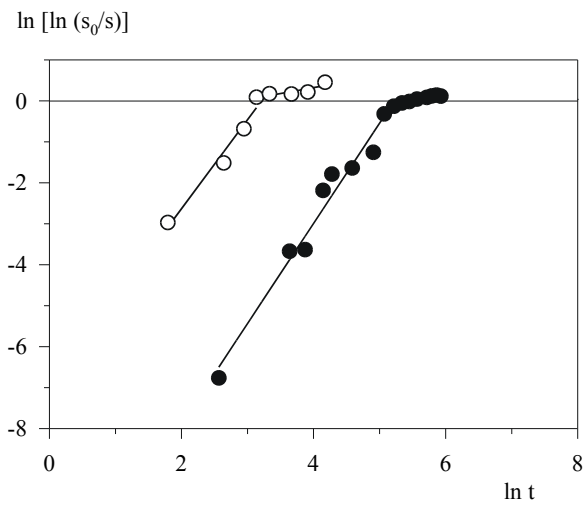
Como puede apreciarse en las Figuras IV.15 a IV.17 se produce un consumo rápido en una primera etapa que ronda las 30 horas, y a continuación el microorganismo ralentiza el consumo del resto de azúcares dejando finalmente sin consumir una cantidad considerable de los mismos. Por otro lado, cabe destacar en los cultivos FE4, FE5 y FE6 la rapidez en el

consumo de sustrato tal y como se pone de manifiesto en el apartado de resultados experimentales. En cualquier caso, y para todos los hidrolizados enzimáticos fermentados, se detecta cierta dificultad de *P. tannophilus* para asimilar el resto de azúcares una vez consumida la D-glucosa, quedando sin consumir del orden del 27 % del sustrato total.

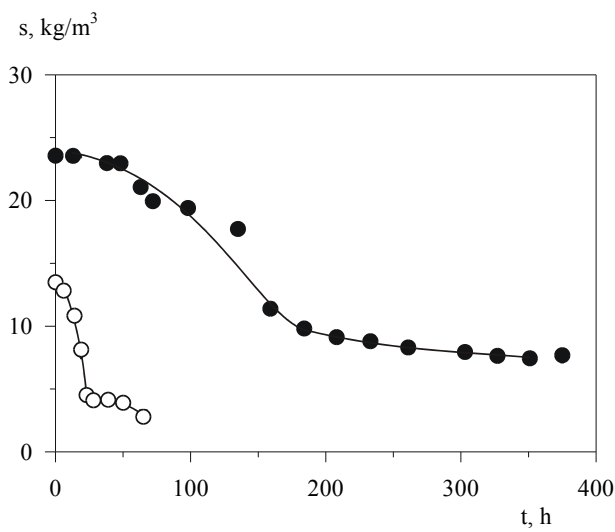
El consumo de sustrato por la levadura empleada en la fermentación de hidrolizados ha sido caracterizado mediante las velocidades de consumo de sustrato total, q_s , y de consumo de D-glucosa, q_g , y los rendimientos globales en biomasa referidos a sustrato total, $Y_{x/s}^G$, y a D-glucosa, $Y_{x/g}^G$.

Como se muestra en la Figura V.47 (a), correspondiente a los cultivos FE1 y FE5, al ajustar los resultados experimentales de concentración de sustrato total a la ecuación (5.26) se distinguen dos intervalos, correspondientes respectivamente al consumo de D-glucosa y al resto de azúcares componentes del medio, principalmente D-xilosa. Así se han calculado, mediante ajustes por mínimos cuadrados, los parámetros α y β de la ecuación (5.25) para cada uno de los intervalos, lo que ha permitido reproducir los datos s-t que, para los mismos experimentos, se muestran en la Figura V.47 (b).

A partir de estos parámetros se han podido calcular, mediante el método diferencial, las velocidades específicas de consumo de D-glucosa, q_g^D , y de consumo de sustrato total, q_s^D , según la ecuación (5.27), valores que se recogen en la Tabla V.32.



(a)



(b)

Fig. V.47 a) Ajuste de los resultados experimentales de sustrato residual para los cultivos FE1 (●) y FE5 (○)
 b) Reproducción con la ecuación (5.25) para los mismos cultivos

TABLA V.32
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO
 Fermentación de hidrolizados enzimáticos
 pH = 3,5 T_F = 303 K

Expto	t, h	q _g ^D	q _g	t, h	q _s ^D	q _s
FE1	100	0,17	0,15	200	0,014	0,014
FE2	25	0,73	0,70	50	0,027	0,022
				200	---	0,0047
FE3				50	0,024	0,028
FE4	15	0,66	0,69			
FE5	15	0,77	0,78	50	0,020	0,032
FE6	15	0,57	0,67	50	0,022	0,029

q, kg/(kg h)

Se observan velocidades de consumo de D-glucosa bastante superiores a las de consumo de D-xilosa. Para el experimento FE3 sólo ha podido determinarse la velocidad en el segundo tramo mientras que en FE4 la velocidad de consumo determinada corresponde sólo a D-glucosa.

En cuanto a los rendimientos globales en biomasa, $Y_{x/g}^G$ e $Y_{x/s}^G$, evaluados a partir de la representación gráfica de $(x-x_0)$ frente a (s_0-s) , se muestran a modo de ejemplo las correspondientes a los experimentos FE1 y FE3, Figura V.48. Los rendimientos obtenidos se muestran en la Tabla V.33, con valores de $Y_{x/g}^G$ que oscilan entre 0,048 y 0,19 kg de biomasa formada por cada kg de glucosa, y para $Y_{x/s}^G$ se alcanzan valores comprendidos entre 0,093 y 0,33 kg de biomasa formada por cada kg de D-xilosa y resto de azúcares.

Tal y como puede apreciarse en los dos cultivos representados en la Figura V.48, el rendimiento en biomasa correspondiente al segundo tramo es siempre superior al del tramo de consumo de D-glucosa, tendencia que se constata en el resto de cultivos de hidrolizados enzimáticos. Sin embargo, en la fermentación de hidrolizados ácidos no se detectó una tendencia definida en los rendimientos en biomasa alcanzados en una y otra etapa de consumo.

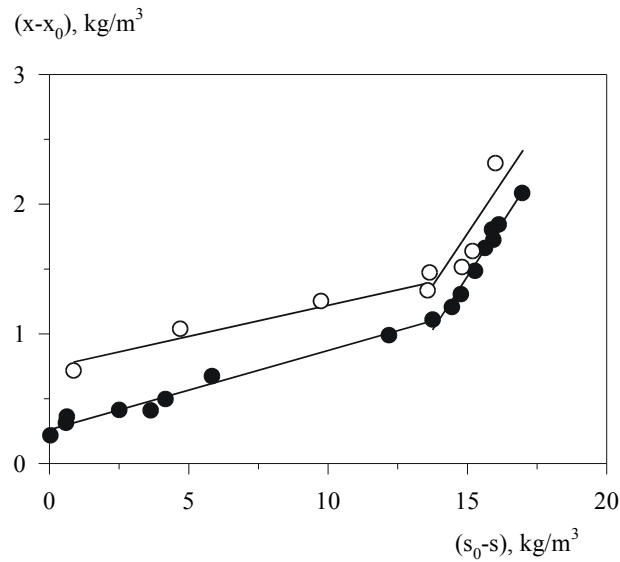


Fig. V.48 Rendimiento en biomasa en los cultivos FE1 (●) y FE3 (○)

TABLA V.33
RENDIMIENTOS EN BIOMASA
 Fermentación de hidrolizados enzimáticos
 pH = 3,5 $T_F = 303 \text{ K}$

Expto	$Y_{x/g}^G$, kg/kg	$Y_{x/s}^G$, kg/kg	$Y_{x/(Ac+s)}^G$, kg/kg
FE1	0,061	0,33	0,065
FE2	0,078	0,30	0,093
FE3	0,048	0,32	---
FE4	0,19	0,33	0,19
FE5	0,13	0,093	0,12
FE6	0,16	0,10	0,17

Puesto que se han podido obtener valores constantes para los rendimientos en biomasa, y aceptando que no existe mantenimiento celular o que éste es despreciable se han calculado, empleando las ecuaciones (5.29) y (5.30), las correspondientes velocidades específicas de consumo de D-glucosa y de sustrato total, por el método integral. Estos valores también se

muestran en la Tabla V.32 donde se observa una buena concordancia entre los valores de q_g y q_s calculados por ambos procedimientos. En cuanto al rendimiento en biomasa considerando también como sustrato el ácido acético se observa que oscila entre 0,07 y 0,19 kg biomasa por kg de sustrato total. En principio, cabría señalar que este rendimiento debe tener valores menores que $Y_{x/s}^G$, sin embargo en los cultivos FE5 y FE6 no se observa esta premisa posiblemente debido a algún error experimental ya que realmente se dispone de pocas determinaciones de ácido acético.

