



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

TESIS DOCTORAL



**HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN DE
MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS
CON *Hansenula polymorpha***

**PRESENTADA POR:
MARÍA INMACULADA C. OLIVARES MERINO**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. SEBASTIÁN SÁNCHEZ VILLASCLARAS
DRA. DÑA. MARÍA LOURDES MARTÍNEZ CARTAS
DR. D. ALBERTO J. MOYA LÓPEZ**

JAÉN, DICIEMBRE DE 2018

HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS CON *Hansenula polymorpha*

Esta Memoria constituye la Tesis Doctoral y se presenta a la Comisión evaluadora en Jaén a 11 de Diciembre de 2018.

Fdo. María Inmaculada C. Olivares Merino

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

Como tutor de Dña. Inmaculada C. Olivares Merino en la Tesis de Doctorado “Hidrólisis y fermentación de materiales lignocelulósicos con *Hansenula polymorpha*” durante el período 2011-2018.

INFORMA: Que la presente Tesis de Doctorado ***Hidrólisis y fermentación de materiales lignocelulósicos con Hansenula polymorpha*** ha sido realizada por la Ingeniera Química Dña. Inmaculada C. Olivares Merino en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén, bajo la dirección de los Dres. D. Sebastián Sánchez Villasclaras, Lourdes Martínez Cartas y Alberto J. Moya López.

Jaén, 11 de Diciembre de 2018

Fdo. Sebastián S. Villasclaras

*Catedrático de Universidad,
Área de Ingeniería Química*

Fdo. Lourdes Martínez Cartas

*Profesora Titular de Universidad
Área de Ingeniería Química*

Fdo. Alberto J. Moya López

*Profesor Titular de Universidad
Ingeniería Química*

Silencio

Sí, sólo escucho silencio. Parece como si de pronto la vida parase, una pausa, un kit-kat. Tras duros años de estudio y trabajo, cuando veo finalizada esta Tesis Doctoral, mi mente me pide silencio. Y es así porque han sido años de sacrificio, esfuerzo mental y físico, de noches rodeada de datos y resultados, razonamientos. *Silencio.*

Satisfacción personal y alegría

Sí, siento satisfacción personal y alegría, que emerge desde todo el interior de mi ser. Es como tener un hijo, a pesar de que no sé lo que es ser madre; se plantea su necesidad, llega al mundo, sus primeros pasos, momentos duros y sacrificios para una correcta educación. Todo para conseguir el mejor resultado. Crees que no lo vas a conseguir, hasta que finalmente lo ves; sí, ves que tus objetivos y metas se han cumplido. *Satisfacción personal y alegría.*

Agradecimiento y cariño

Agradecimiento y cariño hacia *D. Sebastián Sánchez Villasclaras*, que no sólo ha sido mi director en estos años de investigación sino un ejemplo a seguir. También mi profundo agradecimiento a mis directores *Dña. Lourdes Martínez Cartas* y *D. Alberto J. Moya López*, quienes, con su dedicación y enseñanzas, han hecho posible la realización de este trabajo de investigación. *Agradecimiento y cariño.*

Amor y agradecimiento

Cuánto amor y agradecimiento siento hacia mis *PADRES, D. Eugenio Olivares Calero y Dña. Inmaculada Merino Jiménez*. Toda mi vida les he visto trabajando duramente, como maestros de la Escuela Nacional Española, educando a sus hijos para una correcta formación, sin excesos innecesarios y todas las necesidades requeridas. Gracias, mil gracias, porque de no haber sido por vosotros, no tendría nada de lo que hoy día disfruto.

Papá, cuántos días me has bajado en coche a la Universidad...y me has esperado a las puertas, para facilitarme la subida a casa, evitando que tuviese que esperar la llegada del transporte público...Mi corazón no lo olvida. *Te amo y te lo agradezco infinitamente.*

Mamá, cuántos días te he tenido que abandonar, te he dejado sola, sin pasear contigo, siempre sacrificándote. Me has comprendido. *Te amo y te lo agradezco infinitamente.*

Estoy también muy agradecida a mis hermanos, *Eugenio Olivares Merino y Julio Ángel Olivares Merino*, quienes me han sabido orientar y aconsejar. Ambos son para mí un modelo a seguir, no sólo a nivel profesional sino personal. *Os quiero y os lo agradezco.*

Agradecimiento

Doy las gracias a todas las personas que han estado pendientes de la realización de este trabajo de investigación.

Enormemente, a todos mis familiares, muy especialmente a mis sobrinos, *Jesús, Alba, Javi, Jaime, Eugenio y Elena*, que son mis grandes estrellas.

A todos mis amigos, porque habéis estado siempre ahí.

Sé que ha sido larga la espera, pero finalmente lo he conseguido.

Gracias por confiar en mí.

Agradecimiento.

María Inmaculada C. Olivares Merino

ÍNDICE

1. RESUMEN Y OBJETIVOS	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	7
2.1 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	9
2.2 PODA DEL OLIVAR	11
2.2.1 Producción	11
2.2.2 Caracterización físico-química	13
2.2.3 Vías de aprovechamiento	14
2.3 PRETRATAMIENTOS DEL MATERIAL DE PODA	17
2.3.1 Procedimientos físicos	17
2.3.2 Pretratamientos físico-químicos.....	18
2.3.3 Procedimientos químicos	19
2.3.4 Pretratamientos biológicos	21
2.4 PROCESO DE HIDRÓLISIS	23
2.4.1 Hidrólisis ácida	23
2.4.2 Hidrólisis enzimática.....	24
2.5 ACONDICIONAMIENTO DE HIDROLIZADOS	27
2.5.1 Ajuste del <i>pH</i> del hidrolizado.....	27
2.5.2 Eliminación de productos tóxicos e inhibidores	27
2.5.2.1 <i>Métodos físicos</i>	28
2.5.3.2 <i>Métodos químicos</i>	30
2.5.3.3 <i>Métodos biológicos</i>	31
2.6 PROCESOS DE FERMENTACIÓN	33
2.6.1 Microorganismos	33
2.6.2 Sustratos utilizados	36
2.6.2.1 <i>D-glucosa</i>	36
2.6.2.2 <i>D-xilosa</i>	37

2.6.2.3	<i>D y L-Arabinosa</i>	37
2.6.3	Vías metabólicas.....	37
2.6.3.1	<i>Ruta metabólica de obtención de etanol a partir de D-glucosa</i>	37
2.6.3.2	<i>Ruta metabólica para obtención de etanol a partir de D-xilosa</i>	40
2.6.3.3	<i>Ruta metabólica de obtención de etanol a partir de D y L-arabinosa</i>	42
2.6.3.4	<i>Ruta metabólica para la obtención de xilitol a partir de D-xilosa</i>	43
2.6.3.5	<i>Ruta metabólica de la obtención de arabitol a partir de D-glucosa</i>	47
2.6.4	Productos obtenidos en el bioproceso.....	48
2.6.4.1	<i>Bioetanol</i>	48
2.6.4.2	<i>Xilitol</i>	49
2.6.4.3	<i>Arabitol</i>	49
2.6.4.4	<i>Producción de otros bioproductos</i>	50
2.7	PROCESOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON LEVADURAS	51
2.8	BIBLIOGRAFÍA	57
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	74
3.1	REACTIVOS QUÍMICOS Y OTROS PRODUCTOS UTILIZADOS	77
3.1.1	Compuestos químicos	77
3.1.2	Otros productos	79
3.2	ORIGEN Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	81
3.2.1	Recogida del material de poda	81

3.2.2	Recepción, acondicionamiento y almacenamiento	81
3.3	MICROORGANISMOS Y ENZIMAS UTILIZADOS	85
3.3.1	Microorganismo utilizado y conservación	85
3.3.1.1	Levadura utilizada	85
3.3.1.2	<i>Composición del medio de cultivo sólido</i>	85
3.3.1.3	<i>Inoculación del microorganismo sobre medio sólido</i>	86
3.3.1.4	<i>Composición del medio de cultivo líquido</i>	86
3.3.1.5	<i>Precultivos en medio líquido</i>	87
3.3.1.6	<i>Inoculación del microorganismo en el reactor</i>	89
3.3.2	Descripción de los enzimas utilizados	91
3.3.2.1	<i>Tipos de enzimas</i>	91
3.3.2.2	<i>Determinación de la actividad enzimática</i>	91
3.4	INSTALACIÓN EXPERIMENTAL DE HIDRÓLISIS	99
3.4.1	Reactor a presión	99
3.5	INSTALACIONES EXPERIMENTALES DE FERMENTACIÓN	103
3.5.1	Agitador orbital	103
3.5.2	Biorreactores tipo tanque agitado	104
3.6	DESARROLLO DE LOS PROCESOS DE HIDRÓLISIS	107
3.6.1	Hidrólisis ácida a presión	107
3.7	DESARROLLO DE LOS BIOPROCESOS	111
3.7.1	Fermentación	111
3.7.2	Hidrólisis y Fermentación Simultánea (SFS)	112
3.8	CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	117
3.8.1	Humedad y materia volátil (<i>HMV</i>)	117
3.8.2	Fibra Neutro Detergente (<i>FND</i>)	117
3.8.3	Fibra Ácido Detergente (<i>FAD</i>)	119

3.8.4	Lignina Ácido Insoluble (<i>LAI</i>)	120
3.8.5	Cenizas (<i>CEN</i>)	121
3.9	DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR	123
3.9.1	Concentración celular	123
3.9.2	Contaje celular	123
3.10	CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATOS	125
3.10.1	Azúcares. Cromatografía líquida iónica de alta resolución HPLIC.....	125
	3.10.1.1 <i>Parámetros del equipo</i>	125
	3.10.1.2 <i>Patrones de calibración</i>	126
3.10.2	Método de Miller para azúcares reductores totales.....	126
3.10.3	Ácido acético.....	128
3.10.4	Compuestos fenólicos totales (CFT)	130
3.10.5	Perfil de compuestos fenólicos	133
3.10.6	Índice de inhibidores	134
3.11	DETERMINACIÓN DE BIOPRODUCTOS	137
3.11.1	Etanol.....	137
3.11.2	Xilitol.....	138
3.11.3	Arabitol.....	140
3.12	BIBLIOGRAFÍA	141
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	143
4.1	HIDRÓLISIS A PRESIÓN	145
4.1.1	Caracterización del material de poda	145
4.1.2	Severidad del tratamiento hidrotérmico	147
4.1.3	Composición de los hidrolizados líquidos.....	149
4.1.4	Caracterización de los residuos sólidos después del proceso hidrolítico.....	154

4.2	FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON <i>Hansenula polymorpha</i>	157
4.2.1	Naturaleza del sustrato	157
4.2.1.1	<i>Formación de biomasa</i>	158
4.2.1.2	<i>Consumo de sustrato</i>	164
4.2.1.3	<i>Formación de bioproductos</i>	172
4.2.2	Efecto del nivel de aeración	184
4.2.2.1	<i>Formación de biomasa</i>	185
4.2.2.2	<i>Consumo de sustrato</i>	188
4.2.2.3	<i>Formación de bioproductos</i>	196
4.2.3	Influencia del <i>pH</i> del medio de cultivo.....	207
4.2.3.1	<i>Formación de biomasa</i>	208
4.2.3.2	<i>Consumo de sustrato</i>	214
4.2.3.3	<i>Formación de bioproductos</i>	225
4.2.4	Efecto de la temperatura	235
4.2.4.1	<i>Formación de biomasa</i>	236
4.2.4.2	<i>Consumo de sustrato</i>	244
4.2.4.3	<i>Formación de bioproductos</i>	254
4.3	SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA	271
4.3.1	Experimento de referencia	273
4.3.1.1	<i>Formación de biomasa</i>	274
4.3.1.2	<i>Consumo de sustrato</i>	276
4.3.1.3	<i>Formación de bioproductos</i>	281
4.3.2	Influencia de la concentración de inóculo y del <i>pH</i> inicial del cultivo.....	289
4.3.2.1	<i>Evaluación del crecimiento celular</i>	290
4.3.2.2	<i>Consumo de sustrato</i>	293
4.3.2.2	<i>Formación de bioproductos</i>	297

4.3.3	Compuestos antioxidantes ó inhibidores	305
4.3.4	Caracterización del residuo sólido tras la sacarificación y fermentación simultánea.....	306
4.4	BIBLIOGRAFÍA.....	309
5	CONCLUSIONES.....	313
6	NOMENCLATURA.....	319
7	ANEXOS.....	333
A.	HIDRÓLISIS A PRESIÓN CON ÁCIDO SULFÚRICO	335
B.	FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON <i>Hansenula polymorpha</i>	365
B.1	Influencia de la naturaleza del sustrato	365
B.2	Efecto del nivel de aeración.....	372
B.3	Influencia del pH ₀ del medio cultivo	379
B.4	Efecto de la temperatura	396
C.	FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADO PRETRATADO A PRESIÓN CON <i>Hansenula polymorpha</i>.....	403
D.	SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON <i>Hansenula polymorpha</i>	407
D.1	Influencia de la concentración del inóculo y del pH inicial.....	407
E.	BIBLIOGRAFÍA.....	448

1

RESUMEN

Y OBJETIVOS

Esta Memoria forma parte de la línea de investigación que el Grupo de Investigación 'Bioprocesos' (TEP-138, Junta de Andalucía) desarrolla sobre 'Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos', y ha sido llevado a cabo en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales, Universidad de Jaén.

La biomasa vegetal es una fuente potencial de gran magnitud, y carácter renovable, para la obtención de energía y productos químicos diversos. En función de los recursos biomásicos existentes en cada región, se debe investigar las diferentes vías para su máximo aprovechamiento. En España, Andalucía y Jaén, el olivar constituye el cultivo arbóreo con mayor superficie de ocupación. Según los datos del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, en la Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos (ESYRCE), en concreto Encuesta de Marco de Áreas de España del año 2017, se puede llegar a una superficie total cultivada de olivar de $2,65 \cdot 10^6$ ha, lo que supone un 15% de la superficie total de cultivo. Considerándose como media que una hectárea de olivar podado produce 3 t biomasa residual / año (Sánchez *et al.*, 2002), se puede estimar que la producción total anual de este subproducto es superior a $7,9 \cdot 10^9$ kg.

Los diferentes procesos utilizados para la obtención de la energía contenida en esta biomasa residual requieren previamente un tratamiento físico. Básicamente, estos procesos consisten en una conversión termoquímica ó bien una conversión bioquímica. En relación a ésta última, hay que destacar el proceso de fermentación mediante la cual la biomasa residual es transformada en bioproductos de alto valor añadido. Previo a la fermentación, el residuo de poda fragmentado debe ser pretratado para la liberación de los azúcares: trituración e hidrólisis ácida. Los hidrolizados obtenidos contienen monómeros (D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, D-galactosa, D-xilosa y D/L-arabinosa) y oligosacáridos.

La levadura tradicional *Saccharomyces cerevisiae* fermenta sólo hexosas, siendo incapaz de fermentar pentosas. Se ha demostrado que D-xilosa puede ser fermentada a etanol y xilitol con levaduras no tradicionales tales como *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *Pichia stipitis*, *Candida tropicalis*, *Hansenula polymorpha* y *Debaryomyces hansenii*. Sin embargo, D y L-arabinosa presenta dificultad en ser fermentada por estas levaduras no tradicionales. Con algunas levaduras, esta pentosa es sólo parcialmente fermentada.

En general, en los hidrolizados lignocelulósicos, y en relación a la concentración de azúcares, D y L-arabinosa es el tercer monómero producido después de D-glucosa y D-xilosa. Por consiguiente, una fracción del hidrolizado quedaría sin fermentar, no existiendo

un aprovechamiento completo de este material lignocelulósico que en nuestro caso se trata de un subproducto de la industria oleícola (poda de olivar sin hoja).

El desarrollo de esta Tesis Doctoral tiene como objeto el aprovechamiento completo de la fracción hemicelulósica de un material lignocelulósico con un porcentaje elevado en hemicelulosas, como es el material de poda de olivo sin hoja, en concreto de árboles de la variedad 'Picual'. El objetivo principal se centra en la fermentación de las pentosas, fundamentalmente D y L-arabinosa, utilizando la levadura no tradicional termotolerante *H. polymorpha*, con el fin de transformar estos monómeros en bioproductos de alto valor añadido (xilitol, arabitol y etanol), considerando fundamentalmente los rendimientos globales y las velocidades específicas de formación de los bioproductos obtenidos. Cabe señalar que la fermentación de hexosas en medio sintético usando *H. polymorpha* fue abordado en trabajos previos del Grupo de Investigación 'Bioprocesos' (Moya, 1997).

Inicialmente, el material de poda de olivo triturado y tamizado (tamaño de partícula, 0,300 a 0,425 mm), fue sometido a un pretratamiento mediante una hidrólisis ácida a presión en un reactor discontinuo heterogéneo, tipo tanque agitado. En esta etapa se operó a una temperatura máxima de 200°C, una agitación de 250 rpm, una relación sólido / líquido de 1/6 y una concentración de ácido sulfúrico de 0,05 M, condiciones determinadas en estudios previos, Cuevas (2007). Una vez alcanzada la máxima temperatura programada se realizó un enfriamiento y descompresión rápida, tratando de reproducir un proceso 'Steam-explosion'. En estas condiciones el factor de severidad ($\log R_0$) fue $3,52 \pm 0,13$, generándose concentraciones de D-glucosa, D-xilosa y D/L-arabinosa próximas a 14,3, 8,4 y 2,6 g dm⁻³, respectivamente; estas concentraciones se corresponden con un rendimiento de hidrólisis elevado de 29 kg de azúcares reductores totales por cada 100 kg de poda de olivar seca. En lo que se refiere al rendimiento en D-xilosa (Y_{XIL}) y D y L-arabinosa (Y_{ARA}), se alcanzaron unos valores en torno a 5,8 y 1,8%, respectivamente.

En la revisión bibliográfica previa, realizada al inicio de esta Tesis Doctoral, no se ha encontrado referencias de trabajos centrados en la fermentación de D o L-arabinosa con *H. polymorpha*. No obstante, se han detectado concentraciones significativas de pentosas en los hidrolizados líquidos procedentes del tratamiento hidrotérmico. Es por ello que, con el fin de determinar las condiciones de operación más adecuadas en los biorreactores, se realizó un estudio previo de los procesos de fermentación con *H. polymorpha* usando como sustrato las pentosas encontradas en mayor concentración en los hidrolizados de biomásas lignocelulósicas (D-xilosa, D y L-arabinosa pura ó sintética). En esta investigación se utilizaron matraces Erlenmeyer de 50 cm³ con tapón de rosca (en la boca de cada matraz se

ha colocado un tapón de algodón hidrófilo). Estos matraces se ubicaron en una cámara refrigerada, acoplada a un agitador orbital.

En cada experimento, se estableció la concentración inicial de monosacáridos en 25 g dm⁻³ en medio líquido (Lindegren *et al.*, 1958) y 100 rpm de velocidad de agitación. Las variables que se modificaron en este estudio son la temperatura de operación (35 – 50°C), pH de trabajo (3,5 – 5,5), nivel de aeración (microaeróbico y anaeróbico) y naturaleza del sustrato (D-arabinosa, L-arabinosa, D-xilosa).

Durante la fermentación se obtuvieron las concentraciones en biomasa producida (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético residual (Ac), así como etanol (E), xilitol (X) y arabitol (Ar). Estos resultados primarios permiten llevar a cabo un estudio de la formación de biomasa, consumo de sustrato y formación de bioproductos a través de los parámetros cinéticos: velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m), productividad en biomasa (P_b), velocidad específica de consumo de sustrato (q_{ART}^D), rendimiento global en biomasa ($Y_{X/ART}^G$), velocidad específica de formación de productos (q_{Ar}^D y q_X^D) y rendimientos globales en bioproductos en cada proceso de fermentación ($Y_{Ar/ART}^G$ y $Y_{X/ART}^G$).

En fermentación de D-xilosa, D y L-arabinosa con *H. polymorpha*, se ha observado que el período de crecimiento exponencial es de escasa duración. En general, las velocidades específicas máximas de crecimiento son inferiores en D y L-arabinosa frente a las obtenidas con D-xilosa. El valor máximo de μ_m , utilizando D-xilosa como sustrato, 0,18 h⁻¹, se alcanzó en condiciones microaeróbicas, 50°C y pH₀ = 4,5; manteniendo estas condiciones de operación, se alcanzó un valor de μ_m , inferior, 0,15 y 0,08 h⁻¹, cuando el monosacárido utilizado fue D y L-arabinosa, respectivamente. Sin embargo, en relación a la fase de desaceleración del crecimiento se observa un amplio intervalo donde la biomasa presenta un incremento lineal con el tiempo. En este período, la productividad en biomasa no presenta una tendencia definida con respecto a la naturaleza del sustrato. Estos hechos ponen de manifiesto que *H. polymorpha* metaboliza de forma adecuada D y L-arabinosa aunque con más dificultad que D-xilosa, al menos en las condiciones de operación ensayadas. Utilizando D-arabinosa, los mayores rendimientos en arabitol, 0,14 g g⁻¹ se obtuvieron en condiciones de microaeración, 35°C y pH₀ = 4,5; modificado el sustrato a L-arabinosa, el mayor rendimiento en arabitol, 0,11 g g⁻¹, se alcanzó en condiciones microaeróbicas, 40°C y pH₀ = 3,5. En la producción de xilitol el rendimiento fue 0,17 g g⁻¹ (condiciones anaeróbicas, 30°C y pH₀ = 4,5) usando D-xilosa como sustrato. En todos los

experimentos realizados, los rendimientos en etanol fueron muy bajos, inferiores a $0,02 \text{ g g}^{-1}$.

Durante la sacarificación y fermentación simultánea se utilizaron los enzimas celulasa [EC 3.2.1.4] y β -glucosidasa [EC 3.2.1.21]. Estos enzimas se usaron a una concentración y actividad de 20 UPF celulasa / g sólido seco y 10 UI β -glucosidasa / g sólido seco, siendo este sólido el material lignocelulósico seco procedente de la hidrólisis ácida a presión. El proceso de SFS fue realizado a 45°C y a tres pH de operación: 3,5, 4,5 y 5,5. Este proceso de sacarificación y fermentación simultánea fue comparado con un experimento control en el que el hidrolizado líquido obtenido en el reactor a presión fue directamente fermentado con *H. polymorpha*.

En general, durante los procesos de SFS con *H. polymorpha* se alcanzaron unos rendimientos máximos en xilitol superiores a los obtenidos en arabitol y etanol. A 45°C , un $\text{pH}_0 = 5,5$ y utilizando una concentración inicial del inóculo de $0,13 \text{ g dm}^{-3}$, se obtuvieron los valores más altos de rendimientos en arabitol y etanol ($Y_{\text{At/S}} = 0,69\%$ y $Y_{\text{E/S}} = 17,52\%$). En lo que se refiere al rendimiento en xilitol ($Y_{\text{Xl/S}} = 11,13\%$), fue máximo con $0,15 \text{ g dm}^{-3}$ de inóculo inicial, 45°C y $\text{pH}_0 = 4,5$.

Durante la fermentación del hidrolizado líquido con *H. polymorpha* (experimento de control) se obtuvo un rendimiento global en arabitol ($Y_{\text{At/ARA}}^{\text{G}}$) de $0,12 \text{ g}$ por g de D ó L-arabinosa, en condiciones de microaeración, 45°C y $\text{pH}_0 = 4,5$; este valor es inferior al obtenido por el proceso SFS, considerando que $Y_{\text{At/S}} = Y_{\text{ARA}} Y_{\text{At/ARA}}^{\text{G}}$. Finalmente, cabe destacar que en estas condiciones de operación, apenas hubo producción de etanol, detectándose un rendimiento instantáneo de $0,02 \text{ g g}^{-1}$, basado en azúcares totales.

2

ANTECEDENTES

BIBLIOGRÁFICOS

2.1 RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Dentro de las energías renovables la biomasa es considerada como aquella materia orgánica de origen vegetal ó animal, incluyendo los residuos y desechos orgánicos, susceptible de ser aprovechada energéticamente. Las plantas transforman la energía radiante del Sol en energía química a través de la fotosíntesis, y parte de esta energía queda almacenada en forma de materia orgánica. En definitiva, puede considerarse como el conjunto de materiales orgánicos generados por fotosíntesis ó que han sido producidos en la cadena biológica (Fernández, 1980).

Atendiendo al origen de la biomasa es posible clasificarla en primaria, secundaria y terciaria. La biomasa primaria se produce por conversión directa de la energía solar en energía química sin influencia del hombre. La secundaria incluye los residuos de origen agrícola, forestal y animal, mientras que los residuos urbanos e industriales constituyen la terciaria. Ambas constituyen la llamada biomasa residual. También se ha de destacar la biomasa fósil, de carácter no renovable (carbón y petróleo).

Dentro del material lignocelulósico, considerado como biomasa residual vegetal, la lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas. La creciente expansión de la actividad agroindustrial genera una elevada producción de residuos lignocelulósicos en todo el mundo (p. ej. 3,2 – 3,8 10⁸ toneladas al año de residuo de caña de azúcar; 1,6 – 1,9 10⁸ toneladas al año de residuo de la paja de maíz, etc.), Sánchez (2009). Actualmente, el material lignocelulósico constituye una de las fuentes de carbono renovable más prometedor para solucionar los problemas de energía y materias primas.

La poda del olivar está siendo objeto de estudio en numerosas investigaciones con el fin de encontrar aplicaciones tecnológicas económicamente viables ya que se trata de un material lignocelulósico con perspectivas prometedoras.

2.2 PODA DEL OLIVAR

Toda plantación de olivar requiere la realización de una poda para el acondicionamiento de los árboles y el aumento de su productividad. La poda se realiza tras la recolección con el fin de contribuir a la aireación e iluminación de sus copas. Es una operación necesaria si se quiere mantener el equilibrio entre las funciones vegetativas y reproductivas del olivo, incidiendo así en una mejora de la calidad de los frutos (Pastor y Humanes, 1989). Dentro del material de poda del olivar se distingue la leña, que corresponde con ramas de diámetros superiores a 8 – 10 cm (Sánchez *et al.*, 2002b), y el ramón que son los de menor diámetro.

2.2.1 Producción

Según los datos del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, en la Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos (ESYRCE 2017), la superficie total cultivada de olivar es de 2.650.801 ha, lo que supone un 15% de la superficie total de cultivo. Del total de esta superficie destinada al olivar, el 94,2% (2.495.823 ha) son aceituna de almazara, el 2,9% (75.668 ha) son de mesa y el 3,0% (79.310 ha) son de olivar de doble aptitud, Fig. 2.1.

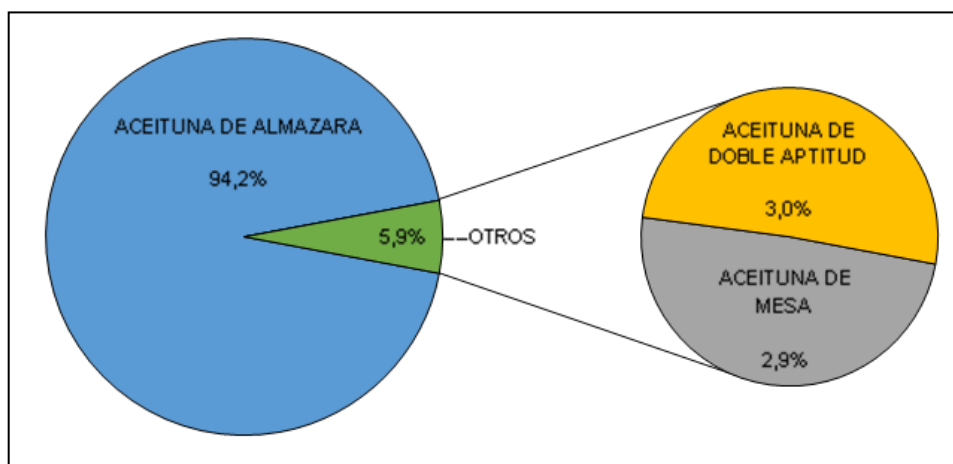


Figura 2.1 Superficie total del olivar en España. Año 2017 (Fuente ESYRCE 2017).

En los últimos años, se ha producido un aumento considerable de superficie de olivar debido al incremento del cultivo en regadío, existiendo una tendencia al uso generalizado de sistemas muy eficientes de aplicación de agua. Aunque la superficie de secano disminuye

respecto al total de olivar, continúa representando aproximadamente el 70,3% de la superficie total de olivar.

La distribución de olivar por comunidades autónomas se concentra sobre todo en el este, sur y suroeste peninsular; en efecto, destaca en importancia Andalucía, donde se concentra el 60,4% de la superficie nacional, seguida de Castilla la Mancha (15,8%) y Extremadura (10,5%). El resto de comunidades autónomas suman el 13,3% de la superficie nacional de olivar, Tabla 2.1.

Tabla 2.1
Distribución de superficie de olivar por comunidades autónomas (Fuente ESYRCE 2017)

Comunidad autónoma	Olivar de mesa, ha	Olivar de doble aptitud, ha	Olivar de almazara, ha	Total de superficie, ha
Galicia	–	–	20	20
Principado de Asturias	–	–	–	–
Cantabria	–	–	–	–
Pais Vasco	18	–	304	322
Navarra	–	78	8.368	8.446
La Rioja	19	32	3.205	3.256
Aragón	6	1.595	57.946	59.547
Cataluña	20	1.156	112.196	113.372
Islas Baleares	22	86	8.416	8.524
Castilla y León	–	130	6.151	6.281
Madrid	–	–	28.761	28.761
Castilla la Mancha	–	–	419.792	419.792
Comunidad Valenciana	37	28	94.303	94.368
Región de Murcia	10	46	28.573	28.629
Extremadura	19.864	786	257.430	278.080
Andalucía	55.634	75.318	1.470.344	1.601.296
Islas Canarias	37	56	14	107
TOTAL	75.667	79.311	2.495.823	2.650.801

Con respecto a la superficie de cultivo total, en Andalucía el olivar representa el 44,0% de las tierras de cultivo, constituyendo el 44% en Jaén. En lo que se refiere a Córdoba, Málaga y Granada más del 15% de su superficie es olivar, siendo en Sevilla próxima al 15% (ESYRCE 2017).

Considerándose como media que una hectárea de olivar podado produce 3 toneladas de biomasa residual cada año (Sánchez *et al.*, 2002b), aproximadamente la quinta parte de biomasa global es generada en la provincia de Jaén. Además, según Sánchez *et al.* (2002b) por cada 3 toneladas de material de poda le corresponden fracciones de un 50% para astillas y un 50% para hoja.

2.2.2 Caracterización físico-química

El material lignocelulósico está constituido principalmente por tres tipos de polímeros asociados unos con otros (Fengel y Wegener, 1984):

- Celulosa: esta fracción constituye del orden del 35 al 50% (*p/p*) de la biomasa (Ogier *et al.*, 1999). Se trata de un polímero de gran peso molecular formado por unidades de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4-glucosídico (Fengel y Wegener, 1984). En la planta, la celulosa posee una doble estructura: cristalina y amorfa.

- Hemicelulosa: constituye del 20 al 30% (*p/p*) del total de la biomasa (Ogier *et al.*, 1999). Se trata también de un polisacárido muy ramificado, de menor peso molecular que la celulosa, y constituido por diferentes polímeros como pentosas (D-xilosa y D ó L-arabinosa) y hexosas (D-manosa, D-glucosa y D-galactosa), y ácidos urónicos.

- Lignina: esta fracción representa en torno al 15 y 25% (*p/p*) de la biomasa lignocelulósica (Ogier *et al.*, 1999). Es un heteropolímero aromático tridimensional amorfo, con estructura irregular, constituida por la unión al azar del radical fenilpropano con unidades poliméricas de los alcoholes *p*-cumaril, coniferil y sinapil.

Además, el material lignocelulósico está constituido por unos componentes no estructurales que no influyen en la estructura morfológica de las células pero sí en el procesado de la biomasa lignocelulósica: agua, cenizas, proteínas, extraíbles y sustancias pécticas (Caparrós, 2007).

En este estudio de investigación, para determinar la composición de los materiales lignocelulósicos en estas fracciones, se analizó su contenido en fibras atendiendo a las normas TAPPI ('Technical Association of the Pulp and Paper Industry') y los métodos estandarizados propuestos por Van Soest y Wine (1967). Esta composición puede variar según el tipo de residuo lignocelulósico, Tabla 2.2.

Tabla 2.2
Composición de algunos residuos lignocelulósicos (McGinnis *et al.*, 1983)

Fuente	Celulosa, %	Hemicelulosa, %	Lignina, %
Maderas blandas	45 – 50	25 – 35	25 – 35
Maderas duras	40 – 55	24 – 40	18 – 25
Forrajeras, paja, cereales, caña de azúcar	25 – 40	25 – 50	10 – 30

El material de poda de olivo presenta elevados valores de solubilidad en agua caliente (17%), agua fría (14%), hidróxido cálcico al 1% (35%), así como sustancias extraíbles en etanol-benceno (12%), valor superior al referido a madera de coníferas y frondosas (Jiménez *et al.*, 1990).

Durante una investigación sobre el aprovechamiento del material de poda del olivar (Sánchez *et al.*, 2002b), se separó el ramón de la hoja, caracterizándose posteriormente el material lignocelulósico de forma separada y sin separar, Tabla 2.3 y 2.4.

Tabla 2.3
Composición del residuo de poda

Parámetro	Madera	Hojas	Total
Humedad, %	10,7	8,5	10,2
Cenizas, %	1,5	5,0	3,3
Lignina, %	14,7	23,1	20,8
Celulosa, %	32,8	5,3	36,6
Hemicelulosa, %	26,9	16,3	19,7

Tabla 2.4
Análisis elemental del residuo de poda del olivo

Parámetro	Madera	Hojas	Total
Carbono, %	45,5	48,7	44,6
Hidrógeno, %	6,4	7,1	6,7
Nitrógeno, %	0,3	1,4	0,8
Azufre, %	0,0	0,0	0,0

2.2.3 Vías de aprovechamiento

Los procesos de aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos forman parte de tecnologías basadas en el aprovechamiento integral de la biomasa lignocelulósica ya que se persigue un aprovechamiento global sin separación de sus componentes.

Fundamentalmente, existen dos vías: conversión térmica y conversión bioquímica (Rodríguez *et al.*, 2010). Los procesos de conversión termoquímica más habituales son la combustión, la pirolisis, y la gasificación, siendo esta última la que aporta más ventajas (Sánchez *et al.*, 2002b). Por otra parte, la segunda vía está basada en el fraccionamiento de los componentes del residuo. Dentro de ésta se incluye la deslignificación (la lignina se solubiliza en mayor o menor grado junto con la hemicelulosa y algo de la celulosa), la hidrólisis de polisacáridos (solubilización de monosacáridos tras la degradación de la celulosa ó hemicelulosa por acción de ácidos o enzimas, dejando la lignina en estado sólido) y finalmente los procesos mixtos (tratamiento secuencial con agentes químicos para conseguir un mejor fraccionamiento). En este último caso se distinguen:

- Hidrólisis en dos etapas, donde en la primera se solubilizan las hemicelulosas, y en la segunda las celulosas.

- Prehidrólisis e hidrólisis enzimática, donde primero se hidroliza con ácidos diluidos ó autohidrólisis para solubilizar las hemicelulosas, y en una segunda etapa se realiza la sacarificación enzimática de la celulosa.

- Métodos donde existe una primera etapa para solubilizar las hemicelulosas, seguida de una segunda etapa donde, mediante un agente oxidante, se solubiliza la lignina dejando la celulosa en la fracción sólida.