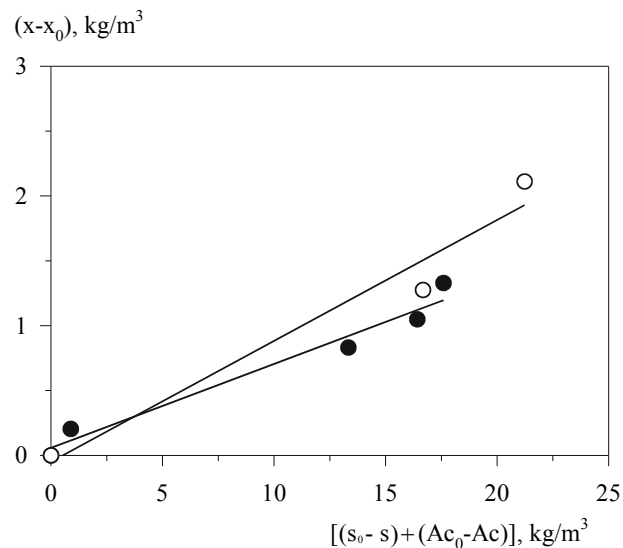


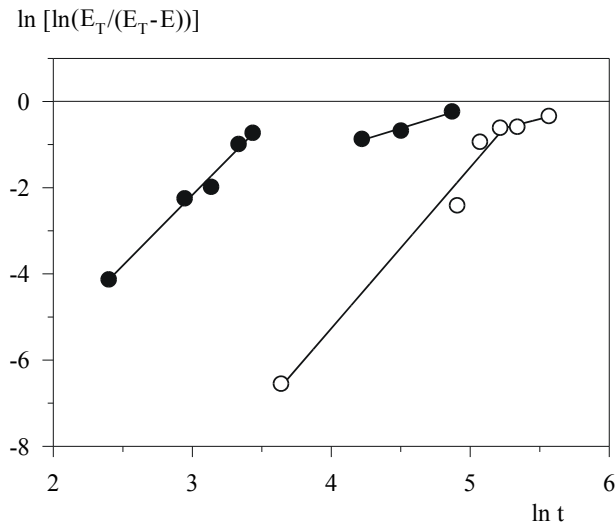
Fig. V.49 Rendimiento en biomasa en los cultivos FE1 (●) y FE2 (○) considerando como sustrato total las concentraciones de azúcares y ácido acético

C) Formación de bioproductos

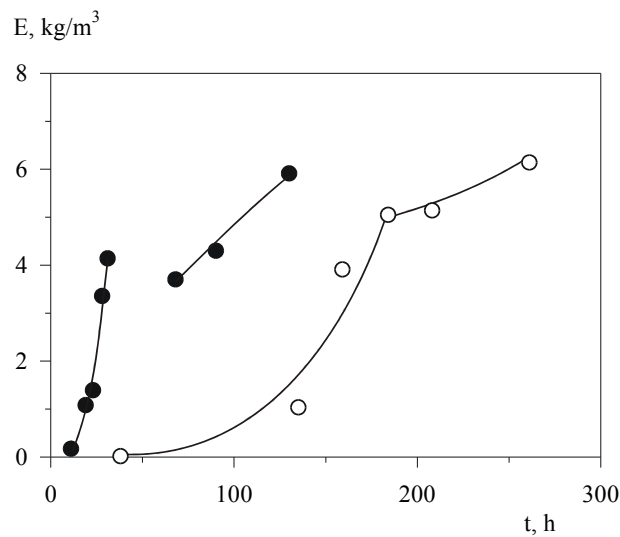
La formación de los bioproductos mayoritarios, etanol y xilitol, se ha caracterizado mediante los parámetros: velocidad específica de formación de etanol, q_E , y rendimientos en etanol, $Y_{E/s}$, y en xilitol, $Y_{Xi/s}$.

La velocidad específica de producción de etanol se ha evaluado mediante el ajuste de los resultados experimentales a la ecuación empírica (5.34) cuya linealización para los experimentos FE1 y FE3 se muestran como ejemplo en la Figura V.50 (a). En el intervalo de validez de la ecuación se observa una aceptable reproducción de los valores experimentales, Figura V.50 (b).

Una vez determinados los parámetros A y B, mediante la ecuación (5.37) se han calculado los valores de q_E^D en función del tiempo para cada uno de los experimentos de la serie, valores que se muestran en la Tabla V.34.



(a)



(b)

Fig. V.50 a) Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol para los cultivos FE3 (●) y FE1 (○)
b) Reproducción con la ecuación (5.34) para los mismos cultivos

TABLA V.34
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL
 Fermentación de hidrolizados enzimáticos
 pH = 3,5 T_F = 303 K

Expto	t, h	q _E ^D	q _E
FE1	100	0,036	0,053
	200	0,014	0,028
FE2	75	0,0060	0,0079
	100	0,0044	0,075
FE3	75	0,022	0,021
	100	0,016	0,018
FE4	15	0,15	0,19
FE5	15	0,15	0,13
	25	0,047	0,034
FE6	15	0,16	0,18
	20	0,15	---

q_E, kg/(kg h)

Por otra parte, aplicando la ecuación (5.38) se deduce que una representación de E vs (x-x₀) conduce a una línea recta de cuya pendiente se obtiene la productividad global en biomasa, Y_{E/x}^G; una vez calculado este parámetro, y por aplicación de la ecuación (5.39), puede determinarse se calcula el valor de q_E. A título de ejemplo, en la Figura V.51, se muestran las representaciones correspondientes a dos cultivos de hidrolizados enzimáticos. Así, se han calculado, mediante el método integral, los valores de q_E recogidos en la Tabla V.34, observándose una aceptable concordancia entre los valores de la velocidad específica de formación de etanol calculada por los métodos diferencial e integral.

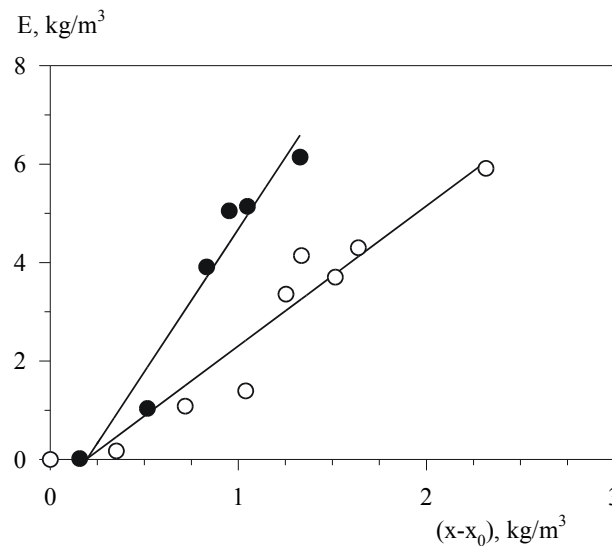


Fig. V.51 Representación del etanol producido frente a la biomasa neta en los exptos FE1 (●) y FE3 (○)

Por último, a partir de representaciones de las concentraciones de etanol y xilitol formado frente al sustrato total consumido, similares a las que se muestran en la Figura V.52 (expto FE2), se han calculado los rendimientos globales en etanol, $Y_{E/s}^G$, y xilitol, $Y_{Xi/s}^G$ que se muestran en la Tabla V.35. En cuanto al rendimiento en etanol, se obtienen valores que oscilan entre 0,21 y 0,39 kg de etanol por cada kg de sustrato consumido mientras que los rendimientos en xilitol sólo han podido calcularse para tres cultivos, con un valor máximo de 0,14 kg de xilitol por cada kg de sustrato consumido, para el resto de cultivos de hidrolizados enzimáticos sólo se han podido determinar valores medios de rendimientos puntuales.

La comparación de los rendimientos en xilitol, obtenidos con hidrolizados ácidos y enzimáticos del residuo de poda, pone de manifiesto que los valores de $Y_{Xi/s}^G$ son más elevados en la fermentación de medios obtenidos por hidrólisis enzimática. Es decir, utilizando la misma levadura y condiciones de operación prácticamente coincidentes (sólo existe diferencia en una unidad de pH), se produce una mayor desviación del sustrato hacia la producción de xilitol cuando el hidrolizado se obtiene mediante el empleo de mezclas de celulasas y hemicelulasas.

En la fermentación de hidrolizados enzimáticos, cabe señalar que el máximo rendimiento en etanol, 0,39 kg/kg, se alcanza con el hidrolizado de mayor concentración inicial de ácido acético. Concretamente en el experimento FE1 la concentración inicial de

ácido acético era próxima a $4,3 \text{ kg/m}^3$ (Tabla IV.52). También se detecta que los valores más bajos de $Y_{E/s}^G$ se obtienen con los hidrolizados de menor concentración inicial de ácido acético. Este hecho parece indicar que, en el caso de la fermentación de hidrolizados enzimáticos, ciertas concentraciones iniciales de ácido acético estimulan la producción de etanol por *P. tannophilus*, dando lugar a la obtención de mayores rendimientos en etanol. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Palmqvist *et al.* (1999b), en la fermentación de distintos hidrolizados sintéticos conteniendo posibles inhibidores (tales como ácido acético, furfural y ácido p-hidroxibenzoico), aunque utilizan otras levaduras, *Sacharomyces cerevisiae* (ATCC 96581) y *Candida shehatae* (NJ 23).

Estos autores observan que concentraciones de ácido acético inferiores a 10 kg/m^3 estimulan la obtención de mayores rendimientos en etanol, siempre en ausencia de furfural. Es probable que en nuestra investigación no exista formación de furfural durante la hidrólisis enzimática, aunque sí podría haberse producido durante los procesos de hidrólisis ácida. En este último caso, el ácido acético en lugar de presentar un efecto estimulador en la formación de etanol presentaría un efecto de inhibición por sustrato.