En un estudio de poda de olivar (García *et al.*, 2010a), donde se sometió al material lignocelulósico a un proceso de autohidrólisis (200°C), seguido de una fermentación con *Candida tropicalis* a 30°C y *pH* entre 5,0 – 6,5, se obtuvo como bioproducto no sólo etanol sino también xilitol, con lo que se podría mejorar la viabilidad económica del proceso.

2.3 PRETRATAMIENTOS DEL MATERIAL DE PODA

Debido a la compleja estructura del material lignocelulósico, la digestibilidad de la biomasa es muy baja. El mayor problema radica en la dificultad que existe para romper los enlaces β -1,4-glucosídicos con el fin de liberar las moléculas de D-glucosa y celobiosa (cristalinidad de la celulosa), no siendo posible el acceso del agente catalítico (Moiser *et al.*, 2005; Guarnizo *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2009). Por consiguiente, es necesario un tratamiento previo para modificar las propiedades físicas y físico-químicas del material lignocelulósico (p. ej. el grado de polimerización). Esto se consigue mediante temperaturas elevadas y tiempos de reacción cortos, intentando evitar así la aparición de inhibidores por degradación de azúcares (Saddler *et al.*, 1993).

En la hidrólisis de la celulosa existen tres factores condicionantes del proceso: cristalinidad del homopolímero, porosidad del residuo y su contenido en hemicelulosa y lignina (McMillan, 1994; Sun y Cheng, 2002). La eliminación de estas dos últimas fracciones, así como el aumento de la superficie específica de la celulosa y el descenso en su cristalinidad, incrementarían apreciablemente el rendimiento de la transformación de celulosa a D-glucosa. Todo tratamiento cuyo objetivo sea la producción de etanol, biomasa y proteínas deberá ir encaminado a romper estas dos barreras (Camacho *et al.*, 1985c).

Los pretratamientos pueden ser clasificados en físicos, físico-químicos, químicos y biológicos.

2.3.1 Procedimientos físicos

Mediante estos tratamientos, se pretende principalmente reducir el tamaño del residuo y la cristalinidad de la celulosa. Los procedimientos físicos se pueden dividir en mecánicos y no mecánicos (Camacho *et al.*, 1985c). En los mecánicos (molinos de bolas y rodillos, compresión y atricción), se utilizan las fuerzas de impacto y cizalladura, obteniéndose materiales de baja cristalinidad, mayor superficie específica y densidad aparente más alta. En estos materiales resultantes se facilita la posterior hidrólisis, disminuyéndose el volumen del reactor y abaratándose los costes de transporte. En los procedimientos no mecánicos, el material lignocelulósico se somete a agentes externos que provocan la descomposición y solubilización de una fracción de la lignina. Entre estos últimos se incluyen los tratamientos mediante radiaciones (Kamakura y Kaetsu, 1982). Una nueva alternativa es la suave torrefacción (Chiaramonti *et al.* 2011), donde el aumento de la molturación y el incremento de la superficie implica una disminución de la energía necesaria.

2.3.2 Pretratamientos físico-químicos

➤ Autohidrólisis

Es una hidrólisis de la fracción hemicelulósica (en medio acuoso a temperaturas dentro del rango de 150 – 230°C y elevadas presiones), despolimerizándose en oligosacáridos y monosacáridos, así como productos de degradación como furfural, ácido acético y 5-hidroximetilfurfural (Garrote *et al.*, 1999). Al mismo tiempo, se produce una solubilización significativa de la lignina sin modificaciones importantes de ésta. Por tanto, la fase sólida está constituida por la hemicelulosa que no se convierte, lignina y celulosa.

➤ Pretratamiento por explosión con vapor 'Steam-explosion'

En este proceso, al material lignocelulósico se le introduce vapor saturado a eleva presión (1 – 2,3 MPa) y una temperatura en torno a 180 – 220°C, durante 2 a 10 min, aproximadamente. A continuación, se provoca una descompresión por reducción repentina de presión, provocando la ruptura de la estructura del material, y un aumento de la accesibilidad posterior de los enzimas. Con el fin de aumentar la recuperación de celulosa y azúcares de la hemicelulosa, se puede añadir dióxido de azufre como catalizador en una proporción óptima del 1,0% en peso (Eklund *et al.*, 1995). El uso de ácido sulfúrico como catalizador conduce también a una solubilización y una hidrólisis total de la hemicelulosa en sus monómeros constituyentes sin la degradación en furfural (Ogier *et al.*, 1999). No obstante, en este proceso se produce la conversión de una porción de la fracción de xilanos a compuestos volátiles, la no total alteración de parte de la matriz lignina-carbohidrato y, dependiendo de las condiciones de operación, la generación de inhibidores.

➤ Pretratamiento Ammonia Fiber Explosion (AFEX)

En este proceso el material lignocelulósico se expone a amoniaco líquido a temperaturas en torno a 50 – 80°C y presión moderada (1500 kPa) durante un cierto período de tiempo, siendo los valores operacionales óptimos 1 – 2% (kg de amonio líquido por kg de biomasa seca) y 90°C de temperatura durante 30 min (Hsu, 1996). Posteriormente, la presión se reduce para evaporar el amoniaco y explosionar el sustrato. De este modo, se puede modificar y reducir eficazmente la fracción lignocelulósica, mientras que la hemicelulósica y celulósica se mantienen intactas. Además, no se forman algunos tipos de inhibidores como es el caso de los furanos (Dale *et al.*, 1984; Mes-Hartree *et al.*, 1988; Weil *et al.*, 1994).

➤ Pretratamiento con dióxido de carbono

Las moléculas de dióxido de carbono, debido a su tamaño, pueden penetrar fácilmente en los poros de la estructura del material lignocelulósico. La explosión liberada por la presión del dióxido de carbono rompe la estructura de la celulosa, aumentando el área superficial del sustrato para la hidrólisis enzimática (Zheng *et al.*, 1995). La hidrólisis de la celulosa fue investigada aplicando dióxido de carbono supercrítico e hidrólisis enzimática simultáneamente durante 90 min a 50°C y 16 MPa, obteniéndose una conversión próxima al 100% (Park *et al.*, 2001). No obstante, este proceso genera elevados costes, a pesar de ser más efectivo económicamente que el pretratamiento AFEX y no provocar la formación de componentes inhibidores como el pretratamiento 'Steam-explosion' (Zheng *et al.*, 1995).

2.3.3 Procedimientos químicos

➤ Hidrólisis ácida

El objetivo de este pretratamiento es el aumento de la superficie celulósica accesible a los enzimas mediante la extracción de la fracción hemicelulósica. Para ello, las condiciones de operación en las que se desarrolla la hidrólisis ácida son en presencia de un ácido concentrado ó diluido. Los ácidos concentrados son tóxicos y corrosivos, por lo tanto, requieren reactores que sean resistentes, lo que encarece el pretratamiento. Además, el ácido concentrado debe recuperarse después de la hidrólisis para que el proceso sea económicamente viable (Sun y Cheng, 2002).

Generalmente se usan dos tipos de procesos de tratamiento previo con ácido diluido: discontinuos a baja temperatura ($T < 160^{\circ}\text{C}$), con altas cargas de sólidos, del 10 al 40% (Esteghlalian *et al.*, 1997) o bien un flujo continuo a alta temperatura ($T > 160^{\circ}\text{C}$) en cargas con bajo contenido de sólidos, del 5 al 10% (Converse *et al.*, 1989). Ciertos autores (Cruz *et al.*, 2002), apreciaron que tiempos de hidrólisis ácida superiores a 1 hora provocan degradación y por tanto una disminución en la concentración de D-xilosa.

En la hidrólisis ácida con ácido sulfúrico se alcanzan rendimientos superiores a los obtenidos cuando se utiliza ácido nítrico, fosfórico, fórmico ó hipoclorhídrico, siendo por tanto el más utilizado para este pretratamiento (Bustos *et al.*, 2003; Rodríguez-Chong *et al.*, 2004; García *et al.*, 2010b). A este aspecto se le suma el menor coste del ácido sulfúrico con respecto a los demás ácidos, con lo que aumentaría la rentabilidad general del proceso.

La hemicelulosa extraída se D-xilosa, D-glucosa, D-manosa y D-galactosa así como ácido acético. Bajo elevadas condiciones de temperatura y presión, estos azúcares se transforman en compuestos no favorables para las etapas posteriores. En efecto, según Palmqvist y Hahn-Hägerdal (2000a), D-glucosa y D-xilosa se convierten a 5-hidroximetilfurfural y furfural, respectivamente, obteniéndose ácido fórmico tras la degradación de ambos compuestos; como consecuencia también de la degradación del 5-hidroximetilfurfural se produce ácido levulínico. Finalmente se generan componentes fenólicos debido a la ruptura parcial de la lignina.

➤ Hidrólisis alcalina

En este caso se solubiliza la lignina y parte de la hemicelulosa mediante soluciones de hidróxido sódico (hidróxido de calcio ó amoníaco) al 8,0 – 12,0% (*p/p*), a temperaturas entre 80 y 120°C durante 30 – 60 min (Pourquié y Vandecasteele, 1993). La digestibilidad de la madera dura tratada con hidróxido sódico aumenta desde el 14% al 55% con una disminución en lignina desde el 24 – 55% hasta el 20% (Millet *et al.*, 1976).

➤ Ozonolisis

Consiste en tratar el material con ozono con el fin de disminuir el contenido de lignina por oxidación. Hay que destacar que el ozono se descompone después de su generación y que las reacciones de ozonización se llevan a cabo a presión y temperatura ambiente. No obstante, posee un elevado coste económico y no se considera viable.

➤ Organosolvolisis

En este proceso se pretende obtener celulosa apta para post-tratamiento biológico, sin limitación de inhibidores. Para ello se utiliza una mezcla de un disolvente orgánico (metanol, etanol, acetona, etilenglicol ó trietilenglicol) con un ácido inorgánico como clorhídrico ó sulfúrico (Thring *et al.*, 1990), a una temperatura de operación elevada (160 – 200°C). Debido al coste de los disolventes, el etanol y el metanol son los más utilizados, teniendo en cuenta que el primero es un inhibidor del proceso hidrolítico. Al final del proceso se rompe la estructura interna de la lignina y la hemicelulosa, quedando un residuo constituido fundamentalmente por celulosa (Xu *et al.*, 2006). El disolvente orgánico es extraído por

evaporación y después reciclado. La lignina precipitada es recuperada por simple centrifugación o filtración.

2.3.4 Pretratamientos biológicos

Están basados en el uso de microorganismos, generalmente hongos, capaces de degradar la lignina y la hemicelulosa. La celulosa resulta ser el componente más resistente para ser atacado biológicamente. A pesar de sus bajos costes energéticos, estos tratamientos se caracterizan por su lentitud ó larga duración (Sun y Cheng, 2002; Kumar *et al.*, 2009).

2.4 PROCESOS DE HIDRÓLISIS

El objetivo de estos procesos es conseguir una elevada despolimerización tanto de la celulosa como de la hemicelulosa que forman parte del material lignocelulósico, con el fin de obtener la máxima cantidad de monómeros. La lignina no suele ser atacada, lo que es beneficioso desde el planteamiento realizado en el presente trabajo ya que su degradación conlleva la formación de compuestos fenólicos que inhiben etapas posteriores de fermentación.

2.4.1 Hidrólisis ácida

La celulosa posee una estructura cristalina, siendo muy dificultoso el ataque ácido (Weil *et al.*, 1994). En investigaciones anteriores (Sánchez, 1990), temperaturas elevadas (180 – 240°C) y bajas concentraciones del ácido (1 – 5%), ó temperaturas inferiores a 100°C y altas concentraciones del ácido (>20%), se establecieron como condiciones de operación para hidrolizar total ó parcialmente las fracciones de celulosa del residuo de poda de olivo. Durante la hidrólisis con ácido concentrado se obtienen rendimientos en azúcares superiores si se comparan con los alcanzados utilizando un ácido diluido; no obstante, la degradación de azúcares es importante, sobre todo de la hemicelulosa, y por tanto, la generación de inhibidores. De hecho, resulta ser una técnica muy corrosiva, exigiendo la posterior recuperación del ácido.

Para evitar la aparición de inhibidores se puede proponer por un lado, hidrolizar el material lignocelulósico en varias etapas, lo que implicaría la separación secuencial de la hemicelulosa y de la celulosa; por otro lado, se puede aumentar la temperatura disminuyendo la concentración del ácido, siendo este último caso, desde el punto de vista práctico, un verdadero tratamiento hidrotérmico y, por tanto, generando efectos equivalentes a actuar sobre los polímeros del material lignocelulósico (Eken-Saraçoglu *et al.*, 1998).

La hidrólisis ácida realizada en condiciones moderadas (100 – 150°C y una concentración ácida del 1 – 8%) permite la solubilización selectiva de la hemicelulosa. La celulosa no se verá atacada, al igual que la lignina, permaneciendo en la fase sólida. Si las condiciones son aún más moderadas, lo que se denomina prehidrólisis, se pretende obtener como monosacárido preferentemente D-xilosa, evitando su degradación y aparición de inhibidores (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000b), Fig. 2.2.

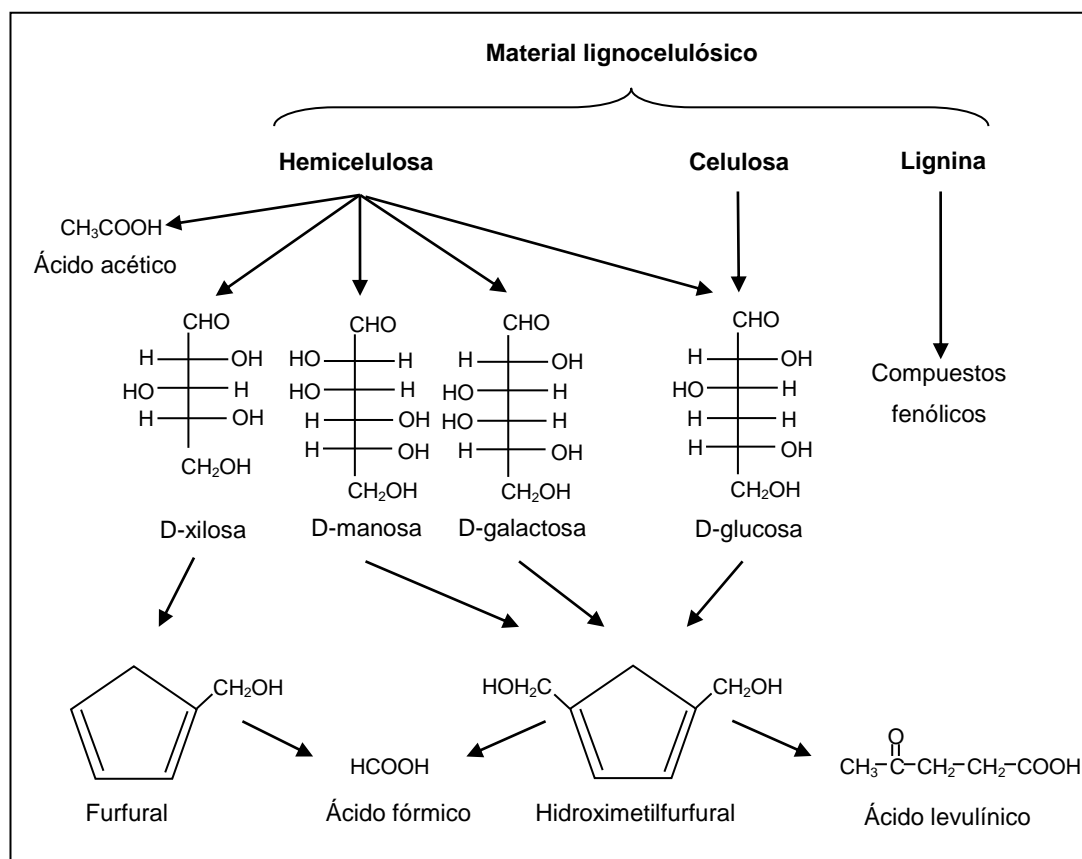


Figura 2.2 Reacciones ocurridas durante la hidrólisis del material lignocelulósico. Los derivados de furano y los compuestos fenólicos reaccionarán adicionalmente para formar algunos materiales poliméricos (Diagrama basado en el realizado por Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000b).

2.4.2 Hidrólisis enzimática

Algunos microorganismos, fundamentalmente hongos y bacterias (aerobios ó anaerobios, mesófilicos ó termófilicos) pueden producir ciertos enzimas (celulasas) que, durante el proceso de hidrólisis enzimática, actúan sobre los enlaces β -1,4 que constituyen la celulosa, liberando moléculas de D-glucosa que constituyen una fuente de carbono y energía durante el posterior proceso de fermentación. No obstante, a pesar de ser enzimas de alta actividad, los volúmenes de producción de éstos por parte de las bacterias no son muy elevados, es por ello, que se investigan enzimas metabolizados a partir de organismos fúngicos, en concreto, *Trichoderma reesei* y *Trichoderma viride* (Galbe y Zachi, 2002).

La hidrólisis enzimática de la celulosa, debido a la estructura tan compleja de la biomasa lignocelulósica, es el resultado de la acción sinérgica de un complejo enzimático (Camacho *et al.*, 1985a; Lynd *et al.*, 2002) formado principalmente por:

- Endoglucanasas (EG, C_x ó EC 3.2.1.4): capaces de atacar regiones internas de baja cristalinidad con lo que surgirían nuevos extremos de cadenas.

- Exoglucanasas: especializadas en degradar las cadenas de celulosa atacando sus extremos libres. Dentro de éstas están las celobiohidrolasas (CBH, C₁ ó EC 3.2.1.91), que son productoras de celobiosa; y por otro lado están las exo- β -glucanasas (EXG ó EC 3.2.1.74), productoras de D-glucosa.

- Celobiasas ó β -glucosidasas (BGL ó EC 3.2.1.21): degradan la celobiosa hacia D-glucosa.

Si además se quiere hidrolizar la hemicelulosa, se deben adicionar xilanasas.

Las endoglucanasas y celobiohidrolasas son inhibidas por la celobiosa, mientras que la β -glucosidasas lo es por D-glucosa (Camacho *et al.*, 1985b; Ogier *et al.*, 1999; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a). Estrictamente la β -glucosidasa no es una celulasa ya que sólo rompe los dímeros de D-glucosa (celobiosa) que se encuentran en disolución sin atacar al sólido; no obstante, es fundamental ya que retira la celobiosa de la disolución, minimizando el efecto inhibitorio que ésta tiene sobre la mayoría de las celulasas.

Para eliminar este tipo de inhibición y conseguir un mayor aprovechamiento del enzima, se proponen diferentes métodos:

- Debido al coste de los enzimas: vías de inmovilización de las celulasas, recuperación de los enzimas ó modificación de las características superficiales del sustrato mediante la adición de sustancias externas.

- Incrementar el contenido en β -glucosidasas para aliviar la inhibición de la celobiosa sobre la actuación de las endo y exoglucanasas.

- Eliminar los azúcares durante la hidrólisis ya sea por ultrafiltración ó bien por sacarificación y fermentación simultánea (SFS). En definitiva, mediante el proceso de SFS se eliminan los compuestos (glucosa y celobiosa), que provocan inhibición en el complejo enzimático. Todo esto conlleva un aumento en la conversión de los productos finales de la fermentación, así como una reducción de concentración del enzima necesario (Ballesteros *et al.*, 1991; Ballesteros *et al.*, 2004). No obstante, el problema de este tipo de proceso reside en las condiciones óptimas de operación; en efecto, mientras que la hidrólisis se lleva

a cabo a la temperatura óptima de actuación de las celulasas (45 – 50°C), la fermentación se realiza a la de las levaduras (30 – 35°C). Por tanto, para el proceso de SFS se suele emplear levaduras termotolerantes, que son capaces de trabajar a temperaturas superiores a 35°C, debiéndose optimizar las condiciones de temperatura de operación (en torno a 40°C), *pH*, grado de agitación en el reactor, así como la preparación enzimática que se use (Ballesteros *et al.*, 2004; Splinder *et al.*, 1988).

En la hidrólisis enzimática se alcanzan mayores rendimientos en monosacáridos que en la hidrólisis ácida, ya que los enzimas catalizan sólo la reacción de hidrólisis y no la degradación de azúcares. Además, en este proceso no se forman productos de degradación que inhiban la fermentación posterior (Parisi, 1989).

Las condiciones de operación son muy suaves (50°C y *pH* alrededor de 5,0), no existiendo problemas de corrosión de instalaciones (Duff y Murray, 1996; Sun y Cheng, 2002). El principal inconveniente reside en las elevadas cantidades de enzima necesarias, lo que debido a su coste y baja velocidad de reacción, encarecería el proceso.

2.5 ACONDICIONAMIENTO DE LOS HIDROLIZADOS

Se trata de una etapa previa a la fermentación de los hidrolizados donde se ajusta el *pH* del hidrolizado (según *pH* óptimo del microorganismo de fermentación) y se eliminan los posibles productos tóxicos o de inhibición procedentes del proceso de hidrólisis, con el fin de obtener los máximos rendimientos en los bioproductos.

2.5.1 Ajuste del *pH* del hidrolizado

En los hidrolizados, el *pH* es bajo debido a la generación de ácido acético procedente de la hidrólisis de los grupos acetilo de la hemicelulosa, y también al ácido fórmico y levulínico tras la degradación del furfural y del 5-hidroximetilfurfural, respectivamente. En un estudio previo de fermentación de un hidrolizado procedente de madera de abeto a partir de una concentración inicial en biomasa de $0,8 \text{ g dm}^{-3}$ y $pH = 4,6$ (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000b), no se aprecia crecimiento alguno de las células; no obstante, cuando $pH = 5,0$ comienza a observarse el inicio de la duplicación e incremento de la productividad volumétrica de etanol hasta alcanzar un valor de $0,17 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

2.5.2 Eliminación de productos tóxicos e inhibidores

El efecto de estos inhibidores sobre los microorganismos de fermentación depende de factores como la concentración, *pH*, temperatura, aireación, medio de cultivo, microorganismo utilizado, e interacción con otros inhibidores. En este sentido, *Candida shehatae* MJ 23 es inhibida por ácido acético desde concentraciones mínimas, mientras que *S. cerevisiae* ATCC 96581 no se ve afectada, excepto en presencia de furfural (Palmqvist *et al.*, 1999).

Los inhibidores de fermentación se agrupan en tres clases con respecto a su tolerancia (McMillan, 1994):

- Compuestos originados en la biomasa debido al proceso de hidrólisis: ácidos orgánicos como el acético, glucorónico y galacturónico, y ácidos de la hemicelulosa y compuestos fenólicos de la lignina.
- Compuestos procedentes de la degradación de los productos resultantes de pretratamientos e hidrólisis de la biomasa. Esto es, furfural de D-xilosa, y 5-hidroximetilfurfural procedente de D-glucosa, así como una variedad de aldehídos, ácidos y alcoholes de la lignina, azúcares y proteínas de degradación.

- Compuestos de otras fuentes como iones metálicos resultantes de la corrosión de los equipos, sulfitos, dióxido de azufre y ácido láctico introducidos con otras corrientes conteniendo nutrientes, soluciones limpiadoras o recirculados.

En general, el acondicionamiento de hidrolizados para la eliminación de los inhibidores generados en el tratamiento de los materiales lignocelulósicos, Fig. 2.3, implica una serie de etapas denominadas procesos de detoxificación, pudiendo ser éstos físicos, químicos y biológicos. (Palmqvist y. Hahn-Hägerdal, 2000b). La formación de furfural y 5-hidroxi-metil-furfural es posible, a partir de pentosas y hexosas, respectivamente. Además, si la temperatura es suficientemente elevada, el 5-hidroximetilfurfural podría transformarse en ácido levulínico y fórmico, así como el furfural dar directamente ácido fórmico. También se libera ácido acético tras la hidrólisis de la fracción hemicelulósica, así como compuestos aromáticos a partir de la fracción hidrosoluble de la lignina.

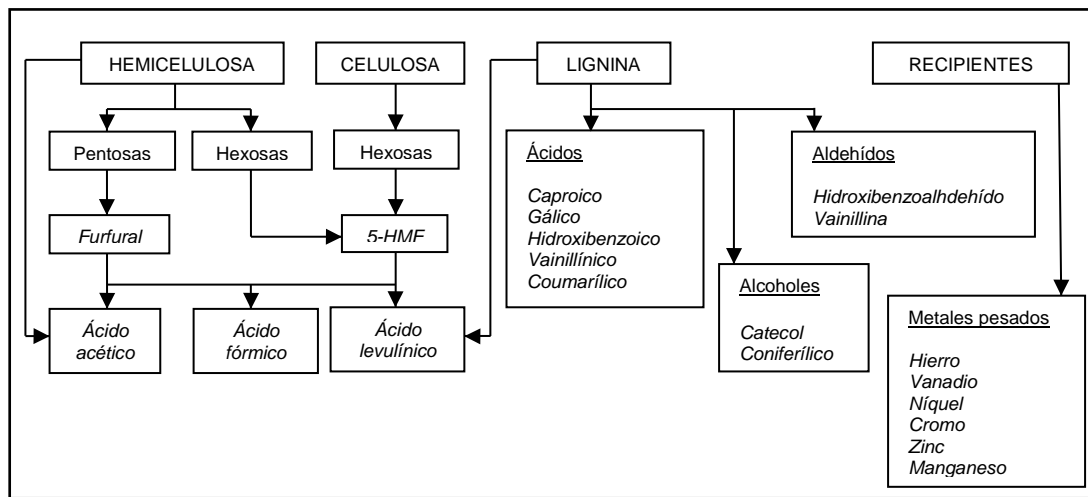


Figura 2.3 Inhibidores microbianos generados durante el tratamiento de materiales lignocelulósicos (Cuevas, 2007).

2.5.2.1 Métodos físicos

➤ Evaporación

Este proceso está basado en una concentración por evaporación a vacío a través de un rotavapor donde se produce una disminución de la temperatura de trabajo, evitándose la degradación de los azúcares. En este caso, se consigue disminuir la concentración de inhibidores volátiles (ácido acético y furfural), concentrándose los no volátiles (compuestos

fenólicos y ácido acético), Tabla 2.5. Posteriormente, puede ser necesario proceder a la eliminación de los inhibidores no volátiles.

Tabla 2.5
Composición del hidrolizado hemicelulósico de residuos de *Eucalyptus grandis* antes y después de la concentración a vacío (Villarreal *et al.*, 2006)

Componentes	Concentración, g dm ⁻³	
	Hidrolizado sin tratar	Hidrolizado concentrado
D-xilosa	12,300	59,200
D-glucosa	0,630	4,500
D-arabinosa	0,840	3,500
Ácido acético	3,400	6,600
Furfural	0,260	0,003
5-Hidroximetilfurfural	0,070	0,270
Compuestos fenólicos	2,200	10,600
Fe	0,210	0,860
Cr	0,030	0,160
Ca	0,590	0,086
Ni	0,013	0,069
Cu	0,000	0,001

➤ Adsorción

En general, cuando se lleva a cabo un procedimiento de concentración por evaporación del hidrolizado, éste someterá a una posterior etapa de detoxificación por adsorción. Para ello, se hace uso de sólidos de elevada superficie específica (carbón activo granular), permitiendo la retención selectiva de algunos inhibidores por adsorción (Cunha *et al.*, 2006; Tada *et al.*, 2004; Villarreal *et al.*, 2006). Se ha observado que mediante esta técnica se elimina el furfural, el 5-hidroxi-metil-furfural y la mayoría de los compuestos fenólicos, no así en el caso del ácido acético, Tabla 2.6. No obstante, mediante este procedimiento se puede absorber parte de la D-xilosa presente en el hidrolizado, siendo éste un inconveniente a tener en cuenta.

Por otro lado, la absorción del agua durante el proceso (los pellets de carbón están secos) provoca un aumento de la concentración de azúcares en el hidrolizado. Esto unido al bajo coste le hace una operación de detoxificación atractiva (Tada *et al.*, 2004).

Tabla 2.6
Composición del hidrolizado hemicelulósico de residuos de la caña de azúcar antes y después de la concentración a vacío (Cunha *et al.*, 2006)

Componentes	Concentración, g dm ⁻³		
	Hidrolizado sin tratar	Hidrolizado concentrado	Hidrolizado concentrado y detoxificado con carbón activo
D-xilosa	17,400	85,000	79,200
D-glucosa	1,300	7,200	5,600
D-arabinosa	1,800	9,700	8,700
Ácido acético	2,300	4,900	3,600
Furfural	0,110	0,025	0,003
5-Hidroximetilfurfural	0,005	0,028	0,001
Ácido p-hidroxibenzoico	0,440	0,590	0,007
Ácido siríngico	0,020	0,087	0,010
Vainilla	0,041	0,066	0,004
Siringaldehído	0,460	0,740	0,060
Ácido ferúlico	0,050	0,200	0,020

➤ Resinas de intercambio iónico

Este proceso se basa en la adsorción electrostática de los inhibidores sobre una resina de intercambio iónico (amberlitas). Según Villarreal *et al.* (2006), las resinas de intercambio iónico disminuyen especialmente la concentración de ácido acético y compuestos fenólicos. No obstante las resinas presentan un coste muy elevado y su regeneración también resulta complicada y costosa.

2.5.2.2 Métodos químicos

➤ Neutralización

Los microorganismos encargados de realizar el proceso de fermentación (levaduras) se cultivan a un *pH* que oscila entre 4,0 y 6,0. Tras la hidrólisis, el *pH* del hidrolizado es muy inferior al *pH* óptimo de crecimiento de las levaduras, por lo que se requiere un posterior ajuste del *pH* del hidrolizado mediante el empleo de bases (p.ej. NaOH, KOH) ó ácidos (p. ej. H₂SO₄, HCl), con el fin de alcanzar *pH* de fermentación. De este modo, se facilita el proceso posterior de fermentación y por tanto, una disminución de costes (Mussatto y Roberto, 2004).

➤ Desintoxicación alcalina

Este proceso consiste en adicionar bases fuertes (p.ej. NaOH, KOH, CaO) al hidrolizado hasta alcanzar un *pH* elevado, con lo que se logra la precipitación ó descomposición de los potenciales inhibidores. A continuación, se procede a la retirada de éstos por precipitación ó centrifugación, y posteriormente se reajusta el *pH* de fermentación (Larsson *et al.*, 1999; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a y b). Dentro de la detoxificación alcalina existen varios métodos:

- 'Overliming': donde se aumenta el *pH* en torno a 10 mediante una base fuerte y se reajusta posteriormente con un ácido (principalmente H₂SO₄). Esta forma de operar está basada en la precipitación de algunos compuestos inhibidores y a la inestabilidad de otros ante altos valores de *pH* (Villarreal *et al.*, 2006).

- Otro método se basa en el incremento del *pH* mediante una combinación de NaOH y Ca(OH)₂, reajustando posteriormente con H₂SO₄. Este procedimiento es más favorable si se compara con la utilización de las bases de forma individual, ya que se produce un cierto efecto sinérgico entre ellas. Además, se reduce la concentración de furfural y 5-hidroxi-metilfurfural, no viéndose afectado el ácido acético, al igual que en los dos procesos anteriores.

- Un último método, propone conseguir el incremento del *pH* mediante un álcali como Ca(OH)₂ ó NaOH, y Na₂SO₃, trabajando a temperaturas elevadas.

En un estudio sobre la detoxificación 'overliming' con Ca(OH)₂ a diferentes *pH*, tiempos y temperaturas (Millati *et al.*, 2002), se observa la eliminación del furfural y del hidroximetilfurfural, no afectando el proceso a la concentración en ácido acético. De hecho, el descenso de los compuestos fenólicos no supera el 30%. Por otro lado, se concluye que el incremento del *pH* y tiempo de tratamiento favorece el posterior proceso de fermentación del hidrolizado desintoxicado. No obstante, la temperatura no es una variable que afecte considerablemente, aunque cuanto menor sea ésta más se favorece la fermentación. Cuando el proceso se lleva a cabo a *pH* superiores a 11,0 se inician procesos de degradación de los azúcares, aumentando su velocidad cuanto mayor sea la temperatura.

2.5.2.3 Métodos biológicos

Estos procesos de desintoxicación han sido poco desarrollados debido tanto a su coste como a la lentitud del proceso. En un estudio previo (Jönsson *et al.*, 1998), se realizó el tratamiento con enzimas peroxidasa y lacas, obtenidos a partir del hongo *Trametes*

versicolor, de un hidrolizado hemicelulósico de sauce, provocándose una eliminación tanto de los monómeros fenólicos como de los ácidos fenólicos; como consecuencia se observó un aumento de dos a tres veces la productividad máxima de etanol. Por otro lado, cuando se utilizó el hongo *T. reesei* para degradar los inhibidores de un hidrolizado de sauce obtenido tras un pretratamiento con vapor, se incrementó la productividad máxima de etanol así como su rendimiento (Palmqvist *et al.*, 1997).

2.6 PROCESO DE FERMENTACIÓN

El término de fermentación se utiliza para designar las modificaciones químicas producidas en los compuestos orgánicos ó inorgánicos (sustratos) debido a la acción de microorganismos (Camacho *et al.*, 1986). Éstos suelen ser bacterias, levaduras y hongos, que en un ambiente adecuado, crecen y se multiplican consumiendo dicho sustrato, produciendo bioproductos como resultado de su metabolismo. En realidad, estas transformaciones las llevan a cabo enzimas que, o bien se encuentran en las propias células de los microorganismos (in vivo) ó bien están aisladas de las células que las produjeron (Camacho *et al.*, 1986).

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

2.6.1 Microorganismos

Para el aprovechamiento integral de los residuos lignocelulósicos los microorganismos, a través de rutas bioquímicas, consumen tanto hexosas como pentosas. La fermentación alcohólica establecida en la mayoría de las industrias actuales para la obtención de etanol, ha utilizado los géneros *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces*, en concreto *S. cerevisiae* (microorganismo tradicional), que fermenta una amplia gama de hexosas con altos rendimientos y productividades., que además de fermentar con rapidez D-glucosa hacia el bioproducto poseen una gran tolerancia al etanol producido, es decir, no existe inhibición de su crecimiento con elevadas concentraciones del bioproducto. No obstante, un inconveniente de estas levaduras es su baja capacidad para metabolizar pentosas, lo que limita su aplicación a hidrolizados ricos en D-glucosa. En efecto, estos microorganismos tradicionales son incapaces de producir etanol a partir de D-xilosa, mientras que el isómero de D-xilosa (D-xilulosa) sí puede ser fermentado. De hecho, cuando se utiliza *S. cerevisiae* se han encontrado bajos rendimientos en cuanto a obtención de etanol a partir de D-xilosa (Kötter y Ciriacy, 1993). Actualmente, con ningún otro microorganismo se obtienen mejores

resultados de conversión de D-glucosa en condiciones estériles, llegándose a alcanzar un rendimiento del orden de 0,47 kg etanol kg⁻¹ D-glucosa, es decir, una productividad de aproximadamente 5 kg m⁻¹ h⁻¹ y concentraciones finales de etanol en torno al 10% en volumen (Ogier *et al.*, 1999).

Existen levaduras que consumen tanto hexosas como pentosas para generar el mismo producto (levaduras no tradicionales). Estos microorganismos también pueden dar lugar a bioproductos de interés alimentario (p. ej. xilitol y arabitol). Dentro de las levaduras no tradicionales se estudian principalmente tres tipos:

a) Levaduras naturales capaces de fermentar pentosas

En un estudio previo donde se describen las principales características de un grupo de levaduras no convencionales (Spencer *et al.*, 2002), se incluyen *Shwanniomyces occidentales*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastiris*, *Pichia methanolica*, *Pichia angusta* (*Hansenula polymorpha*) y *Pichia guilliermondii*, entre otras. Las levaduras capaces de conseguir mayores rendimientos son *C. shehatae*, *Pachysolen tannophilus* y *Pichia stipitis* (Jeffries, 1990; Skoog y Hahn-Hägerdal, 1988). Estos rendimientos están entre 0,28 y 0,48 g g⁻¹ con una productividad dentro del intervalo de 0,02 – 0,66 g dm⁻³ h⁻¹ (Olsson y Hahn-Hägerdal, 1996).