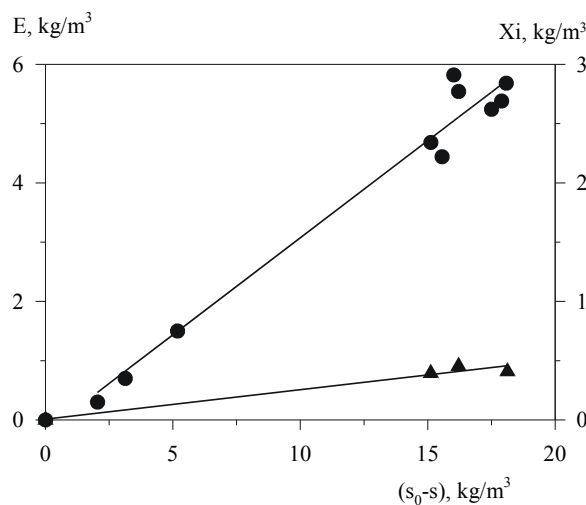


Fig. V.52 Rendimientos en etanol (●) y en xilitol (▲) en el cultivo FE2

TABLA V.35
RENDIMIENTOS EN BIOPRODUCTOS
Fermentación de hidrolizados enzimáticos
pH = 3,5 T_F = 303 K

Expto	Y _{E/s} ^G , kg/kg	Y _{Xi/s} ^G , kg/kg
FE1	0,39	0,14
FE2	0,33	0,025
FE3	0,29	0,015
FE4	0,26	0,061*
FE5	0,21	0,031*
FE6	0,28	0,056*

* Valores medios de rendimientos puntuales

VI. Conclusiones

El análisis de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación ha conducido a las siguientes conclusiones:

1. El proceso hidrolítico del residuo de poda de olivo, utilizando los ácidos sulfúrico y fosfórico en los rangos de concentración 0,0-8,0 N, temperatura 90 °C y tiempo de operación de 240 minutos muestra que la fracción hemicelulósica puede ser completamente transformada cuando se utiliza H₂SO₄ como agente hidrolítico, y a partir de una concentración 1 N. Con ácido fosfórico se logra sólo una hidrólisis parcial de la fracción hemicelulósica, incluso a la concentración más elevada (8 N), alcanzándose una conversión fraccional máxima del 77%.

La fracción celulósica del residuo es parcialmente hidrolizada con ácido sulfúrico, lográndose una conversión próxima al 36% cuando se emplea H₂SO₄ 8 N, mientras que con ácido fosfórico esta fracción permanece prácticamente inalterada incluso en los procesos con concentraciones extremas.

- 1.1 Los rendimientos en azúcares reductores totales (Y_T) y en D-glucosa (Y_G) aumentan con el tiempo de operación en el transcurso de cada experimento. Conforme se aumenta la concentración de ácido en el proceso de hidrólisis, ambos rendimientos se incrementan hasta una concentración 6 N en el caso de ácido sulfúrico y hasta la concentración extrema ensayada (8 N) en el caso del ácido fosfórico. Con H₂SO₄ 6 N se obtienen unos rendimientos máximos de Y_T = 0,30 kg kg⁻¹ e Y_G = 0,075 kg kg⁻¹, mientras que con H₃PO₄ se determina que Y_T = 0,19 kg kg⁻¹ e Y_G = 0,039 kg kg⁻¹. Estos resultados ponen de manifiesto el menor efecto hidrolítico del ácido fosfórico frente al sulfúrico.
- 1.2 Por aplicación del método diferencial de análisis de datos y realizando un análisis parcial de la ecuación cinética se ha tratado de determinar el valor de la constante cinética k₁' (referida al sustrato), y el orden de la reacción n₁, partiendo de una ecuación tipo potencial,

$$r_0 = k_1' C_A^{n_1}$$

donde r₀ representa la velocidad de reacción inicial.

En los procesos con ácido sulfúrico se determina que:

$$r_0 = 6,22 C_A^{0,97}$$

mientras que con ácido fosfórico se obtiene que:

$$r_0 = 1,42 C_A^{0,75}$$

en ambos casos se determina un orden de reacción próximo a 1.

2. En la hidrólisis con ácido sulfúrico 1 N, y fijando el tiempo de hidrólisis en 240 minutos, se ha determinado el efecto de la temperatura sobre los parámetros de conversión fraccional, rendimientos en azúcares y velocidad de reacción en el rango 333-373 K.
 - 2.1 En la fracción hemicelulósica del residuo se alcanza una conversión completa a partir de 363 K, mientras que la fracción celulósica prácticamente permanece inalterada en las condiciones de operación ensayadas.
 - 2.2 Los máximos rendimientos en azúcares se alcanzan a la temperatura más elevada, 373 K, obteniéndose que $Y_T = 0,30 \text{ kg kg}^{-1}$ e $Y_G = 0,072 \text{ kg kg}^{-1}$, aunque cabe destacar que se detecta cierta degradación de D-glucosa a esta temperatura.
 - 2.3 Se ha podido determinar la velocidad de reacción (r) en el transcurso de cada hidrólisis observándose que, a igual tiempo de proceso, r aumenta con la temperatura de operación, y que los valores más elevados para cada experimento se alcanzan al inicio del mismo ($t = 0$) disminuyendo a medida que avanza el proceso hidrolítico.
3. En la hidrólisis enzimática del residuo se ha analizado la influencia del tiempo de pretratamiento a presión con vapor (t_p), tamaño de partícula (d_p), relación enzima/sustrato (E/S), relación celulasas/hemicelulasas (EC/EH), pH y temperatura de operación (T_H).

- 3.1 En general, los valores más elevados de conversión fraccional, rendimientos en azúcares y velocidades iniciales de hidrólisis se han determinado en el proceso realizado en las siguientes condiciones:

$$\begin{array}{lll} t_p = 2 \text{ h} & d_p = 75 \text{ } \mu\text{m} & (E/S)_0 = 0,010 \\ (EC/EH) = 2/1 & \text{pH} = 4,8 & T_H = 318 \text{ K} \end{array}$$

En estas condiciones la conversión fraccional es del 41 %, los rendimientos en azúcares presentan los valores de $Y_T = 0,14 \text{ kg kg}^{-1}$ e $Y_G = 0,069 \text{ kg kg}^{-1}$, y las velocidades iniciales de hidrólisis son próximas a $0,8 \text{ kg m}^{-3} \text{ min}^{-1}$.

Estos valores ponen de manifiesto que, en las condiciones de operación ensayadas, la hidrólisis enzimática es menos eficiente que la hidrólisis ácida.

- 3.2 La variación observada en la velocidad inicial de hidrólisis con el pH se ha ajustado a la ecuación,

$$r_0 = \frac{r_{\text{máx}}}{1 + \frac{A_1}{[\text{H}_3\text{O}^+]} + B_1 [\text{H}_3\text{O}^+]}$$

que conduce a un valor de los parámetros de,

$$r_{\text{máx}} = 1,645 \text{ kg}/(\text{m}^3 \text{ min}) \quad A_1 = 2,40 \cdot 10^{-6} \text{ kmol}/\text{m}^3 \quad B_1 = 1,39 \cdot 10^4 \text{ m}^3/\text{kmol}$$

a partir de estos resultados se calcula un $\text{pH}_{\text{óptimo}} = 4,88$.

- 3.3 Las condiciones más favorables para alcanzar las conversiones, rendimientos en azúcares y velocidades de hidrólisis más elevadas son las siguientes:

- Tiempo de pretratamiento, $t_p = 3 \text{ h}$
- Menor tamaño de partícula, $d_p = 75 \text{ } \mu\text{m}$
- Relación inicial enzima/sustrato, $(E/S)_0 = 0,010$
- Relación celulasas/hemicelulasas, $EC/EH = 3/1$
(sólo para conversión fraccional y rendimientos en azúcares)
- pH óptimo de operación $\text{pH} = 4,88$
- Temperatura de operación, $T_H = 318 \text{ K}$

4. En la fermentación con *Pachysolen tannophilus*, a 303 K y pH = 3,5, de hidrolizados obtenidos utilizando como agente hidrolítico distintas concentraciones de ácido sulfúrico, se observa que los valores de la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) y productividad en biomasa (b) oscilan en estrechos rangos, 0,017-0,028 h⁻¹ y 2,1 10⁻³ - 3,4 10⁻³ kg m⁻³h⁻¹, respectivamente. Estos resultados, comparados con los obtenidos en la fermentación de azúcares sintéticos con esta misma levadura, son extremadamente pequeños (de un orden de magnitud diez veces inferior) lo cual pone de manifiesto la existencia de inhibición o efecto tóxico del sustrato. Entre los compuestos que presentan inhibición se ha comprobado la presencia del ácido acético en concentraciones iniciales de hasta 3,0 kg m⁻³, en el hidrolizado obtenido con ácido sulfúrico 1 N.

4.1 Se ha observado un consumo secuencial de los azúcares; durante una primera fase, *P. tannophilus* asimila D-glucosa hasta su consumo total, iniciando posteriormente la utilización de otros azúcares, fundamentalmente D-xilosa. En ambas fases se detecta el consumo simultáneo del ácido acético. Se ha comprobado que las velocidades específicas de consumo de D-glucosa (q_g) y sustrato total (q_s) disminuyen en el transcurso del cultivo, detectándose valores muy superiores en el período correspondiente al consumo de D-glucosa.

El rendimiento global en biomasa, $Y_{x/s}^G$ y el calculado en el período de consumo de D-glucosa, $Y_{x/g}^G$, muestran su máximo valor en el cultivo procedente de hidrólisis con ácido sulfúrico 0,5 N, determinándose unos valores de 0,055 y 0,33 kg biomasa/kg sustrato para $Y_{x/g}^G$ e $Y_{x/s}^G$, respectivamente.