Levaduras como *Kluyveromyces fragilis*, *C. tropicalis*, *Hansenula anomala*, *Pachysolen*, *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*) y *Schizosaccharomyces pombe*, fermentan D-xilulosa, Fig. 2.4, obteniéndose como bioproductos etanol, 20,4 – 23,3 g dm⁻³, y xilitol, 1,0 – 8,0 g dm⁻³ (Gong *et al.*, 1981a; Gong *et al.*, 1983; Jeffries, 1981b; Suihko y Drazic, 1983). Cuando se fermenta con *S. cerevisiae* se obtienen mayores rendimientos, 0,75 g dm⁻³ h⁻¹ (Chiang *et al.*, 1981).

Durante un estudio de fermentación de mezclas de D-xilosa y D-glucosa con una combinación de levaduras para obtener las condiciones de cultivo óptimo y el microorganismo más eficiente para la producción de etanol (Sánchez *et al.*, 2002a), se observó que, durante la fermentación conjunta aparece inhibición en el consumo de D-xilosa en presencia de D-glucosa, tanto en el caso de *P. tannophilus* como en *C. shehatae*, siendo *P. stipitis* la levadura donde mejores resultados se alcanzaron en la producción de etanol.

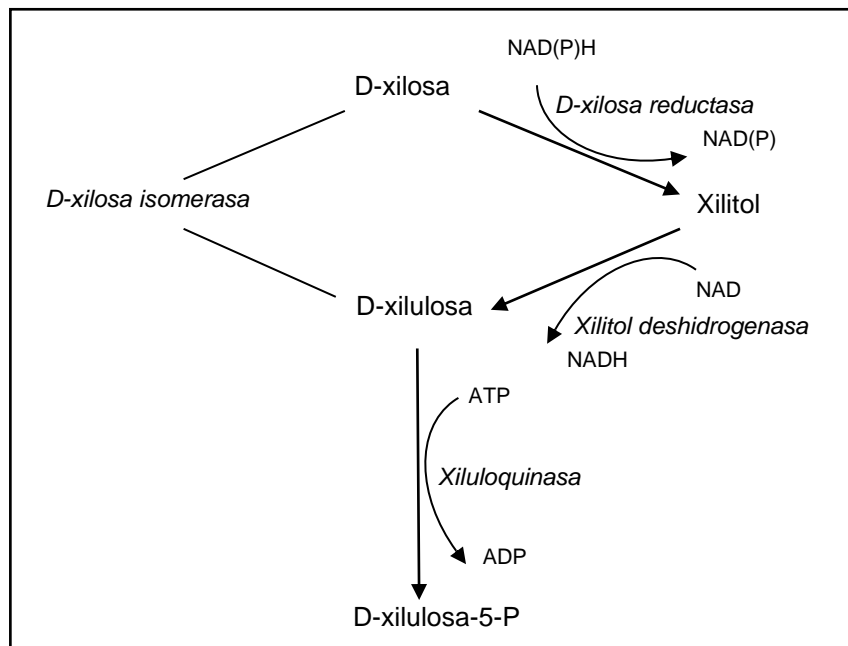


Figura 2.4 Conversión de D-xilosa en D-xilulosa-5-fosfato a partir de levaduras y bacterias (McMillan, 1996).

H. polymorpha es la única levadura metilotrófica termotolerante conocida, con un crecimiento óptimo entorno a 37°C y una máxima temperatura de crecimiento por encima de los 48°C, capaz de fermentar D-xilosa, D-glucosa, celobiosa y otros azúcares lignocelulósicos a estas temperaturas (Hansen y Hollenberg, 1996). En un estudio previo de fermentación de mezclas de D-glucosa y D-xilosa puros al 2,0% con *H. polymorpha*, a diferentes temperaturas con el fin de obtener etanol (Ryabova *et al.*, 2003), se alcanzó un mayor crecimiento celular y concentración de etanol cuando la fuente de carbono fue D-glucosa, siendo éstos máximos a 37 y 40°C.

b) Bacterias termófilas

Se desarrollan a temperaturas superiores a 45°C pudiendo superar incluso los 100°C (hipertermófilas) siempre que exista agua en estado líquido, lo que se consigue si la presión es elevada. Las identificadas son *Clostridium* y *Thermoanaerobacter ethanolicus*. No sólo pueden fermentar monosacáridos sino también celulosa y otros biopolímeros (Wiegel y Ljungdahl, 1986). En un estudio de Carreira *et al.* (1983), se observa un valor de conversión cerca del teórico con una concentración de D-xilosa por debajo del 3% (*p/V*) utilizando

mutación *T. ethanolicus*. Mientras que el original alcanza $0,44 \text{ g g}^{-1}$ en 1% (p/V) de D-xilosa, la mutación alcanza $0,5 \text{ g g}^{-1}$ con productividad volumétrica de $0,12 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

El uso de estas bacterias para la fermentación de pentosas se presenta difícil por sus bajos rendimientos en etanol, formación de diversos bioproductos, y poca tolerancia al etanol con lo que requiere concentraciones iniciales bajas en el sustrato. Finalmente su fuerte sensibilidad a los inhibidores y la necesidad de adicionar factores de crecimiento al medio restan mucho interés a su uso (Ogier *et al.*, 1999).

c) Bacterias mesófilas

Son aquellas que presentan una temperatura óptima de crecimiento entre $20 - 45^\circ\text{C}$. *Zymomonas mobilis* es un caso excepcional de bacteria que puede producir etanol con un elevado rendimiento y productividad pero la fuente de carbono para la obtención de etanol está restringida a D-glucosa, D-fructosa y sacarosa (Olsson y Hahn-Hägerdal, 1993; Swings y de Ley, 1977). Mediante la ingeniería genética se realizan recombinaciones de estas bacterias de tal forma que se mejora tanto el rendimiento etanólico ($0,44 - 0,52 \text{ g g}^{-1}$) como las productividades ($0,18 - 0,96 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$), a la vez que se consigue que sean capaces de fermentar D-arabinosa, D-glucosa D-galactosa y D-manosa (Olsson y Hahn-Hägerdal, 1996).

2.6.2 Sustratos utilizados

Tras someter el material lignocelulósico a un proceso de pretratamiento y posterior hidrólisis, coexisten componentes en porcentaje variable según el tratamiento aplicado, como D-glucosa, D-xilosa, D y L-arabinosa, junto con D-manosa, D-galactosa y D-fructosa. Dichos monómeros constituyen la fuente de carbono y energía para la levadura durante la fermentación con el fin de obtener bioproductos como etanol, xilitol y arabitól.

2.6.2.1 D-glucosa

Es una hexosa que posee un grupo aldehído en el extremo de la molécula y es isómero de D-fructosa, es decir, diferente posición relativa de los grupos $-\text{OH}$ y $=\text{O}$. Libre ó combinada, es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza, constituyendo el componente principal de polímeros en la estructura celulósica.

2.6.2.2 *D-xilosa*

Consiste en una pentosa con un grupo funcional aldehído, que tiene también un isómero funcional que es la xilulosa. Es un componente importante del material lignocelulósico y constituye uno de los ocho azúcares que son esenciales para la nutrición humana (entre ellos están D-galactosa, D-glucosa y D-fructosa).

2.6.2.3 *D y L-Arabinosa*

Es un monosacárido que contiene cinco carbonos con un grupo aldehído (aldopentosa). Aunque en menor porcentaje, forma parte de la fracción celulósica del material lignocelulósico, y por tanto de igual forma fermentable. De las dos formas existentes (D y L), el enantiómero más abundante es L-arabinosa.

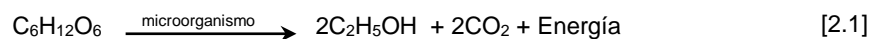
2.6.3 Vías metabólicas

La obtención de bioproductos a partir de la fermentación de hexosas y pentosas, está basado en unas transformaciones enzimáticas que tienen lugar en el interior del microorganismo empleado y que configuran su metabolismo. Su función será extraer la energía y el poder reductor del medio que rodea al organismo con el fin de ser utilizados para sintetizar los constituyentes macromoleculares de su estructura.

2.6.3.1 *Ruta metabólica de obtención de etanol a partir de D-glucosa*

A partir de este proceso se pretende obtener etanol a partir de una hexosa, en anaerobiosis no estricta, sobre todo en su fase inicial, ya que el oxígeno no puede ser totalmente eliminado (es necesario para el desarrollo y crecimiento celular).

La estequiometría de la reacción cuando el sustrato es D-glucosa es la indicada en la Ec. 2.1,



mientras que cuando el sustrato es una pentosa (D-xilosa ó D y L-arabinosa), la reacción es la indicada en la Ec. 2.2.



El rendimiento teórico de estas reacciones (Coeficiente de Gay-Lussac) es de 0,51 g g⁻¹ y representa la máxima eficiencia en la conversión a etanol. Este valor no se alcanza en la práctica ya que los microorganismos usan al menos un 5,0% de este sustrato en su mantenimiento celular y en la obtención de otros productos minoritarios como glicerol, ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, 2.3-butanodiol y algunos alcoholes superiores (Amin *et al.*, 1983).

En el transcurso de la fermentación pueden producirse alteraciones que afectan a la normal evolución de la misma, y por tanto a la obtención de los bioproductos:

- Ausencia completa de oxígeno impidiendo el desarrollo y reproducción celular del microorganismo.
- Exceso de oxígeno que conlleva una oxidación completa, es decir, la respiración con producción de dióxido de carbono y agua. En definitiva, un aumento excesivo de biomasa sin obtención de bioproductos, Ec. 2.3 y 2.4.



- Consumo por parte del microorganismo del bioproducto generado, ante la ausencia de otras fuentes de carbono y energía, generando dióxido de carbono y agua (diauxia), Ec. 2.5.



- Cuando la concentración de sustrato es elevada (aproximadamente el 24%), la presión osmótica inhibe el crecimiento celular, sobre todo en la fase inicial (Soumalainen y Oora, 1971).

- Ante concentraciones de pentosas ó hexosas elevadas se incrementa la producción de en bioproducto, no favoreciéndose la fermentación; en efecto, concentraciones superiores a

120 g dm⁻³ provocan una parada del crecimiento celular, siendo la inhibición despreciable en concentraciones inferiores a 30 g dm⁻³ (Ghose y Tyagi, 1979).

En general se acepta la existencia de tres grandes rutas capaces de desembocar en etanol: glucolisis (Embden-Meyerhoff-Parnas), hexosa ó pentosa monofosfato, y Entner-Doudoroff.

➤ Metabolismo de D-glucosa a través de vía Embden-Meyeroff-Parnas (EMP)

En esta ruta, D-glucosa es fosforilada a D-glucosa-6-fosfato y posteriormente isomerizada a D-fructosa-6-fosfato por medio de los enzimas hexoquinasa y fosfohexoisomerasa, respectivamente, siendo degradada finalmente a piruvato. La degradación de D-glucosa transcurre en las células fermentativas y en aquellas que utilizan este monosacárido de forma común hasta el ácido pirúvico.

La decarboxilación del ácido pirúvico a acetaldehído y la reducción de éste hasta etanol (fermentación etanólica) son, sin embargo, exclusivos de las levaduras y de algunos hongos actinomicetos. En este caso, el ácido pirúvico se activa uniéndose a la tiaminapiruvato (TPP), transformándose en acetaldehído por acción del enzima piruvato descarboxilasa con la consiguiente liberación de CO₂. Posteriormente, se forma etanol como producto final por acción del alcohol deshidrogenasa.

➤ Metabolismo de D-glucosa a través de la vía Hexosa ó Pentosa monofosfato. Fermentación Pentosas

En este caso, D-glucosa se transforma en ribosa-5-fosfato y en sedoheptulosa-7-fosfato. A partir de éste se puede generar o bien gliceraldehido-3-fosfato mediante el enzima transaldolasa ó bien fructosa-6-fosfato. Ambos productos pueden incorporarse en el ciclo EMP y transformarse en piruvato para posteriormente obtener etanol.

➤ Metabolismo de D-glucosa a través de la ruta Entner-Doudoroff

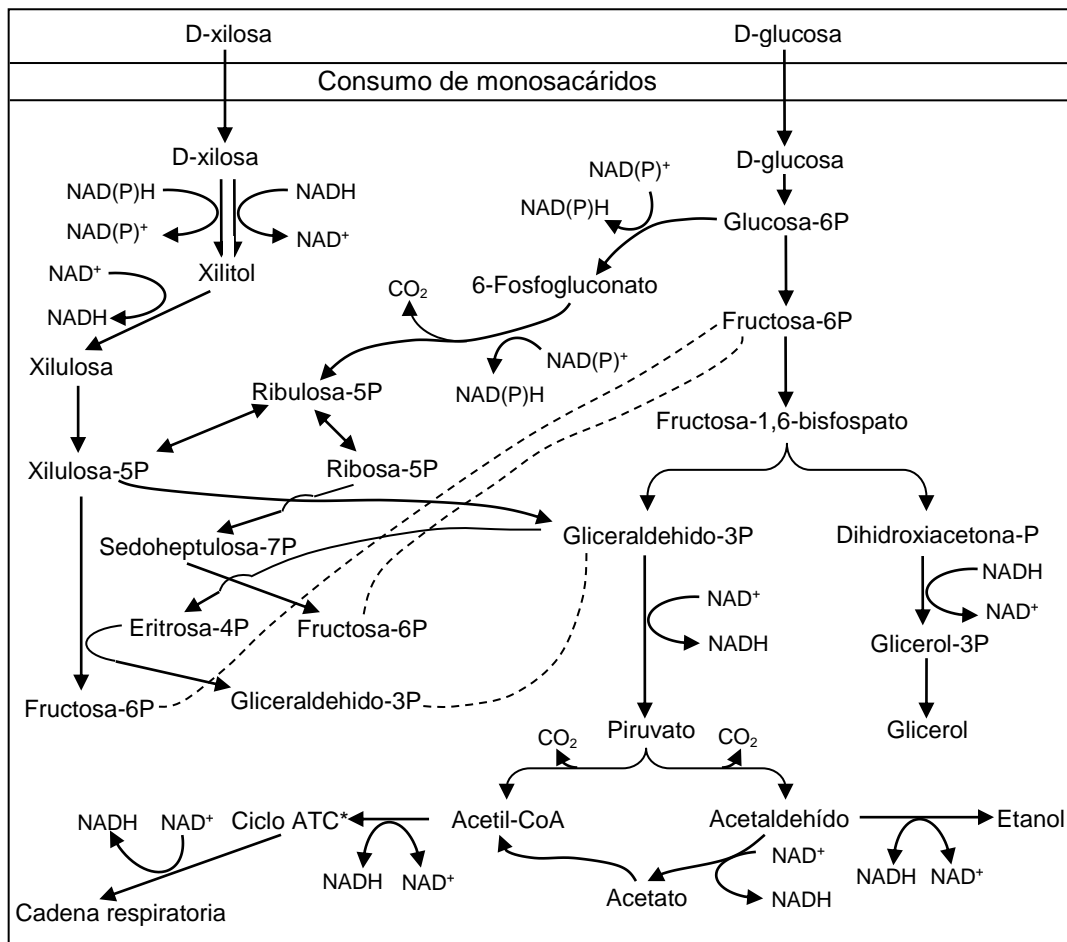
Es una ruta metabólica alternativa que cataboliza D-glucosa a piruvato usando una serie de enzimas distintas a la glucolisis y a la ruta de la pentosa-fosfato. El 6-fosfogluconato puede deshidratarse a 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato. Este compuesto puede desdoblarse posteriormente en piruvato y gliceraldehido-3-fosfato mediante una aldolasa.

Adicionalmente, el gliceraldehído-3-fosfato se oxida a piruvato por la vía de Embden-Meyerhof, descarboxilándose en ambos casos el piruvato y originando acetato con el fin de obtener etanol y CO₂.

2.6.3.2 Ruta metabólica de obtención de etanol a partir de D-xilosa

Desde el descubrimiento de la capacidad de las levaduras para fermentar D-xilosa (Jeffries, 1981a; Schneider *et al.*, 1981), su ruta metabólica ha sido investigada con gran detenimiento. Por un lado, las bacterias isomerizan D-xilosa directamente a xilulosa. En cambio, las levaduras y hongos producen un compuesto intermedio, xilitol, durante las primeras etapas del metabolismo de la pentosa, mediante los enzimas xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, Fig. 2.5. A continuación la xilulosa es fosforilada a D-xilulosa-5-fosfato a través del enzima xilulosa quinasa. Este intermedio se metaboliza a través de la ruta pentosa-fosfato, obteniéndose gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato, pudiéndose ambos transformar en piruvato a través del ciclo Embden-Meyerhoff-Parnas, para producir finalmente etanol y CO₂ (Xu y Taylor, 1993). En estudios previos de investigación (Watson *et al.*, 1984), se puso de manifiesto la necesidad de la presencia de oxígeno para la producción de etanol a partir de D-xilosa.