4.2 La velocidad específica de producción de etanol (q_E) permanece prácticamente constante en los períodos de consumo de D-glucosa y D-xilosa. Los valores más elevados de q_E se detectan en la fermentación de los hidrolizados procedentes de procesos con ácido sulfúrico 0,5 a 1,0 N.

Los rendimientos globales en etanol ($Y_{E/s}^G$) más elevados, 0,38 y 0,35 kg etanol/kg sustrato, se determinan en los experimentos procedentes de hidrólisis con ácido 0,75 y 1,0 N, mientras que el rendimiento más alto de xilitol se alcanza con el hidrolizado obtenido con una concentración de ácido 2 N.

5. En la fermentación de los hidrolizados obtenidos modificando la temperatura de hidrólisis, se observa una evolución similar en los valores de la velocidad específica máxima de crecimiento y productividad en biomasa, apreciándose que los valores más elevados de μ_m (0,038 y 0,028 h⁻¹) y b (7,4 10⁻³ y 6,8 10⁻³ kg m⁻³ h⁻¹) corresponden a las fermentaciones

cuyas hidrólisis se realizaron a las temperaturas más suaves, a 353 y 343 K, respectivamente.

- 5.1 En todos los cultivos se ha observado que las velocidades de consumo de sustrato (q_g y q_s) disminuyen en el transcurso del bioproceso. Se determina que dichos valores aumentan con la temperatura, con un incremento notable para la fermentación del hidrolizado obtenido a 373 K, que alcanza un valor de $0,32 \text{ kg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en su fase exponencial. En general, se observa como los rendimientos globales en biomasa más elevados se determinan en los cultivos procedentes de hidrólisis realizadas a menor temperatura, hecho que también se detecta en el rendimiento en biomasa evaluado considerando el ácido acético como otro sustrato. Este rendimiento en biomasa modificado alcanza un valor de $0,11 \text{ (kg biomasa)(kg sustrato total)}^{-1}$ en el cultivo procedente de la hidrólisis realizada a 343 K.
 - 5.2 Se observa que la mayor velocidad específica de producción de etanol se determina en la fermentación del hidrolizado obtenido a 343 K, confirmándose así que la menor formación de inhibidores o compuestos tóxicos se produce a las temperaturas más bajas. Sin embargo, los rendimientos globales en etanol y xilitol más altos se calculan en la fermentación de hidrolizados obtenidos a temperaturas más elevadas. En la fermentación del hidrolizado a 373 K se determina un valor máximo de $Y_{E/s}^G$ de $0,36 \text{ (kg etanol)(kg sustrato)}^{-1}$.
6. En la fermentación de los hidrolizados de ácido fosfórico se observa que los valores máximos de $\mu_m = 0,053 \text{ h}^{-1}$ y $b = 0,0070 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, se determinan en el cultivo cuya hidrólisis fue realizada con H_3PO_4 2 N, detectándose una bajada significativa para concentraciones superiores e inferiores. Ambos parámetros presentan valores superiores a los obtenidos con los correspondientes hidrolizados de ácido sulfúrico.
- 6.1 En todos los casos se observan mayores velocidades específicas de consumo de D-glucosa en relación con D-xilosa y resto de azúcares. Durante el período de comportamiento lineal de la biomasa se aprecia cómo q_s disminuye con el tiempo. En general, los mayores valores de q_g y q_s se han determinado en los cultivos cuyos hidrolizados se han obtenido con concentración elevadas de H_3PO_4 , superiores a 1 N.

En la etapa de consumo de D-glucosa, $Y_{x/g}^G$ aumenta con la concentración de ácido hasta un valor de 0,29 (kg biomasa)(kg sustrato)⁻¹ para la fermentación realizada con hidrolizado 2 N, mientras que para una concentración de ácido fosfórico 8 N se aprecia una bajada en el valor de este rendimiento. En la etapa de consumo de D-xilosa y el resto de los azúcares no se aprecia en $Y_{x/s}^G$ una tendencia definida.

- 6.2 En general, en cada cultivo la velocidad específica de formación de etanol disminuye con el tiempo, presentando valores algo inferiores si se realiza una comparación con los obtenidos en la fermentación de hidrolizados de ácido sulfúrico.

Los máximos rendimientos globales en etanol obtenidos corresponden a los hidrolizados de 0,5 y 0,75 N, con valores de 0,38 y 0,37 (kg etanol)(kg sustrato)⁻¹, respectivamente. Sin embargo, el rendimiento más elevado en xilitol se obtiene con el hidrolizado obtenido con concentración de ácido 0,3 N.

7. La fermentación de los hidrolizados enzimáticos pone de manifiesto una menor inhibición o toxicidad en relación con los hidrolizados ácidos, obteniéndose valores superiores de la velocidad específica máxima de crecimiento. El valor máximo de μ_m , 0,13 h⁻¹, se alcanza para el cultivo cuyo hidrolizado se ha obtenido sin utilizar disolución tampón, un tiempo de pretratamiento a presión de 2 horas, un tamaño de partícula medio de 513 μm , una relación enzima/sustrato de 0,002 y de celulasas/hemicelulasas de 2. El mayor valor de la productividad en biomasa se determina en el hidrolizado obtenido con menor tamaño de partícula de residuo y con un mayor tiempo de pretratamiento con vapor.

- 7.1 Se observa que las velocidades específicas de consumo de sustrato son superiores en el período de tiempo en el que la levadura asimila D-glucosa en relación con el período donde consume D-xilosa y el resto de los azúcares, aunque esta disminución es menos acusada que cuando se fermentan los hidrolizados ácidos, lo que de nuevo pone de manifiesto que existe una menor inhibición o toxicidad por sustrato.

Los rendimientos globales en biomasa oscilan para $Y_{x/g}^G$ entre 0,05 y 0,19 kg biomasa/kg sustrato, en la fase de consumo de D-glucosa. Para $Y_{x/s}^G$ se alcanzan valores comprendidos entre 0,09 y 0,33 kg biomasa/kg sustrato, en la fase de consumo de D-xilosa y resto de azúcares. En general, el rendimiento en biomasa correspondiente al segundo período es superior al de la fase de consumo de D-glucosa, tendencia no detectada en la fermentación de hidrolizados ácidos.

- 7.2 Las velocidades específicas de formación de etanol, calculadas por los métodos diferencial (q_E^D) e integral (q_E) de tratamiento de datos cinéticos, presentan una buena concordancia en los resultados obtenidos. Se observa que los valores más elevados se obtienen en la fermentación de hidrolizados que han sido obtenidos, bien utilizando el tampón ácido acético/acetato o bien no tamponando el proceso de hidrólisis enzimática, con velocidades de 0,15 y 0,16 (kg etanol) (kg biomasa)⁻¹ h⁻¹ en la fase exponencial del crecimiento, coincidiendo con el consumo de D-glucosa.

Los rendimientos globales en bioproductos oscilan entre 0,21 a 0,39 kg etanol/kg sustrato y 0,015 a 0,14 kg xilitol/kg sustrato, determinándose los valores más altos de $Y_{E/s}^G$ e $Y_{Xi/s}^G$ en la fermentación de los hidrolizados obtenidos utilizando una disolución tampón de ácido acético/acetato.

VII. Nomenclatura

a	Parámetro de la ecuación (5.22)
a'	Parámetro de la ecuación (2.10)
A	Parámetro de la ecuación (5.34)
A ₁	Parámetro de la ecuación (5.18)
Ac	Concentración de ácido acético, kg/m ³
b	Productividad en biomasa, kg/(m ³ h)
B	Parámetro de la ecuación (5.34)
B ₁	Parámetro de la ecuación (5.18)
c	Parámetro de la ecuación (5.23)
C _A	Concentración de ácido, N
C _{A0}	Concentración inicial de ácido en la disolución de hidrólisis, N
C _{ASL}	Concentración de lignina soluble en ácido, kg/(kg sólido seco)
CEL	Celulosa, %
CEN	Cenizas, %
C _L	Concentración de lignina total, kg/(kg sólido seco)
CNB	Capacidad de neutralización de la biomasa, (eq H ₂ SO ₄)/(g biomasa seca)
C _{S,m}	Concentración máxima de azúcares totales, kg/m ³
C _x	Concentración de xilosa en el hidrolizado, kg/m ³
C _{x,m}	Concentración potencial máxima de xilosa, kg/m ³
dE/dt	Velocidad de producción de etanol por unidad de volumen, kg/(m ³ h)

DNS	Reactivo dinitrosalicílico
d_p	Diámetro medio de partícula, μm
E	Concentración de etanol, kg/m^3
E_a	Energía de activación, kJ/mol
$(E/S)_0$	Relación inicial enzima/sustrato, kg/kg
EC/EH	Relación celulasas/hemicelulasas, kg/kg
E_T	Concentración teórica máxima alcanzable de etanol, kg/m^3
FAD	Fibra Ácido Detergente, %
FND	Fibra Neutro Detergente, %
g	Concentración de D-glucosa, kg/m^3
H_f	Fracción de xilano de hidrólisis rápida
H_{f0}	Fracción de xilosa equivalente (obtenida de xilano) inicial
H_s	Fracción de xilano de hidrólisis lenta
HEM	Hemicelulosa, %
HUM	Humedad, %
k_0	Constante preexponencial de la ecuación de Arrhenius, ecuación (2.10)
k'_1	Constante cinética referida al sustrato, ecuación (5.8)
k'_2	Constante cinética referida al sustrato, ecuación (5.11)
k_f	Constante cinética de la reacción (2.3), s^{-1}
k_s	Constante cinética de la reacción (2.3), s^{-1}

k_d	Constante cinética de la reacción (2.3), s^{-1}
k_h	Constante cinética de la reacción de hidrólisis (reacciones 2.15 y 2.16), s^{-1}
K_m	Constante de Michaelis-Menten, ecuación (5.15)
LIG	Lignina, %
m	Parámetro de la ecuación (5.5)
n	Parámetro de la ecuación (2.10), min^{-1}
n_1	Orden de reacción, ecuación (5.8)
n_2	Orden de reacción, ecuación (5.11)
P	Presión, kPa
pH	pH de operación
q_g^D	Velocidad específica de consumo de D-glucosa, determinada usando el método diferencial, (kg D-glucosa)/(h kg biomasa)
q_E^D	Velocidad específica de producción de etanol, determinada usando el método diferencial, (kg etanol)/(h kg biomasa)
q_s^D	Velocidad específica de consumo de D-xilosa y del resto de azúcares, determinada usando el método diferencial, kg/(h kg biomasa)
q_E	Velocidad específica de producción de etanol, (kg etanol)/(h kg biomasa)
q_g	Velocidad específica de consumo de D-glucosa, (kg D-glucosa)/(h kg biomasa)
q_s	Velocidad específica de consumo de D-xilosa y del resto de azúcares, kg/(h kg biomasa)
r	Velocidad de hidrólisis, $kg/(m^3 \text{ min})$
r_0	Velocidad inicial de hidrólisis, $kg/(m^3 \text{ min})$

Ref.	Residuo de poda de partida
$r_{\text{máx}}$	Velocidad máxima de hidrólisis, $\text{kg}/(\text{m}^3 \text{ min})$
s	Concentración de sustrato, kg/m^3
s_0	Concentración de sustrato inicial, kg/m^3
t	Tiempo, h o min
T_F	Temperatura de fermentación, K
T_H	Temperatura de hidrólisis, K
t_p	Tiempo de pretratamiento, h
x	Concentración de biomasa, kg/m^3
X	Fracción de xilosa en disolución respecto de la máxima que podría obtenerse
X_C	Conversión de la fracción de celulosa, %
X_H	Conversión de la fracción de hemicelulosa, %
x_1	Concentración de biomasa al comienzo de la fase de crecimiento exponencial, kg/m^3
X_i	Concentración de xilitol, kg/m^3
x_0	Concentración inicial de biomasa, kg/m^3
X_R	Fracción de xilosa equivalente que queda en el residuo sólido
Y_G	Rendimiento de hidrólisis en D-glucosa, $(\text{kg D-glucosa})/(\text{kg residuo seco})$
$Y_{E/s}$	Rendimiento instantáneo en etanol, $(\text{kg etanol})/(\text{kg sustrato})$
$Y_{E/x}$	Productividad instantánea en etanol, $(\text{kg etanol})/(\text{kg biomasa})$

$Y_{E/s}^G$	Rendimiento global en etanol, (kg etanol)/(kg sustrato)
$Y_{E/x}^G$	Productividad global en etanol, (kg etanol)/(kg biomasa)
Y_T	Rendimiento de hidrólisis en azúcares reductores totales, (kg azúcar reductor)/(kg residuo seco)
$Y_{x/(Ac+s)}$	Rendimiento instantáneo en biomasa a partir de ácido acético y sustrato total, (kg biomasa)/(kg sustrato total)
$Y_{x/(Ac+s)}^G$	Rendimiento global en biomasa a partir de ácido acético y sustrato total, (kg biomasa)/(kg sustrato total)
$Y_{x/g}$	Rendimiento instantáneo en biomasa a partir de D-glucosa, (kg biomasa)/(kg D-glucosa)
$Y_{x/g}^G$	Rendimiento global en biomasa a partir de D-glucosa, (kg biomasa)/(kg D-glucosa)
$Y_{x/s}$	Rendimiento instantáneo en biomasa a partir de D-xilosa y del resto de azúcares, (kg biomasa)/(kg sustrato)
$Y_{x/s}^G$	Rendimiento global en biomasa a partir de D-xilosa y del resto de azúcares, (kg biomasa)/(kg sustrato)
$Y_{Xi/s}$	Rendimiento instantáneo en xilitol, (kg xilitol)/(kg sustrato)
$Y_{Xi/s}^G$	Rendimiento global en xilitol, (kg xilitol)/(kg sustrato)
z	Parámetro de la ecuación (5.5)

LETRAS GRIEGAS

α	Parámetro de la ecuación (5.25)
β	Parámetro de la ecuación (5.25)
μ	Velocidad específica de crecimiento, h ⁻¹
μ_m	Velocidad específica máxima de crecimiento, h ⁻¹
ν	Frecuencia, kHz
τ	Parámetro de la ecuación (5.35)
φ	Relación inicial sólido/líquido, kg/kg

VIII. Bibliografía

- ⇒ Adney B., Baker J. (1996). Measurement of Cellulase Activities (LAP-006). En Chemical Analysis and Testing Task. Laboratory Analytical Procedure, *National Renewable Energy Laboratory (NREL), Midwest Research Institute (MRI)*, U.S.Department of Energy
- ⇒ Alexander M.A., Chapman T.W. Jefferies T.W. (1988). Continous xylose fermentation by *Candida shehatae* in a two-stage reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **17/18**, 221-229
- ⇒ Alonso M.S. La biomasa como fuente de energía
<http://www.meteotemp.es/biomasa.php>; accedido el día 20-8-2002
- ⇒ Amartey S., Jeffries T. (1996). An improvement in *Pichia stipitis* fermentation of acid-hydrolyses hemicellulose achieved by overliming (calcium hydroxide treatment) and strain adaptation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 281-283
- ⇒ Antal M.J. (Jr) (1983). Effects of reactor severity on the gas-phase pyrolysis of cellulose -and Kraft lignin- derived volatile matter. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **22** (2), 366-375
- ⇒ Arias P.L., Legarreta J.A., Gutiérrez-Cañas C., Minguito J.J. (1985). Procesos térmicos para la obtención de gas combustible a partir de biomasa. Vol IV (Actas). *VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias*, Murcia, 161-170
- ⇒ Aristidou A., Penttilä M. (2000). Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 187-198
- ⇒ Arkenol I. Concentrated acid hydrolysis
<http://www.arkenol.com>; accedido el día 28-8-2002
- ⇒ Baillargeon M.W., Jansen N.B., Gong C.S., Tsao, G.T. (1983). Effect of oxygen uptake rate on ethanol production by a xylose-fermenting yeast mutant *Candida sp.* XF217. *Biotechnol. Lett.* **5**, 339-344
- ⇒ Bain R.L., Overend R.P., Craig K.R. (1998). Biomass-fired power generation. *Fuel Process. Technol.* **54**, 1-16

- ⇒ Ballesteros I., Oliva J.M., Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros M. (2002). Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. *Process Biochem.* **38**, 187-192
- ⇒ Beck M.J., Johnson R.D., Baker C.S. (1990). Ethanol production from glucose/xylose mixes by incorporating microbes in selected fermentation schemes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **24/25**, 415-424
- ⇒ Belkacemi K., Hamoudi S. (2003). Enzymatic hydrolysis of dissolved corn stalk hemicelluloses: reaction kinetics and modeling. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **78**, 802-808
- ⇒ Bergmeyer H.U., Bernt E., Schmidt F., Stork H. (1974). Methods of Enzymatic Analysis. (Bergmeyer, H.U. Ed.), Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, 2nd ed. Vol. 3, Nueva York, 1196-1201
- ⇒ Bergmeyer H.U., Möllering H. (1974). Methods of Enzymatic Analysis. (Bergmeyer, H.U. Ed.), Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, 2nd ed. Vol. 3, Nueva York, 1520-1528
- ⇒ Beutler H.O., Becker J. (1977). Enzymatischen Bestimmung von D-Sorbit und Xylit in Lebensmitteln. *Deutsche Lebensmittel - Rundschau* **6**, 182-187
- ⇒ Beutler H.O., Michal G. (1977). Neue Methode zue enzymatischen Bestimmung von Ethanol in Lebensmitteln. *Z. Anal. Chem.* **284**, 113-117
- ⇒ Bhat M.K., Hazlewood G.P. (2001). Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. En: Enzymes. Farm. Animal. Nutrition. Ed. M.R. Bedford and G.G. Partridge
- ⇒ Bilbao R., Arauzo J., Millera A., Lezaun J. (1985). Pirólisis de biomasa lignocelulósicas. Vol. IV (Actas). *VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias*, Murcia, 197-204
- ⇒ Björling T., Lindman B. (1989). Evaluation of xylose-fermenting yeasts for ethanol production from spent sulfite liquor. *Enzyme Microb. Technol.* **11** (4), 240-246