Las levaduras que son capaces de fermentar D-xilosa siguen la ruta óxido-reductiva de conversión de D-xilosa a xilulosa vía xilitol. La diferencia significativa entre el metabolismo de las hexosas con respecto al de las pentosas es que estas últimas, al contrario que las hexosas, han de ser transportadas a través de la ruta pentosa-fosfato (Strathern *et al.*, 1982), Fig. 2.5. Por otro lado, se ha comprobado que la presencia de D-xilosa es requerida para la producción de los enzimas xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, no estando ninguno de los dos presentes durante la fermentación de D-glucosa (Bruinenberg *et al.*, 1983). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Alexander *et al.* (1988) utilizando *C. shehatae* y modificando las fuentes de carbono y energía (D-xilosa y D-glucosa); en este estudio, estos enzimas fueron inducidos por la presencia de D-xilosa, estando prácticamente ausentes en células que crecen sobre D-glucosa. En cambio, se detectó niveles de alcohol deshidrogenasa mayores en células que crecían sobre D-glucosa que en aquellas que utilizaban D-xilosa como fuente de carbono y energía.



(*) Ciclo del ácido tricarboxílico.

Figura 2.5 Vía metabólica propuesta para el metabolismo de D-xilosa y D-glucosa en levaduras que fermentan pentosas (adaptado de Strathern *et al.*, 1982).

La levadura *S. cerevisiae* no es capaz de fermentar D-xilosa, pero sí de asimilar xilulosa, por tanto cuando el enzima xilosa isomerasa está presente en el medio, la D-xilosa se convierte en xilulosa que posteriormente se fermenta a etanol por parte de *S. cerevisiae*. La velocidad de formación de etanol a partir de D-xilosa es aproximadamente la mitad que cuando el sustrato es D-glucosa (Ligthelm *et al.*, 1988; Skoog, 1992). Por otro lado, *P. stipitis* y *C. shehatae* están entre las mejores levaduras descritas capaces de fermentar D-xilosa (Jeffries y Kurtzman, 1994). En general, poseen una velocidad específica máxima de producción de etanol de 0,51 g g⁻¹ h⁻¹ y con rendimiento en etanol de 0,50 g g⁻¹ con respecto a D-xilosa (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994).

2.6.3.3 Ruta metabólica de obtención de etanol a partir de D y L-arabinosa

Cuando se emplea como fuente de carbono y energía L-arabinosa, se puede conseguir su conversión hacia etanol, Fig. 2.6. En las bacterias, L-arabinosa se isomeriza a L-ribulosa, fosforilándose posteriormente hacia L-ribulosa-5-fosfato. Finalmente, tras pasar a D-xilulosa-5-fosfato, se introduce en el metabolismo central de la pentosa-fosfato.

En la mayoría de los hongos, la conversión inicial de L-arabinosa a D-xilulosa-5-fosfato transcurre a través de una serie de etapas de reducción y de oxidación que implican a los cofactores NAD(P)⁺/ NAD(P)H, Fig. 2.6. En este sentido, L-arabinosa se reduce a L-arabinitol, que se somete a etapas de oxidación y de reducción adicional para ser convertida a xilitol (Richard *et al.*, 2002; Verho *et al.*, 2004). El xilitol se oxida a D-xilulosa (Wang y Jeffries, 1990) que, de forma similar a las bacterias, es fosforilada a D-xilulosa-5-fosfato, conectándose con las rutas metabólicas centrales, como ocurre en el metabolismo bacteriano.

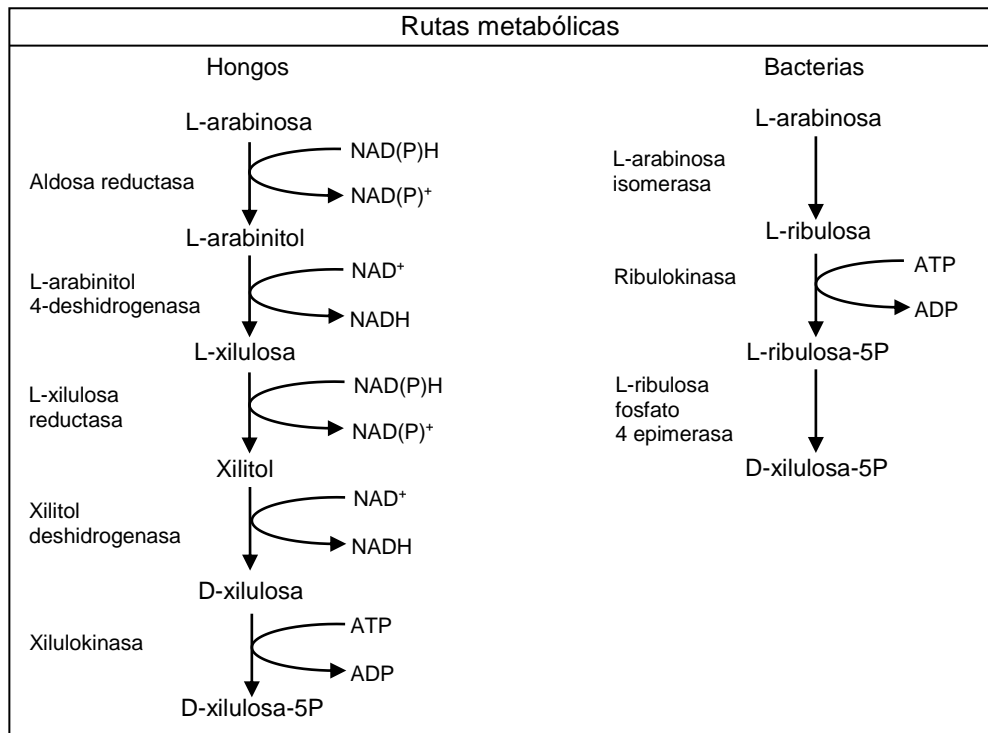


Figura 2.6 Vía metabólica de L-arabinosa y D-xilosa en bacterias y hongos (Verho *et al.*, 2004).

A pesar de existir levaduras capaces de crecer en L-arabinosa, estudios previos de investigación (Dien *et al.*, 1996), demostraron que sólo con *C. succiphila*, *C. auringsiensis*, *Candida sp* (YB-2248) y *Ambrosiozyma monospora*, en fermentación directa de D y L-arabinosa produjeron etanol, en concreto un máximo en torno a 4,1 g dm⁻³.

La vía metabólica para la producción de etanol a partir de D y L-arabinosa, es diferente en las levaduras, Fig. 2.7.

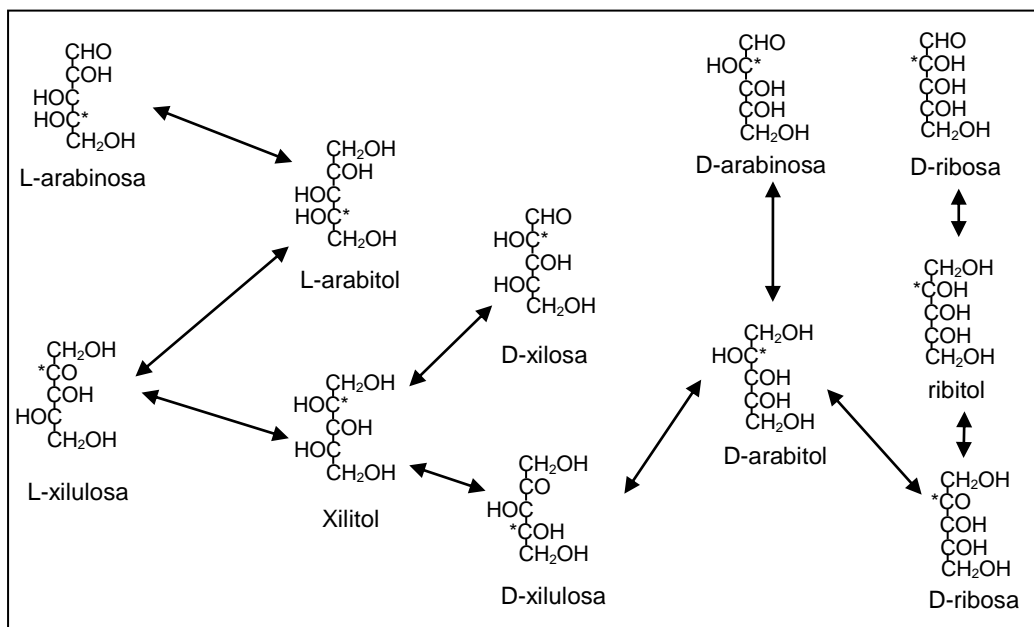


Figura 2.7 Ruta metabólica de L y D-arabinosa hacia etanol. Interconversión de pentosas y pentaalcoholes por NAD(PH) en las que intervienen oxidoreductasas (Jeffries y Jin, 2004).

2.6.3.4 Ruta metabólica para la obtención de xilitol a partir de D-xilosa

El xilitol es un pentalcohol que presenta un elevado interés en la alimentación y en la industria farmacéutica. A gran escala, se obtiene por hidrogenación química de D-xilosa derivada de hidrolizados hemicelulósicos, en presencia de un catalizador de níquel, y en condiciones de elevada presión y temperatura. Es necesario purificar previamente D-xilosa con el fin de eliminar las impurezas, aumentando de este modo el rendimiento en xilitol. Debido a su alto coste de producción, el xilitol es un producto de elevado precio.

Las levaduras del género *Candida* (*C. tropicalis*, *Candida guilliermondii*) son las que ofrecen mejores resultados en la fermentación de D-xilosa hacia la producción de xilitol

(Winkelhausen y Kuzmanova, 1998). Otras levaduras no tradicionales como *H. polymorpha* (Sánchez *et al.*, 1998), *Debaryomyces hansenii* (Nobre *et al.*, 2002) y *P. tannophilus* también son muy utilizadas.

Las variables de operación referidas a la producción de xilitol por parte de estas levaduras, que influyen en la mejora del rendimiento y producción del xilitol son:

- Composición del medio de cultivo: la concentración en extractos de levadura suele estar dentro del rango de 10,0 – 20,0 g dm⁻³. En un estudio previo de investigación (da Silva *et al.*, 1997), se aumentó la concentración del medio desde 5,0 a 10,0 g dm⁻³ provocando un incremento en la producción de biomasa de *C. guilliermondii* FTI 20037 a la vez que una disminución pronunciada de la productividad de xilitol.

- Concentración de inóculo: durante la fermentación de D-xilosa se estudió el efecto de la concentración inicial de *Candida* sp. B-22 en la producción de xilitol (Cao *et al.*, 1994), observándose que la velocidad de producción del xilitol era lineal; en este sentido, con la máxima concentración de inóculo, 26,0 g dm⁻³, y a partir de 260,0 g dm⁻³ de D-xilosa, se obtuvo 210,0 g dm⁻³ de xilitol. Por otro lado, se detectó una disminución del tiempo de fermentación con el incremento de la concentración inicial de levadura.

- Tamaño de inóculo: en un estudio de fermentación de hidrolizados hemicelulósicos de paja de arroz con *C. guilliermondii* FTI 20037 (Roberto *et al.*, 1996), se observó que aumentando la densidad de células desde 0,67 g dm⁻³ a 2,41 g dm⁻³, se disminuyó la formación de biomasa, el consumo de D-xilosa y la producción de xilitol. Por el contrario, cuando se fermenta hidrolizados de madera con *D. hansenii* NRRL Y-7426, la producción de xilitol es superior cuando las densidades iniciales son elevadas (Parajó *et al.*, 1996).

- Edad del inóculo: durante un estudio de investigación donde se varió la edad del inóculo de *C. guilliermondii* FTI 20037 desde 15 a 70 h (Pfeifer *et al.*, 1996; da Silva *et al.*, 1997), se puso de manifiesto que con inóculos menores de 24 h se alcanzaban productividades inferiores. A partir de las 24 h, no se afectaba sobre la concentración final y el rendimiento en xilitol, siendo la productividad similar.

- Efecto de la temperatura: la temperatura óptima en fermentación con levaduras para la producción de xilitol es 30°C (Winkelhausen y Kuzmanova, 1998). Generalmente, el rendimiento en xilitol es independiente de la temperatura cuando la levadura es cultivada en un rango de temperatura entre 30 y 37°C, pero por encima de éste, disminuye fuertemente (da Silva y Afschar, 1994). Durante un estudio del efecto de la temperatura en la producción de etanol y xilitol (du Preez *et al.*, 1986), se detecta que a elevadas temperaturas la

producción de xilitol se ve favorecida frente a la de etanol. Por otro lado, Sánchez *et al.* (2004) observaron que la temperatura óptima para la producción de xilitol con *P. tannophilus* difiere en 15°C de la óptima de etanol, permitiendo controlar una de las dos vías de producción de los bioproductos.

- Efecto del *pH*: las levaduras se cultivan en un rango de *pH* de 4,0 – 6,0. El *pH* óptimo inicial para *C. boudinii* es 7,0 (Vandeska *et al.*, 1995a), mientras que cuando el *pH* está contralado y es constante, se aconseja un *pH* de 5,5 (Vandeska *et al.*, 1995b). Cuando el *pH* se mantiene constante durante todo el bioproceso, *pH* inicial óptimo es 5,5 para *D. hansenii* (Domínguez *et al.*, 1996), en el rango de 4,0 – 6,0 para *Candida* sp. (Cao *et al.*, 1994) y 4,0 para *C. tropicalis* (Yahashi *et al.*, 1996). En un estudio de la influencia del *pH* y de la aeración en la fermentación de D-xilosa con *H. polymorpha* (Bravo *et al.*, 1990), se determinó la velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial, así como el rendimiento en xilitol, no viéndose ambos afectados por la variación del *pH* inicial. En lo que se refiere al nivel de aeración, la velocidad específica de crecimiento aumentó con el incremento del caudal de suministro de aire, al contrario que el rendimiento en xilitol que disminuía con el nivel de aeración.

- Efecto del sustrato: en ausencia de D-xilosa, la formación de xilitol no tiene lugar. Cuando se incrementa la concentración de D-xilosa se favorece la formación de xilitol a expensas de la producción de etanol, y como consecuencia un aumento de la relación xilitol respecto al etanol, una disminución del rendimiento en etanol y un incremento del rendimiento en xilitol (Meyrial *et al.*, 1991; Skoog y Hahn-Hägerdal, 1988; Vandeska *et al.*, 1995a). Generalmente, para conseguir unos rendimientos elevados en xilitol se parte de concentraciones iniciales en D-xilosa entre 100 y 200 g dm⁻³, aunque para el caso de *C. guilliermondii* NRC 5578, 300 g dm⁻³ sería lo más adecuado (Meyrial *et al.*, 1991). No obstante, dependiendo del tipo de levadura se puede detectar inhibición en la formación de xilitol ante determinadas concentraciones del sustrato, (Winkelhausen y Kuzmanova, 1998). En relación al efecto de las hexosas con respecto al consumo de D-xilosa, algunos estudios demuestran que D-galactosa, D-celobiosa y L-arabinosa no afectan a su asimilación, mientras que D-manosa y especialmente D-glucosa desvían su consumo (Bichio *et al.*, 1988; da Silva y Afschar, 1994; Lee *et al.*, 1996). En mezclas de D-glucosa y D-xilosa, sólo hasta que la totalidad de D-glucosa es consumida por parte de la levadura, se comienza a asimilar D-xilosa (Delgenes *et al.*, 1988; Vandeska *et al.*, 1996). Esto se justifica por el hecho de que existe una inhibición parcial de xilosa reductasa y como consecuencia sólo una pequeña cantidad de xilitol es producido. Por el contrario, durante la fermentación de D-

xilosa con *C. shehatae* FPL-702 en presencia de D-glucosa (Sreenath y Jeffries, 1996), se detectó un incremento en la producción de xilitol. De igual forma, Sánchez *et al.* (2007) observaron que la ausencia de D-glucosa en los medios de cultivo reducía significativamente las velocidades específicas de producción de xilitol con *C. tropicalis*.

- Efecto del nivel de aeración: La fermentación con levaduras puede desarrollarse en condiciones anaeróbicas, aeróbicas y con transferencia de oxígeno (Laplace *et al.*, 1991). En condiciones de aeróbicas no se produce xilitol, incluso algunas levaduras como *C. tropicalis* ATCC 32113 pueden reasimilar tanto el etanol como el xilitol existente en el medio (Lohmeier-Vogel *et al.*, 1995). En condiciones anaerobias se puede observar que ninguna levadura es capaz de crecer en D-xilosa (Schneider, 1989). En estudios previos de investigación (Roseiro *et al.*, 1991; Sánchez *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 1998), se demuestra que el crecimiento celular de la levadura y el proceso de fermentación para la producción de xilitol sólo se desarrolla en condiciones microaeróbicas.

- Xilitol producido: cuando las concentraciones de xilitol son elevadas se provoca la inhibición de las levaduras; en efecto, la acumulación de xilitol no debe superar el rango de 10,0 – 15,0% (p/V). Al aumentar la temperatura se reduce la tolerancia de la levadura al xilitol; efectivamente, cuando la temperatura es superior a 35°C la concentración de xilitol se reduce a 10,0% (p/V).

- Existencia de inhibidores: Los procesos de hidrólisis favorecen la formación de compuestos como furfural, ácido acético y 5-hidroximetilfurfural que inhiben la conversión de D-xilosa a xilitol (Felipe *et al.*, 1996). Durante la fermentación de hidrolizados lignocelulósicos por *D. hansenii* CCMI 941 a xilitol (Duarte *et al.*, 2005), se estudió el efecto de determinados ácidos alifáticos, del furfural y compuestos fenólicos. Se observó que, a concentraciones inferiores a 6 g dm⁻³, el ácido acético favorecía la formación de biomasa; además, los compuestos fenólicos existentes provocaban una fuerte disminución de la velocidad específica de crecimiento y de igual forma, el incremento en la concentración de furfural influía negativamente en la velocidad específica máxima específica de crecimiento y en la productividad en biomasa.

La mayor parte de las investigaciones que se han realizado se centran en levaduras del género *Candida*, ya que pocos organismos son capaces de utilizar D-xilosa como fuente de carbono y energía, a la vez que acumulan el xilitol obtenido, evitando su transformación en D-xilulosa, Fig. 2.4. Las especies que han reportado mayores productividades y rendimiento son *C. tropicalis*, *P. tannophilus*, *P. stipitis*, *C. guilliermondii*, *D. hansenii* y *Candida*

parapsilopsis, variando los rendimientos en xilitol respecto a D-xilosa entre 0,73 y 0,88% y las productividades entre 1,73 y 3,15 g dm⁻³ h⁻¹ (Gong *et al.*, 1981b).