- ⇒ Bravo V., Camacho F., Sánchez S., Castro E. (1993). The effect of pH on kinetic and yield parameters during the etanolic fermentation of D-xylose with *Pachysolen tannophilus*. *Bioprocess Eng.* **9** 159-165
- ⇒ Bravo V., Martínez M.E., Sánchez S., Castro E., Sánchez P. (1995). Fermentación etanólica de disoluciones de D-xilosa con *Pachysolen tannophilus*. Influencia del nivel de aireación. *Afinidad* **52** (457) 189-196
- ⇒ Bridgwater A.V. (1990). Biomass Pyrolysis Technologies. En: Biomass for Energy and Industry (5th European Conference). Vol 2, Conversion and Utilisation of Biomass. G. Grassi, G. Gosse, G. dos Santos (eds), Elsevier Applied Science, Londres, 2489-2496
- ⇒ Bueno J., Estevez A.M., Fernández A., Martín J.L., Ramos P. (1985). Aprovechamiento de la paja de cereales mediante procesos termoquímicos. Vol IV (Actas). *VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias*, Murcia, 197-204
- ⇒ Calle M.S. Energía de la biomasa
<http://www.ideal.es/waste/biomasa.htm>; accedido el día 21-8-2002
- ⇒ Camacho F., González P., Jurado E., Páez M.P. (1985). Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos (parte I). *Ing. Quím.* **17** (200), 297-301
- ⇒ Camacho F., González P., Jurado E., Páez Dueñas M.P. (1986). Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos (parte II). *Ing. Quím.* **18** (203), 117-123
- ⇒ Camacho F., González P., Jiménez J.M., Moya M. (1987). Influencia de las condiciones de pretratamiento con NaOH sobre la eficacia de la hidrólisis enzimática de la paja de trigo. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* **27** (2), 231-236
- ⇒ Camacho F., Bravo V., Sánchez S., Castro M. (1989). The influence of temperature, pH and aeration on the etanolic fermentation of glucose by *Pachysolen tannophilus*. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **54**, 1244-1255
- ⇒ Carrasco J.E., Martínez J.M., Pérez J., Molina A. (1992a). La hidrólisis ácida como tecnología para el fraccionamiento de la biomasa lignocelulósica (I). *Ing. Quím.* **24** (274), 261-268

- ⇒ Carrasco J.E., Martínez J.M., Pérez J., Molina A. (1992b). La hidrólisis ácida como tecnología para el fraccionamiento de la biomasa lignocelulósica (II). *Ing. Quím.* **24** (275), 195-200
- ⇒ Carrasco J.E. Aspectos medioambientales de la producción y uso de la biomasa como recurso energético
<http://www.gem.es/MATERIALES/DOCUMENT/DOCUMENT/g02/d02105/d02105.htm>; accedido el día 24-5-2001
- ⇒ Castillo J. (1999). La biomasa y su aprovechamiento energético. Tecnologías, ventajas y limitaciones. *Quím. Ind.* **46** (7), 12-16
- ⇒ Chang H.M., Sarkanen K.V. (1973). Species variation in lignin: effect of species on the rate of kraft delignification. *Tech. Assoc. Pulp. Pap. Ind.* **56**, 132-134
- ⇒ Chaparro B.M., Jiménez M.T., Vázquez A. (1989). Pirólisis de los desperdicios sólidos municipales. *Ing. Quím.* **21** (243), 215-218
- ⇒ Chapman V.J. (1978) "Chemraw 1", St. Pierre, L.E. y Brown, G.R. (Eds.), Pergamon Press
- ⇒ Cheng L.F., Gong C.S. (1985). Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate-acclimatized yeast. *J. Food Sci.* **50**, 226-228
- ⇒ C.I.F.A. "Alameda del Obispo" (2003). Servicio de asesoramiento al regante. *ASAJA* **263**, 22-30
- ⇒ Collado E. Levaduras y la fermentación alcohólica
<http://www.verema.com/opinamos/tribuna/articulos/levaduras01.htm>; accedido el día 13-1-2003
- ⇒ Consejería de Agricultura y Pesca Junta de Andalucía.
<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/publico/>; accedido el día 14-7-2003
- ⇒ Converti A., Del Borghi M. (1998). Inhibition of the fermentation of oak hemicellulose acid-hydrolysate by minor sugar. *J. Biotechnol.* **64**, 211-218

- ⇒ Corella J., Bibao R., González J., Fernández F. (1985). Estado actual en el mundo de los procesos de pirólisis y gasificación industrial de biomásas. Vol IV (Actas). *VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias*, Murcia, 151-160
- ⇒ Corella J., Aznar M.P., Martínez J.M., Iglesias J.L. (1990). Steam Gasification of Biomass in Fluidized Bed with a Secondary Catalytic Bed: III Use of Methanation Catalysts. En: *Biomass for Energy and Industry (5th European Conference)*. Vol 2, Conversion and Utilisation of Biomass. G. Grassi, G. Gosse, G. dos Santos (Eds), *Elsevier Applied Science*, Londres, 2749-2754
- ⇒ Deacon J.W. (1997). *Modern mycology*. *Blackwell Science*, Oxford
- ⇒ Delgenes J.P., Moleta R., Navarro J.M. (1988). Continuous production of ethanol from a glucose, xylose and arabinose mixture by a flocculent strain of *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Lett.* **10**, 725-730
- ⇒ Delgenes J.P., Moleta R., Navarro J.M. (1990). Acid hydrolysis of wheat straw and process considerations for ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Process Biochem. Int.* **8**, 132-135
- ⇒ Delgenes J.P., Moleta R., Navarro J.M. (1996). Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enz. Microb. Technol.* **19** (3), 220-225
- ⇒ Demirbaş A. (2001). Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. *Energ. Conv. Manage.* **42**, 1357-1378
- ⇒ Detroy R.W., Cunningham R.L., Herman A.I. (1982). Fermentation of wheat straw hemicelluloses to ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **12**, 81-89
- ⇒ Domínguez J.M., Gong C.G., Tsao G.T. (1996). Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57/58**, 49-56

- ⇒ Domínguez J.M., Cao N.J., Gong C.G., Tsao G.T. (1997). Xylitol production from hybrid poplar wood chips pretreated by the ammonia steeping process. *Biotechnol. Techn.* **11** (5), 339-341
- ⇒ du Preez J.C., van Driessel B., Prior B.A. (1988). The relation between redox potential and D-xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Lett.* **10**, 901-906
- ⇒ Eken-Saraçoğlu N., Mutlu S.F., Dilmaç G., Çavuşoğlu H. (1998). A comparative kinetic study of acidic hemicellulose hydrolysis in corn cob and sunflower seed hull. *Biores. Technol.* **65** (1-2), 29-33
- ⇒ Elortegui N., Jarabo F., Pérez C., Díaz F. (1985). Tratamiento aerobio de residuos de plataneras. Vol. IV (Actas), *VI Congreso Nacional de Química*, Murcia, 501-507
- ⇒ Esteghlalian A., Hashimoto A.G., Fenske J.J., Penner M.H. (1997). Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar, and switchgrass. *Biores. Technol.* **59** (2-3), 129-136
- ⇒ Fanta G.F., Abbott T.P., Herman A.I., Burr R.C., Doane W.M. (1984). Hydrolysis of wheat straw hemicellulose with trifluoroacetic acid. Fermentation of xylose with *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1122-1125
- ⇒ Felipe M.G.A., Alves L.A., Silva S.S., Roberto I.C., Mancilha I.M., Almeida e Silva J.B. (1996). Fermentation of eucalyptus hemicellulosic hydrolysate to xylitol by *Candida guilliermondii*. *Biores. Technol.* **56** (2-3) 281-283
- ⇒ Fernández J. (1980). La agricultura como productora de energía. *Ing. Quím.* **12** (140), 23-32
- ⇒ Fernández J., Lucas H. (Asociación para la difusión de la aplicación de la biomasa en España). La biomasa en España
<http://www.energetica21.com/articulo8.html>; accedido el día 20-8-2002
- ⇒ Ferrari M.D., Neirotti E., Albornoz C., Saucedo, E. (1992). Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 753-759

- ⇒ Font R., Marcilla A., Verdu E., Devesa J. (1985). Pirólisis flash de cáscara de almendra en lecho fluidizado. I. Influencia de la temperatura. Vol. IV (Actas). *VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias*, Murcia, 179-188
- ⇒ Galbe M., Zacchi G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 618-628
- ⇒ Gan Q., Allen S.J., Taylor G. (2003). Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling. *Process Biochem.* **38**, 1003-1018
- ⇒ García P., Otero J. (2000). Gasificación de biomasa. Revisión y descripción de las tecnologías. *Energía* **26** (1), 61-70
- ⇒ Gong C.S., Chen C.S., Chen L.F. (1993). Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolyzate for ethanol production by yeast. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **39/40**, 83-88
- ⇒ González G., Caminal G., De Mas C., López-Santín J. (1990). Bioconversión de materiales lignocelulósicos: perspectivas y limitaciones del proceso. *Ing. Quím.* **22** (259), 645-654
- ⇒ Helt J.E., Agrawal R.K. (1988). Liquids from Municipal Solid Waste. En: *Pyrolysis Oils from Biomass*, Soltes, J, Milne, T.A. (Eds.), American Chemical Society, Washington, 79-91
- ⇒ Herrera A., Téllez-Luis S.J., Ramírez J.A., Vázquez M. (2003). Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid. *J. Cereal Sci.* **37**, 267-274
- ⇒ Hewstock M.E. (1978). "Chemraw 1", St. Pierre L.E., Brown G.R. (Eds.), *Pergamon Press*, 63
- ⇒ Humanes J. (1994). Poda y Recolección en Olivar. En: *Olivicultura*. Fundación La Caixa, Barcelona, 77-82
- ⇒ Jarabo F., Elortegui N. (2000). Energías renovables. *S.A.T.P. Publicaciones Técnicas S.L.*, Madrid

- ⇒ Jarabo F., Pérez C., Sanz M. La Energía de la Biomasa http://nti.educa.rcanaria.es/blas_cabrera/TER/trenovab.htm accedido el día 17-8-2002
- ⇒ Jeffries T.W. (1982). A comparison of *Candida tropicalis* and *Pachysolen tannophilus* for conversion of xylose to ethanol. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **12**, 103-110
- ⇒ Jiménez L., Ferrer J.L., González F. (1987). Combustión de residuos agrícolas, forestales y de industrias agroalimentarias. *II Jornadas de Biomasa*, Soria, 4.4.1, 4.4-4
- ⇒ Jiménez L., Sánchez I. (1989). Residuos agrícolas para la obtención de pastas celulósicas en España. *Ing. Quím.* **21** (241), 169-178
- ⇒ Jiménez L., López F., Sánchez I. (1990a). Caracterización de residuos de la tala del olivo para la obtención de pastas celulósicas. *El Papel*, Julio-Agosto, 57-61
- ⇒ Jiménez L., Sánchez I., López F. (1990b). Characterization of Spanish agricultural residues with a view to obtaining cellulose pulp. *Tappi J.* **73** (8), 173-176
- ⇒ Jiménez L., Pérez I., García J.C., Rodríguez A. (2001). Influence of process variables in the ethanol pulping of olive tree trimmings. *Biores. Technol.* **78** (1), 63-69
- ⇒ Jönsson L.J., Palmqvist E., Nilvebrant N.O., Hahn-Hägerdal B. (1998). Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 691-697
- ⇒ Kuyper M., Harhangi H.R., Stave A.K., Winkler A.A., Jetten M.S.M., de Laat W.T.A.M., den Ridder J.J.J., Op den Camp H.J.M., van Dijken J.P., Pronk J.T. (2003). High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **1574**, 1-10
- ⇒ Lago J.M., Saldaña J.A. (1987). Aprovechamiento de residuos sólidos urbanos mediante pirólisis. *II Jornadas de Biomasa*, Soria, 5.3.1, 5.3.4
- ⇒ Laplace J.M., Delgenes J.P., Moletta R., Navarro J.M. (1993). Cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* co-cultured with a xylose-fermenting yeast. *J. Ferment. Bioeng.* **75**, 207-212

- ⇒ Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Tengborg Ch., Stenberg K., Zacchi G., Nilvebrant N.O. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb. Technol.* **24**, 151-159
- ⇒ Laser M., Schulman D., Allen S.G., Lichwa J., Antal M.J., Lynd L.R. (2002). A comparasion of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Biores. Technol.* **81** (1), 33-44
- ⇒ Lavarack B.P., Griffin G.J., Rodman D. (2000). Measured kinetics of the acid-catalysed hydrolysis of sugar cane bagasse to produce xylose. *Catalysis Today* **63**, 257-265
- ⇒ Lavarack B.P., Griffin G.J., Rodman D. (2002). The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. *Biomass and Bioenergy* **23**, 367-380
- ⇒ Lee J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol: Review article. *J. Biotechnol.* **56**, 1-24
- ⇒ Levy-Lambert A., Darío J.P., Tricaud P.M., Gosset F. (1980). Biomass et énergie, *Inst. Nat. Agro.*, Paris-Grignon
- ⇒ Lindegren C.C., Nagai S., Nagai H. (1958). Induction of respiratory deficiency in yeast by manganese, copper, cobalt and nickel. *Nature* **182**, 446-448
- ⇒ Lindén T., Hanh-Hägerdal B. (1989). Fermentation of lignocellulose hydrolysates with yeasts and xylose isomerase. *Enz. Microb. Technol.* **11**, 583-589
- ⇒ Lis M.J., Carrillo F., Colom X., Martínez D., Nogués F. (2000). Hidrólisis ácida de paja previa a su tratamiento enzimático. Determinación de un modelo cinético. *Ing. Quím.* **32** (369), 181- 186
- ⇒ Litzen J.A., Hofstetter E.M.(1990) Combustion of Waste Wood from a Wood Toy Factory in a Rotatory Kiln for the Production of Electricity and Process Steam. En: Biomass for Energy and Industry (5th European Conference). Vol 2, Conversion and Utilisation of Biomass. G. Grassi, G. Gosse, G. dos Santos (Eds), *Elsevier Applied Science*, Londres, 2560-2564

- ⇒ Maiorella B., Blanch H.W., Wilke C.R. (1983). By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Sacharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 103-121
- ⇒ Marcos F. (1999). Centrales eléctricas de biomasa. *Montajes e Instalaciones* **29** (333) 85-91
- ⇒ McGinnis G.D., Wilson W.W., Mullen C.E. (1983a). Biomass pretreatment with water and high-pressure oxygen. The wet-oxidation process. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **22** (2), 352-357
- ⇒ McGinnis G.D., Wilson W.W., Price S.E., Chen Ch. (1983b). Conversion of biomass into chemicals with high-temperature wet oxidation. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **22** (4), 633-636
- ⇒ Menéndez E. (1999). Posibilidades de uso energético de la biomasa. *Ing. Quím.* **31** (361), 252-256
- ⇒ Miles T. (Ed.). Bioenergy. Links from the Bioenergy Discussion Lists <http://www.crest.org/bioenergy/index.html>; accedido el día 26-8-2002
- ⇒ Millati R., Niklasson C., Taherzadeh M.J. (2002). Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* **38**, 515-522
- ⇒ Miller G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31** (3), 426-428
- ⇒ Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. <http://www.mapa.es/indices/pags/agric/index.htm>, accedido el día 14-7-2003
- ⇒ Minkova V., Marinov S.P., Zanzi R., Bjornbom E., Budinova T., Stefanova M., Lakov L. (2000). Thermochemical treatment of biomass in a flow of steam or in a mixture of steam and carbon dioxide. *Fuel Process. Technol.* **62**, 45-52
- ⇒ Moya A.J. (1997). Hidrólisis y fermentación del residuo de poda de olivo. Tesis Doctoral. *Universidad de Jaén*, Jaén

- ⇒ Nigam J.N. (2002). Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *J. Biotechnol.* **97**, 107-116
- ⇒ Office of Hazardous Materials Safety "Research and Special Programs Administration" http://hazmat.dot.gov/erg2000/sp_erg2000/sp_psn_a.htm; accedido el día 30-10-2002
- ⇒ Ortega M. (2001). Energías renovables. *Paraninfo*, Madrid
- ⇒ Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Galbe M., Zacchi G. (1996). The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Enz. Microb. Technol.* **19** (6), 470-476
- ⇒ Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Szengyel Z., Zacchi G., Réczey K. (1997). Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment. *Enz. Microb. Technol.* **20** (4), 286-293
- ⇒ Palmqvist E., Galbe M., Hahn-Hägerdal B. (1998). Evaluation of cell recycling in continuous fermentation of enzymatic hydrolysates of spruce with *Saccharomyces cerevisiae* and on-line monitoring of glucose and ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **50**, 545-551
- ⇒ Palmqvist E., Almeida J.S., Hahn-Hägerdal B. (1999a). Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* **62** (4), 447-454
- ⇒ Palmqvist E., Grage H., Meinander N.Q., Hahn-Hägerdal B. (1999b). Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and *p*-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* **63** (1), 46-55
- ⇒ Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000a). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Biores. Technol.* **74** (1), 17-24
- ⇒ Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000b). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Biores. Technol.* **74** (1), 25-33

- ⇒ Parajó J.C., Vázquez D., Alonso J.L., Santos V., Domínguez H. (1993). Prehydrolysis of *Eucalyptus* wood with dilute sulphuric acid: operation at atmospheric pressure. *Holz als Roh- und Werkstoff* **51**, 357-363
- ⇒ Parajó J.C., Santos V., Del Río F. (1995). Hidrólisis de la fracción hemicelulósica de la madera de pino. I. Cinética y distribución de productos en operación a presión atmosférica. *Afinidad* **457**, 161-170
- ⇒ Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M. (1996a). Study of charcoal adsorption for improving the production of xylitol from wood hydrolysates. *Bioproc. Eng.* **16**, 39-43
- ⇒ Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M. (1996b). Charcoal adsorption of wood hydrolysates for improving their fermentability: influence of the operational conditions. *Biores. Technol.* **57** (2), 179-185
- ⇒ Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez, J.M.(1996c). Xylitol from wood: study of some operational strategies. *Food Chem.* **57**, 531-535
- ⇒ Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M.(1996d). Production of xylitol from concentrated wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii*: effect of the initial cell concentration. *Biotechnol. Lett.* **18**, 593-598
- ⇒ Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M. (1997). Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. *Enzyme Microb. Technol.* **21** (1) 18-24
- ⇒ Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M. (1998a). Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Biores. Technol.* **65** (3), 191-201
- ⇒ Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M. (1998b). Biotechnological production of xylitol. Part 2: operation in culture media made with commercial sugars. *Biores. Technol.* **65** (3), 203-212
- ⇒ Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M. (1998c). Biotechnological production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Biores. Technol.* **66** (1), 25-40