2.6.3.5 Ruta metabólica para la obtención de arabitol a partir de D-glucosa

A partir de unos estudios previos de investigación (Ingram y Wood, 1965), se observó que la levadura *Saccharomyces rouxii* es capaz de producir D-arabitol a partir de D-glucosa mediante dos rutas metabólicas alternativas. Por una parte, tras pasar D-glucosa a D-ribulosa-5-fosfato, puede desfosforilarse y reducirse de D-ribulosa a D-arabitol mediante el enzima arabitol deshidrogenasa: Vía de formación de D-ribulosa, Fig. 2.8; otra alternativa es que D-ribulosa-5-fosfato procedente de D-glucosa se convierta a D-xilulosa-5-fosfato, la cual se defosforila y posteriormente se reduce de D-xilulosa a D-arabitol por la acción del enzima xilitol deshidrogenasa: vía de formación de D-xilulosa (Saha *et al.*, 2007), Fig. 2.8.

Kodamaea ohmeri produce D-arabitol a partir de D-glucosa como principal bioproducto (Zhu *et al.*, 2010); en este sentido, las condiciones óptimas de cultivo fueron a 37°C, pH neutro, 220 r.p.m. y con un 5,0% de inóculo. A partir de 200 g dm⁻³ de D-glucosa y tras 72 h, se obtuvo una concentración de arabitol en torno a 81,2 g dm⁻³, con un rendimiento en arabitol de 0,41 g g⁻¹ y una productividad volumétrica de 1,13 g dm⁻³ h⁻¹.

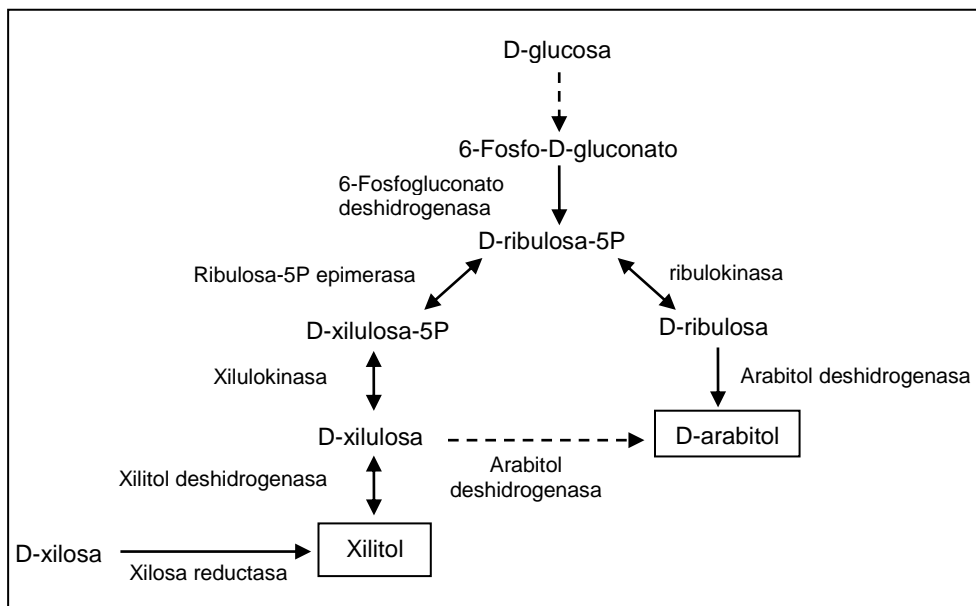


Figura 2.8 Posibles vías metabólicas de conversión de D-glucosa a arabitol y D-xilosa a arabitol y xilitol por *Zygosaccharomyces rouxii* NRRL Y-27,624 (Diagrama basado en el realizado por Saha *et al.*, 2007).

2.6.4 Productos obtenidos en el bioproceso

Los bioproductos principales obtenidos a partir de una fermentación microbiana son bioetanol, xilitol y arabitol.

2.6.4.1 Bioetanol

Se trata de un alcohol que, en condiciones normales de presión y temperatura, se presenta como un líquido incoloro, volátil e inflamable. Tiene un punto de fusión de $-114,1^{\circ}\text{C}$, un punto de ebullición de $78,5^{\circ}\text{C}$ y una densidad relativa de 0,80 a 20°C .

Actualmente, el etanol se produce por fermentación de materiales con alto contenido en sacarosa, almidón ó celulosa, previamente pretratados e hidrolizados con el fin de liberar el máximo contenido de monosacáridos fermentables. El líquido fermentado contiene una concentración de etanol en torno a un intervalo de 7,0 – 12,0% (V/V), concentrándose posteriormente por destilación hasta un 95,0% (V/V). Si la destilación es simple, se limita la pureza del etanol a un intervalo entre el 95,0 y 96,0% por la formación del azeótropo de agua y etanol, de bajo punto de ebullición. Para conseguir obtener etanol libre de agua, se aplica la destilación azeotrópica en una mezcla con benceno o ciclohexano. En estas mezclas se destila el azeótropo a temperaturas más bajas, mientras que el etanol se queda retenido. Otro método de purificación muy utilizado actualmente es la absorción física mediante tamices moleculares. A escala de laboratorio también se pueden utilizar desecantes como el magnesio, que reacciona con el agua formando hidrógeno y óxido de magnesio. Ciertos agentes hidratantes extraen el agua residual y producen etanol absoluto.

Su uso como combustible puede realizarse bien sólo ó bien mezclado en cantidades variadas con gasolina, que por razones de miscibilidad entre ambos productos, no deben sobrepasar el 5 – 10% en volumen de etanol en climas fríos y templados, pudiendo llegar hasta un 20% en zonas más cálidas. Su uso se ha extendido principalmente para reemplazar el consumo de derivados del petróleo. Se utiliza ampliamente en muchos sectores industriales (síntesis de diversos productos como acetato de etilo, éter dietílico, entre otros) y en el sector farmacéutico, como excipiente de algunos medicamentos y cosméticos. Para su uso comercial se utiliza diluido al 95% (V/V).

No obstante, debido a que el uso energético en los actuales métodos de producción de etanol es muy significativo respecto a la energía procedente del combustible obtenido, no es posible sustituir en su totalidad el consumo actual de combustibles fósiles por esta vía de aprovechamiento de subproductos.

2.6.4.2 Xilitol

Es un polialcohol de 5 carbonos, y que puede sustituir a la sacarosa en el caso de diabéticos (no precisa de insulina para su metabolismo) ya que tiene el mismo valor energético. Como edulcorante no tiene efectos sobre la salud dental, ya que no favorece el crecimiento de bacterias causantes de la caries dental. Su calor de disolución provoca una sensación de frescor bucal muy valorada por los fabricantes de chicles, helados y bebidas refrescantes. (Pepper y Olinger, 1988). Durante un estudio de investigación (Uhari *et al.*, 1998), se puso de manifiesto la eficacia del xilitol frente a la prevención de infecciones de oído, permitiendo desarrollar una profilaxis eficaz contra la otitis media aguda.

Aunque el xilitol está presente en algunas frutas y verduras, su extracción no es viable económicamente debido al alto coste del proceso y al pequeño contenido en xilitol de dichas fuentes, inferiores a 900 mg 100 g⁻¹ (Pepper y Olinger, 1988). Actualmente, a escala industrial, el xilitol se obtiene mediante la reducción química de D-xilosa procedente de hidrolizados de materiales lignocelulósicos. El proceso convencional incluye una hidrólisis ácida inicial del material lignocelulósico, seguida de la purificación del hidrolizado para obtener D-xilosa cristalina pura ó en disolución. A continuación, se procede a la hidrogenación de D-xilosa a xilitol en presencia níquel como catalizador, y finalmente la cristalización del xilitol resultante (Nigam y Singh, 1995). La etapa crítica de este proceso es la separación y purificación de D-xilosa obtenida tras el proceso de hidrólisis, muy costosa económicamente ya que la hidrólisis ácida produce cantidades considerables de D-galactosa, L-arabinosa y D-manosa junto con D-xilosa. La búsqueda de vías alternativas para la producción de xilitol está presente, siendo la técnica más atractiva hoy en día la microbiana, y entre los microorganismos, las levaduras son consideradas como las mejores productoras de xilitol, generalmente en condiciones microaeróbicas (Roseiro *et al.*, 1991).

2.6.4.3 Arabitol

Es un polialcohol de cinco carbonos con una producción de gran interés en la industria alimentaria debido a su uso potencial como edulcorante artificial de bajo valor calórico (0,2 kcal g⁻¹), comparado con las 2,4 kcal g⁻¹ del xilitol. De igual forma tiene aplicaciones como edulcorante sustituto para pacientes diabéticos (Gare, 2003).

El arabitol se produce a partir de D-glucosa por desfosforilación de D-ribulosa-5-fosfato por el enzima 6-Fosfogluconato deshidrogenasa, y posterior reducción de D-ribulosa mediante D-arabitol deshidrogenasa ligada a NADPH, Fig. 2.8. Algunas levaduras

pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia* y *Candida* producen arabitol a partir de D-glucosa (Escalante *et al.*, 1990a). Por otro lado, el arabitol obtenido puede ser convertido de forma eficaz hacia xilitol por *Glucanobacter oxydans* (Suzuki *et al.*, 2002), considerándose una alternativa interesante para la producción de xilitol frente a los procesos químicos ó biológicos que parten de D-xilosa existente en materiales lignocelulósicos, los cuales son muy costosos.

2.6.4.4 Producción de otros bioproductos

El metabolismo celular de las bacterias y levaduras puede utilizarse para obtener otros compuestos de interés, partiendo de carbohidratos de bajo peso molecular. Entre estos, cabe destacar:

- El ácido cítrico se obtiene por fermentación con *A. niger* (Kim *et al.*, 2006). Es de gran importancia comercial y con un gran volumen de producción.
- El acetaldehído capaz de convertir eficientemente el etanol mediante el aislamiento de células de la levadura metilotrófica *H. polymorpha* recombinadas (Moroz *et al.* 2000).
- El ácido acético obtenido por fermentación de D-xilosa mediante el organismo anaeróbico *Clostridium thermoaceticum* (ATCC 49707); en este sentido, a partir de 20 g dm⁻³ de concentración inicial de D-xilosa y 5 g dm⁻³ de extracto de levadura, se consigue una concentración máxima de ácido acético de 15,2 g dm⁻³ y un rendimiento en el mismo de 0,76 g g⁻¹(Balasubramanian *et al.*, 2001).
- Síntesis del 2,3-butanodiol con *Enterobacter cloacae* NRRL B-23289, a partir de sustratos ricos en L-arabinosa (Saha y Bothast, 1999).
- El ácido láctico obtenido mediante *Escherichia coli* FBR 19, siendo esta cepa capaz de asimilar 100 g dm⁻³ de mezclas de D-glucosa y D-xilosa con el fin de producir 77 g dm⁻³ de producto (Dien *et al.*, 2002).

2.7 PROCESOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON LEVADURAS

La obtención de bioproductos a partir del pretratado lignocelulósico, puede llevarse a cabo a través de dos vías:

- Proceso de dos etapas secuenciales donde la hidrólisis (ácida o enzimática) y fermentación se realizan por separado (Hidrólisis y Fermentación Separadas, HFS).
- Proceso en una única etapa donde la hidrólisis y la fermentación es simultánea (Sacarificación y Fermentación Simultánea, SFS).

En general, la ventaja del proceso de HFS es la capacidad para llevar a cabo cada etapa en las condiciones óptimas debido a la separación de éstas; en este sentido, la temperatura óptima para la hidrólisis enzimática (45 – 50°C) es típicamente más alta que la de fermentación dependiendo del microorganismo seleccionado (Tengborg *et al.*, 2008). No obstante, la inhibición de los enzimas durante el proceso es otro problema importante; efectivamente, componentes inhibidores son liberados durante la hidrólisis enzimática de D-glucosa y celobiosa, lo que exige menores cargas de sólidos y mayores cargas de enzimas con el fin de lograr rendimientos razonables. En un estudio previo sobre la bioconversión hacia etanol a partir de D-xilosa usando levaduras (Jeffries y Jin, 2000), se observó que por lo general, estos enzimas son muy susceptibles a la inhibición por retroalimentación del producto final de la vía metabólica que controlan (p. ej. D-glucosa, D-xilosa, D o L-arabinosa, celobiosa y otros oligosacáridos). Obviamente, evitar la inhibición del producto final es probablemente una de las razones más importante para optar por el proceso SFS. Además, existen varias ventajas potenciales; efectivamente, en una investigación realizada por Gauss *et al.* (1976) se destacó la no necesidad de separación de D-glucosa del resto del hidrolizado (incluida la fracción de lignina) tras una etapa de hidrólisis enzimática separada, evitando así una posible pérdida de sustrato. Por otra parte, ante una hidrólisis ácida, los hidrolizados han de ser neutralizados antes de la fermentación, controlando también la existencia de productos de degradación generados a partir de la hidrólisis, ya que pueden afectar al microorganismo encargado de realizar la fermentación.

En la hidrólisis y fermentación simultánea, la combinación de ambos procesos disminuye el número de biorreactores necesarios y, por lo tanto, los costes de capital inmovilizado; efectivamente, se estima la disminución en la inversión de capital en más del 20% (Wingren *et al.*, 2003). Esto es bastante importante, ya que se puede esperar que los costes de capital sean comparables con los costes de la materia prima en la producción de etanol a

partir del material lignocelulósico. Los procesos de SFS se realizan en un mismo reactor, donde los enzimas celulasas y xilanasas transforman los polímeros de carbohidratos en monómeros fermentables (Jeffries y Jin, 2000). Simultáneamente, se lleva a cabo la fermentación de los monosacáridos obtenidos con el microorganismo seleccionado, convirtiéndose de forma continua a bioproductos (p. ej. etanol, xilitol, arabitol). Hay que destacar el hecho de que las celulasas operan de manera óptima a altas temperaturas (en torno a 50°C y superior), mientras que los organismos más conocidos capaces de fermentar los azúcares lignocelulósicos, y especialmente pentosas, son organismos mesófilos con un crecimiento óptimo y temperaturas de fermentación alrededor de los 30°C (du Preez, 1994; Jeffries y Jin, 2000). Esto significa que el proceso de SFS requiere condiciones en cuanto a *pH*, temperatura y concentración de sustrato compatibles con los procesos de fermentación y de hidrólisis (Ballesteros *et al.*, 2004). En muchos casos, un *pH* bajo (<5,0), y altas temperatura (>40°C), pueden ser favorables para la hidrólisis enzimática, mientras que estas condiciones pueden afectar negativamente el crecimiento celular de las levaduras. Para cultivos de *Saccharomyces* la hidrólisis y fermentación simultánea se controla típicamente a un *pH* = 4,5 y 37°C (Dien *et al.*, 2003). Además, como puntos débiles en el proceso de SFS también se observa la pérdida de actividad catalítica asociada a la presencia de etanol (Chen y Jin, 2006) ó debida a adsorciones irreversibles sobre la lignina, aunque en este caso, con la adición de tensioactivos, se están obteniendo importantes avances (Alkasrawi *et al.*, 2003).

La carga de sólidos y enzimas son las variables principales que afectan a las características económicas de la producción del bioproducto en el proceso de SFS. Un aumento de sólidos permite concentraciones de bioetanol potenciales más altas, con lo que se reduce el tamaño de los equipos, el consumo de energía en calefacción y destilación, y por tanto necesidades de agua durante el proceso (Wang *et al.*, 2011). Estudios recientes de procesos de SFS de material lignocelulósico, operando con contenidos razonablemente altos de sólidos insolubles en agua ó carga de sustrato, pueden apreciarse en las Tablas 2.7 y 2.8.

Estudios donde se varía la carga del enzima (Linde *et al.*, 2007; Eclund *et al.*, 1995) muestran una fuerte correlación positiva entre la carga del enzima y el rendimiento total de etanol. La óptima composición de la mezcla enzimática es específica del material lignocelulósico a tratar (Ghosh *et al.*, 1982). En la producción de bioproductos a través de tecnologías que impliquen hidrólisis enzimática, el coste de los enzimas se identifica como la segunda partida en los costes de operación, justo después de la materia prima, pudiendo

representar el 20% de los costes totales (Wingren *et al.*, 2005). Es por ello que se debe optimizar su gasto, aunque hay que destacar que las cargas del enzima por debajo de un determinado umbral puede dar lugar a un aumento en la duración del proceso SFS (Wingren *et al.*, 2005). Los cálculos tecnoeconómicos indican que una reducción del 50% de la carga del enzima es beneficiosa si el rendimiento disminuye menos del 6,0 – 7,0% y el tiempo de residencia requerido no se incrementa en más del 30% (Sassner *et al.*, 2008).

Tabla 2.7
PROCESOS DE HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON LEVADURAS
Experimentos de SFS realizados sobre monómeros de hexosas

Material lignocelulósico	T, °C	Levadura	Rendimiento de etanol*, %	Ref.
Paja de cebada	35,0	<i>S. cerevisiae</i>	80,0	Linde <i>et al.</i> , 2007
'Salix'	37,0	<i>S. cerevisiae</i>	76,0	Sassner <i>et al.</i> , 2006
Abeto	37,0	<i>S. cerevisiae</i>	84,0	Rudolf <i>et al.</i> , 2005
Madera de álamo amarillo	34,0	<i>Z. mobilis</i>	54,0	McMillan <i>et al.</i> , 1999
Álamo	42,0	<i>K. fragilis</i> CECT 10875	71,2	Ballesteros <i>et al.</i> , 2004
Paja de trigo	42,0	<i>K. fragilis</i> CECT 10875	62,5	Ballesteros <i>et al.</i> , 2004
Lodos de papel	40,0	<i>K. fragilis</i>	63,7	Kádár <i>et al.</i> , 2004
Mazorca de maíz	37,0	<i>S. cerevisiae</i>	39,1**	Wyman <i>et al.</i> , 1992
Rastrojo de maíz	37,0	<i>S. cerevisiae</i>	39,1**	Wyman <i>et al.</i> , 1992
Paja de trigo	37,0	<i>S. cerevisiae</i>	38,3**	Wyman <i>et al.</i> , 1992

(*) Basado en el rendimiento teórico máximo de etanol en hexosas disponibles, en la mayoría de los casos sólo D-glucosa (Olofsson *et al.*, 2008a).