- ⇒ Parekh S.R., Parekh R.S., Wayman M. (1987). Fermentation of wood-derived acid hydrolysate in a batch bioreactor by *Pichia stipitis*. *Process Biochem.* **22**, 85-91
- ⇒ París J.M., Cairo J., Bardulet M. (1990). Utilisation of Methanogenic Sedimentes as Inocula for Low Temperature Anaerobic Sedimenters. En: Biomass for Energy and Industry (5th European Conference). Vol 2, Conversion and Utilisation of Biomass. G. Grassi, G. Gosse, G. dos Santos (Eds), *Elsevier Applied Science*, Londres, 2146-2152
- ⇒ Perego P., Converti A., Palazzi E., Del Borghi M., Ferraiolo G. (1990). Fermentation of hardwood hemicellulose hydrolysate by *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *J.Ind Microb.* **6**, 157-164
- ⇒ Pessoa A., Mancilha, I.M., Sato S. (1996). Recovery of extracellular by expanded bed adsorption. *J. Biotechnol.* **51** (1), 83-88
- ⇒ Phowchinda O., Delia-Dupuy M.L., Strehaiano P. (1995). Effects of acetic acid on growth and fermenting activity of *Sacharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **17** (2), 237-242
- ⇒ Prior B.A., Kilian, S.G, du Preez. J.C. (1989). Fermentation of D-xylose by the yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Process. Biochem.* **24** (1), 21-32
- ⇒ Pye E.K., Humphrey A.E. (1979). Production of liquid fuels from cellulosic biomass. En: Proceedings of the Third Annual Conference on Biomass Energy Systems, SERI/TP-33-285, *National Technical Information Service*, Springfield, 69-75
- ⇒ Rabbani M.M. (1989). Procesos de hidrólisis ácida de la biomasa celulósica. *Ing. Quím.* **21** (245), 139-146
- ⇒ Ranatunga T.D., Jervis J., Helm R.F., McMillan J.D., Hatzis C. (1997). Toxicity of hardwood extractives toward *Saccharomyces cerevisiae* glucose fermentation. *Biotechnol. Lett.* **19** (11), 1125-1127
- ⇒ Rivas B., Domínguez J.M., Domínguez H., Parajó J.C. (2002). Bioconversion of posthydrolysed autohydrolysis liquors: an alternative for xylitol production from corn cobs. *Enz. Microb. Technol.* **31**, 431-438

- ⇒ Roberto I.C., Laci L.S., Barbosa, M.F.S., Mancilha I.M.(1991). Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. *Process. Biochem.* **26**, 15-21
- ⇒ Roberto I.C., Felipe M.G.A., de Mancilha I.M., Vitolo M., Sato S., da Silva S.S. (1995a). Xylitol production by *Candida guilliermondii* as an approach for the utilization of agroindustrial residues. *Biores. Technol.* **51** (2-3), 255-257
- ⇒ Roberto I.C., Sato S., Demancilha I.M., Taqueda M.E.S. (1995b). Influence of media composition on xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. *Biotechnol. Lett.* **17**, 1223-1228
- ⇒ Roberto I. C., Sato S. Mancilha I. M. (1996a). Effect of inoculum level of xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. *J. Ind. Microb.* **16**, 348-350
- ⇒ Roberto I. C., Sato S. Mancilha I. M. (1996b). Bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate for the production of xylitol: effect of pH and nitrogen source. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57/58**, 339-347
- ⇒ Roberto I.C., Mussatto S.I., Rodrigues R.L.C.B. (2003). Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Ind. Crops Prod* **17**, 171-176
- ⇒ Rodríguez .J.J., García F., Cordero T. (1989). La pirólisis como vía de aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos. *Ing. Quím.* **21** (249), 141-147
- ⇒ Rolz C. (1986). *Biotechnol. Lett.* **8**, 131-135
- ⇒ Saeman J.F. (1945). Kinetics of wood saccharification. Hydrolysis of cellulose and decomposition of sugars in dilute acid at high temperature. *Ind. Eng. Chem.* **37** (1), 43-52
- ⇒ Saha B.C., Bothast R.J. (1996). Production L-arabitol from L-arabinose by *Candida entomaea* and *Pichia guilliermondii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45** (3), 299-306

- ⇒ Sanches R.B.C. (Departamento de Estudios Energéticos y Directoría de Planificación e Ingeniería - DP. Eletrobras). Sistema de Gasificación de Madera para Generación de Energía Eléctrica
http://www.mct.gov.br/clima/espan/comunic_old/biomsgef.htm; accedido el día 26-8-2002
- ⇒ Sánchez S., Bravo V., Castro E., Moya A.J., Camacho F. (1999). Comparative study of the fermentation of mixtures of D-glucose/D-xylose mixtures with *Pachysolen tannophilus* and *Candida shehatae*. *Bioprocess Eng.* **21**, 525-532
- ⇒ Sánchez S., Moya A.J., Moya M., Romero I., Torrero R., Bravo V., San Miguel M.P. (2002a). Aprovechamiento del residuo de poda del olivar. *Ing. Quím.* **34** (391), 194-202
- ⇒ Sánchez S., Bravo V., Castro E., Moya A.J., Camacho F. (2002b). The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77**, 641-648
- ⇒ Sansoucy R. (1985). Los subproductos del olivar en la alimentación animal en la cuenca del Mediterráneo. *FAO*, Roma
<http://www.fao.org/DOCREP/004/X6545S/X6545S00.HTM>
- ⇒ Schneider H., Wang P.Y., Chan Y.K., Maleszka R. (1981). Conversion of D-xylose into ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Lett.* **3** (2), 89-92
- ⇒ Skoog K., Hahn-Hagerdal B. (1990). Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3389-3394
- ⇒ Slininger P.J., Bothast R.J., van Cauwenberge J.E., Kurtzman C.P. (1982). Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 371-384
- ⇒ Slininger P.J., Bothast R.J., Okos M.R., Ladisch M.R. (1985). Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentrations. *Biotechnol. Lett.* **7**, 431-436
- ⇒ Soler A.A., Gámez P.P., Rubio T.M. (1981). Caracterización de residuos agrícolas en el sureste español como biomásas energéticas. *Ing Quím.* **13** (152), 73-78

- ⇒ Sreenath H.K., Chapman T.W., Jeffries T.W. (1986). Ethanol production from D-xylose in batch fermentations with *Candida shehatae*: process variables. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 292-299
- ⇒ Sun Y., Cheng J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biores. Technol.* **83** (1), 1-11
- ⇒ Taherzadeh M.J., Niklasson C., Lidén G. (1997). Acetic acid -- friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*?. *Chem. Eng. Sci.* **52** (15), 2653-2659
- ⇒ Taherzadeh M.J. Ethanol from Lignocellulose: Physiological effects of inhibitors and fermentation strategies
<http://www.cre.chalmers.se/~taher/mtthesis.pdf>; accedido el día 22-5-2003
- ⇒ Téllez-Luis S.J., Ramírez J.A., Vázquez M. (2002). Mathematical modelling of hemicellulosic sugar production from sorghum straw. *J. Food Eng.* **52**, 285-291
- ⇒ Tolan J.S., Finn R.K. (1987). Fermentation of D-xylose to ethanol by genetically modified *Klebsiella planticola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2039-2044
- ⇒ Tortosa J.F., Rubio M., Soler A. (1992). El fraccionamiento como estrategia en el beneficio de la biomasa lignocelulósica. *Ing. Quím.* **24** (283), 195-201
- ⇒ Tran A.V., Chambers R.P. (1986). Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by the yeast *Pichia stipitis* CBS 5776. *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 439-444
- ⇒ Trinder P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* **6**, 24-27
- ⇒ U.S. Department of Energy. Advanced Bioethanol Technology
http://www.ott.doe.gov/biofuels/advanced_bioethanol.html; accedido el día 22-8-2002
- ⇒ Van Es A.J.H., Van der Meer J.M. (1980). Methods of analysis for predicting the energy and protein value of feeds for farm animals. *Proc. 31st Annual Meeting EAAP*. Munich, Alemania.

- ⇒ Van Soest P.J. (1963). Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents. *J. Assoc. Off Agric. Chem.* **46**, 829-835
- ⇒ Van Soest P.J. (1964). Symposium on nutrition pastures: New Chemical, procedures for evaluating forages. *J. Anim. Sci.* **23**, 838
- ⇒ Van Soest P.J., Wine R.H. (1967). Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. II. A Rapid Method for the Determination of Fiber and Lignin. *J. Appc. Off Agric. Chem.* **50**, 50-55
- ⇒ van Wyk J.P.H. (1997a). Cellulose hydrolysis and cellulase adsorption after pretreatment of cellulose materials. *Biotechnol. Technique.* **11** (6), 443-445
- ⇒ van Wyk J.P.H. (1997b). Cellulase adsorption-desorption and cellulose saccharification during enzymatic hydrolysis of cellulose materials. *Biotechnol. Lett.* **19** (8), 775-778
- ⇒ Watson N.E., Prior B.A., Lategan P.M. (1984). Oxygen requirements for D-xylose fermentation to ethanol and polyols by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microb. Technol.* **6** (10), 451-456
- ⇒ Wilke C.R., Maiorella B., Sciamannan A., Tangu R., Wiley D., Wong H. (1983). Enzymatic hydrolysis of cellulose. *Noye Data Corporation*, Park Ridge, N. Jersey
- ⇒ Wilson J.J., Deschatelets L., Nishikawa N.K. (1989). Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam-pretreated aspenwood hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 592-596
- ⇒ Wong K.K., Dererell K.F., Mackie K.L., Clark T., Donaldson L.A. (1988). *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 447-451
- ⇒ Woods M.A., Millis N.F. (1985). Effect of slow feeding of xylose on ethanol yield by *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Lett.* **7**, 679-682
- ⇒ Wright J.D. (1987). Economic Feasibility Study of an Enzymatic Hydrolysis-Based Ethanol Plant with Prehydrolysis Pretreatment. A subcontract report. *U.S. Department of Energy*. Contrato n° DE-AC02-83CH10093, Subcontrato n° XX-3-03097-2, Tarrytown, NY

- ⇒ Yu J., Miller S.F. (1980). Utilization of cellulosic feedstock in the production of fuel grade ethanol. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **19** (2), 237-241
- ⇒ Yu S., Wayman M., Parekh S.K. (1987). Fermentation to ethanol of pentose-containing spent sulphite liquor. *Biotechnol. Bioeng.* **29**, 1144-1150