(**) Valores no obtenidos directamente del artículo de referencia, sino calculados por Olofsson *et al.* (2008a).

Tabla 2.8
PROCESOS DE HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON LEVADURAS
Experimentos de SFS realizados sobre monómeros de hexosa y pentosa

Material lignocelulósico	T, °C	Levadura	Rendimiento de etanol*, %	Ref.
Paja de cebada	35	<i>S. cerevisiae</i> TMB3400	0,63	Linde, 2007
Paja de trigo	34	<i>S. cerevisiae</i> TMB3400	0,59 – 0,78	Olofsson <i>et al.</i> , 2008b
Bagazo de caña de azúcar	32	<i>S. cerevisiae</i> TMB3400	0,59	Rudolf <i>et al.</i> , 2008
Bagazo de caña de azúcar	35	<i>P. stipitis</i> CBS 6054	0,43	Rudolf <i>et al.</i> , 2008
Rastrojo de maíz	35	<i>S. cerevisiae</i> TMB3400	0,54 – 0,59	Öhgren <i>et al.</i> , 2006

(*) Basado en el rendimiento teórico máximo de etanol en hexosas y pentosas disponibles, en la mayoría de los casos D-glucosa y D-xilosa (Olofsson *et al.*, 2008a).

En resumen, las ventajas asociadas al proceso de SFS son las derivadas de la disminución de la inhibición por producto, la existencia de costes operativos limitados y la disminución de los riesgos de contaminación microbiana (Sassner *et al.*, 2008). Según lo descrito por Sun y Cheng (2002) se pueden resumir como principales ventajas las siguientes:

- Aumento de la velocidad de hidrólisis por la conversión de los azúcares causantes de la inhibición de la actividad de la celulasa (reducción de la inhibición por producto final).
- Menor requerimiento de enzima.
- Mayores rendimientos de productos.
- Menores necesidades de condiciones estériles ya que el sustrato a fermentar está continuamente convirtiéndose en bioproducto.
- Tiempos de proceso más cortos.
- Menor volumen de reactor.

Existen microorganismos etanogénicos capaces de fermentar D-xilosa; efectivamente, levaduras como *P. stipitis*, *C. shehatae*, *P. tannophilus*, *Spathaspora passalidarum*, recombinaciones de *S. cerevisiae*, así como varias recombinaciones de bacterias como *E. coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Z. mobilis*, (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Van Vleet y Jeffries, 2009; Dellomonaco *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2010; Long *et al.*, 2012). No obstante, pocas levaduras son capaces de fermentar únicamente D-xilosa (*P. stipitis*, *C. shehatae* y *P. tannophilus*). Es por ello que se investiga cepas recombinantes de *S. cerevisiae* que fermenten D-xilosa, además de D-glucosa y otras hexosas (Bao *et al.*, 1997; Kötter y Ciriacy, 1993). En su mayoría son microorganismos mesófilos que no pueden crecer y fermentar por encima de 40 – 42°C, lo que no sería compatible con un proceso de SFS.

Existen pocas investigaciones sobre levaduras termotolerantes. *K. marxianus*, es capaz de fermentar tanto D-glucosa como D-xilosa hasta una temperatura en torno a los 45°C (Singh *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2013). Dentro de las levaduras metilotróficas se encuentra *Candida boidinii*, *P. methanolica*, *Pichia pastoris* y *H. polymorpha*. Durante la investigación de diferentes aspectos del metabolismo del metanol en la levadura metilotrófica *H. polymorpha* (Moroz *et al.*, 2000), se observa que hay un gran número de cepas naturales y mutantes de esta especie. A excepción de *K. marxianus*, *H. polymorpha* es la levadura más termotolerante conocida, en definitiva, es la única levadura metilotrófica termotolerante con 37°C de temperatura óptima de crecimiento (30°C para *C. boidinii*, *P. pastoris* y *S.*

cerevisiae), y con una temperatura máxima de crecimiento de hasta 48°C (Hansen y Hollenberg, 1996; Reinders *et al.*, 1999), reduciéndose así el riesgo de contaminación a gran escala, aspecto esencial dentro del proceso de SFS.

Se ha demostrado que *H. polymorpha* es capaz de fermentar D-glucosa, celobiosa y D-xilosa a 37°C y superiores (Ryabova *et al.*, 2003; Sibirny *et al.*, 1988; Van Dijken *et al.*, 1978), así como conseguir la conversión de glicerol a etanol (Suwannarangsee *et al.*, 2010). Ciertas cepas de esta levadura pueden fermentar D-xilosa hasta una temperatura máxima de 48°C, mientras que a 50°C la fermentación se suprime fuertemente (Kurylenko *et al.*, 2014). En definitiva, se trata de un organismo prometedor para la fermentación de azúcares lignocelulósicos a altas temperaturas, compatibles con un proceso de SFS. Sin embargo, no está libre de inconvenientes: los parámetros de rendimiento en etanol y productividad son bajos cuando consume D-xilosa en el proceso. No obstante, estas características podrían mejorarse mediante la selección clásica y la ingeniería metabólica (Kurylenko *et al.*, 2014).

En una investigación previa del Grupo Bioprocesos TEP-138, se estudió la influencia del pH inicial de medio y el nivel de aeración suministrado durante la fermentación de 25 g dm⁻³ de D-xilosa con *H. polymorpha* (34438 ATCC) a 30°C (Sánchez *et al.*, 1998). En este estudio se obtuvo xilitol como bioproducto principal, siendo las condiciones más favorables un valor de pH inicial entre 4,5 y 5,5 y una aeración conseguida únicamente a partir del vórtice de agitación. En concreto, cuando el valor del pH inicial fue 5,5 se obtuvo un rendimiento global en etanol y xilitol de 0,02 y 0,61 g g⁻¹, respectivamente.

Por otra parte, Escalante *et al.* (1990b) estudiaron el efecto de la temperatura, nivel de aeración y concentración del sustrato entre otros, durante la fermentación de D-glucosa con *H. polymorpha* DSM 70277 con el objetivo de producir arabitol. Los mejores resultados (18,8 g dm⁻³ de arabitol tras 60 h de cultivo, con un rendimiento local en arabitol de 0,14 g g⁻¹) se obtuvieron durante la fermentación en un biorreactor discontinuo, a 45°C, pH = 4,8, 1000 rpm, introduciendo aire esterilizado (1,0 v/v/min), y con una concentración inicial de D-glucosa nunca superior a 30 g dm⁻³. Ningún otro polialcohol se detectó en esta investigación.

En la revisión bibliográfica realizada, apenas se han encontrado estudios sobre la capacidad fermentativa de *H. polymorpha* sobre D y L-arabinosa. Así mismo, no se ha encontrado estudios ó trabajos que hagan referencia al proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea de pretratado lignocelulósico con *H. polymorpha*. Este hecho justifica este estudio de investigación.

2.8 BIBLIOGRAFÍA

- Alexander M.A., Yang V.W., Jeffries T.W. (1988). Levels of pentose phosphate pathway enzymes from *Candida shehatae* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **29**, 282-288.
- Alkasrawi M., Eriksson T., Börjesson J., Wingren A., Galbe M., Tjerneld F., Zacchi G. (2003). The effect of Tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology* **33**, 71-78.
- Amin G., Van den Eynde E., Verachtert H. (1983). Determination of by-products formed during the ethanolic fermentation, using batch and immobilized cell systems for *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces bayanus*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **18**,1-5.
- Balasubramanian N., Kim J.S., Lee Y.Y. (2001). Fermentation of xylose into acetic acid by *Clostridium thermoaceticum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **91-93**, 1-10.
- Ballesteros I., Ballesteros M., Cabanas A., Carrasco J., Martin C., Negro M.J., Saez F., Saez R. (1991). Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **28-29**, 307-316.
- Ballesteros M., Oliva J.M., Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros I. (2004). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry* **39**, 1843-1848.
- Bao X., Gao D., Qu Y., Wang Z., Walfridson M., Hahn-Hägerdal B. (1997). Effect on product formation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing different levels of xylose metabolic genes. *Chinese Journal of Biotechnology* **13**(4), 225-231.
- Bichio P.A., Runnals P.L., Cunningham J.D., Lee H. (1988). Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on mixed sugars. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 50-54.
- Bravo V., Camacho F., Sánchez S., Moya A.J., Castro E. (1990). Influencia del pH y de la aireación en la fermentación de xilosa con *Hansenula polymorpha*. III Congreso Nacional de Biotecnología, Murcia.

- Bruinenberg P.M., de Bot P.H.M., van Dijken J.P., Scheffers W.A. (1983). The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **18**, 287-292.
- Camacho F., González P., Jurado E., Robles A. (1985a). Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa. I. Efecto sinérgico de endo y exo celulasas. *Anales de la Química* **83**, 78-82.
- Camacho F., González P., Jurado E., Robles A. (1985b). Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa. II. Modelo de dos reacciones en serie con inhibición competitiva por producto. *Anales de la Química* **83**, 83-90.
- Camacho F., González P., Jurado E., Páez-Dueñas M.P. (1985c). Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos. Parte I. *Ingeniería Química* **17**(200), 297-301.
- Camacho F., González P., Jurado E., Páez Dueñas M.P. (1986). Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos. Parte II. *Ingeniería Química* **18**(203), 117-123.
- Cao N-J., Tang R., Gong C.S., Chen L.F. (1994). The effect of cell density on the production of xylitol from D-xylose by yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **45-46**, 515-519.
- Caparrós S. (2007). Fraccionamiento integral de vegetales no alimentarios para la obtención de pasta celulósica y subproductos. Tesis doctoral. Universidad de Huelva, Huelva.
- Carreira L.H. Wiegel J., Ljungdahl L.G. (1983). Production of ethanol from biopolymers by anaerobic thermophilic and extreme thermophilic bacteria: I. Regulation of carbohydrate utilization in mutants of *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* **13**, 183-191.
- Chen H., Jin S. (2006). Effect of ethanol and yeast on cellulase activity and hydrolysis of crystalline cellulose *Enzyme and Microbial Technology* **39** (7), 1430-1432.
- Chiang L.C., Gong C.S., Chen L.F., Tsao G.T. (1981). D-Xylulose fermentation to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **42**, 284-289.
- Chiaramonti D., Rizzo A.M., Prussi M., Tedeschi S., Zimbardi F., Braccio G., Viola E., Taddei Pardelli P. (2011). 2nd generation lignocellulosic ethanol: is torrefaction a possible approach to biomass pretreatment?. *Biomass Conversion and Biorefinery* **1**, 9-15.

- Converse A.O., Kwartneg I.K., Grethlein H.E., Ooshima H. (1989). Kinetics of thermochemical pretreatment of lignocellulosic materials. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **20-21**, 63-78
- Cruz J.M., Dominguez H., Parajó J.C. (2002). Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion into xylitol. *Food Biotechnology* **14**, 79-97.
- Cunha M.A.A.D., Converti A., Santos J.C.D, da Silva S.S. (2006). Yeast immobilization in Lentikats: a new strategy for xylitol bioproduction from sugarcane bagasse. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **22**, 65-72.
- Dale B.E., Henk LL, Shiang M. (1984). Fermentation of lignocellulosic material treated by ammonia freeze-explosion. *Developments in Industrial Microbiology* **26**, 223-233.
- Da Silva S.S., Afschar A.S. (1994). Microbial production of xylitol from D-xylose using *Candida tropicalis*. *Bioprocess Engineering* **11**, 129-134.
- Da Silva S.S., Quesada-Chanto A., Vitolo M. (1997). Upstream parameters affecting the cell growth and xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Zeitschrift fur Naturforschung* **52c**, 359-363.
- Delgenes J. P., Moletta R., Navarro J. M. (1988). Fermentation of D-xylose, D-glucose, L-arabinose mixture by *Pichia stipitis* Y-7124: sugar tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology* **29**, 155-161.
- Dellomonaco C., Fava F., Gonzalez R. (2010). The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. *Microbial Cell Factories* **9**(3), 1-15.
- Dien B.S., Cotta M.A., Jeffries T.W. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**, 258-266.
- Dien B.S, Kurtzman CP, Saha BC, Bothast RJ (1996) Screening for L-arabinose fermenting yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **57-58**, 233-242.
- Dien B.S., Nichols N.N., Bothast R.J. (2002). Fermentation of sugar mixtures using *Escherichia coli* catabolite repression mutants engineered for production of L-lactic acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **29**(5), 221-227.
- Domínguez J.M., Gong C.S., Tsao G.T. (1996) Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **57-58**, 49-56.

- Du Preez J.C. (1994). Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microbial Technology* **16**, 944-956.
- Du Preez J.C., Prior B.A., Monteiro A.M.T. (1984). The effect of aeration on xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pachysolen tannophilus*: a comparative study. *Applied Microbiology and Biotechnology* **19**, 261-266.
- Du Preez J.C., Bosch M., Prior B.A. (1986). Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. *Enzyme and Microbial Technology* **8**, 360-364.
- Duarte L.C., Carvalheiro F., Neves I., Girio F.M. (2005). Effects of aliphatic acids, furfural and phenolic compounds on *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **121**, 413-425.
- Duff S.J.B., Murray W.D. (1996). Bioconversion for forest products industry waste cellulose to ethanol: a review. *Bioresource Technology* **55**, 1-33.
- Eken-Saraçoglu N., Ferda Mutlu S., Dilmaç G., Çavusoglu H. (1998). A comparative kinetic study of acidic hemicelluloses hydrolysis in corn cob and sunflower seed hull. *Bioresource Technology* **65**, 29-33.
- Eklund R., Galbe M., Zacchi G. (1995). The influence of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of willow prior to steam pretreatment. *Bioresource Technology* **52**(3), 225-229.
- Escalante J., Caminal G., de Mas C. (1990a) Biomass production by thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*" *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **48**, 61-70.
- Escalante J., Caminal G., Figueredo M., de Mas C. (1990b). Production of arabitol from glucose by *Hansenula polymorpha*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **70**(4), 228-231.
- 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. *Bioresource Technology* **59**, 129-136.
- ESYRCE (2017). Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos, Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente.
- Felipe M.G.A., Vieira D.C., Titolo M., da Silva S.S., Roberto I.C., Mancilha I.M. (1996). Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. *Journal of Basic Microbiology* **35**(3), 171-177.

- Fengel D., Wegener G. (1984). Wood: chemistry, ultrastructure, reactions, De Gruyter, Berlin.
- Fernández J. (1980). La agricultura como productora de energía. *Ingeniería Química* **12**(140), 23-32.
- Galbe M., Zacchi G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**, 618-628.
- García J.F., Cuevas M., Bravo V., Sánchez S. (2010a). Ethanol production from olive prunings by autohydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*. *Renewable Energy* **35**, 1602-1608.
- García J.F., Sánchez S., Bravo V., Cuevas M. (2010b). Autohidrólisis y post-hidrólisis ácida del residuo de poda de olivo. *Afinidad* **67**(548), 14-19.
- Gare F. (2003). The Sweet Miracle of Xylitol: The all-natural sugar substitute approved by the FDA as a food additive, Basic Health Publications, California.
- Garrote G., Domínguez H., Parajó J. (1999). Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz als Roh und Werkst* **57**(3), 191-202.
- Gauss W.F., Suzuki S., Takagi M. (1976). En: Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments, Office USPTO, Vol. 3990944. Estados Unidos, Bio Research Center Company Limited.
- Ghosh P., Pamment N.B., Martin W.R.B. (1982). Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose: Effect of beta-D-glucosidase activity and ethanol inhibition of cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* **4**, 425-430.
- Ghose T.K., Tyagi R.D. (1979) Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotechnology and Bioengineering* **21**, 1401-1420.
- Gong C.S., Chen L.F., Flickinger M.C., Chiang L.C., Tsao G.T. (1981a). Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* **41**(2), 430-436.
- Gong C.S., Chen L.F., Tsao G.T. (1981b). Quantitative production of xylitol from D-xylose by a high xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2. *Biotechnology Letters* **3**, 130-135.

- Gong C.S., Claypool T.A., McCracken L.D., Maun C.M., Ueng P.P., Tsao G.T. (1983). Conversion of pentoses by yeasts. *Biotechnology and Bioengineering* **25**, 85-102.
- Bustos G., Ramírez J.A., Garrote G., Vázquez M. (2003). Modeling of the hydrolysis of sugar cane bagasse with hydrochloric acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **104** (1), 51-68.
- Guarnizo A., Martínez P., Valencia H. (2009). Pretratamientos de la celulosa y biomasa para la sacarificación. *Scientia et Technia* **42**(15), 284-289.
- Hahn-Hägerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M.F., Lidén G., Zacchi G. (2006). Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*. **24**(12), 549-556.
- Hahn-Hägerdal B., Jeppsson H., Skoog K., Prior B.A. (1994). Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology* **16**(11), 933-943.
- Hansen H., Hollenberg C.P. (1996). *Hansenula polymorpha*. En: Non-conventional yeasts in Biotechnology, Wolf K. (Ed.), Springer, Berlin, pp. 293-311.
- Hsu T.A. (1996). Pretreatment of biomass. En: Handbook on bioethanol: production and utilization, Wyman C.E. (Ed.), Taylor and Francis, Washington, D.C., pp.179-212.
- Ingram J.M., Wood W.A. (1965). Enzymatic basis for D-arabitol production by *Saccharomyces rouxii*. *Journal of Bacteriology* **89**, 1186-1194.
- Jeffries T.W. (1981a). Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis*. *Biotechnology Letters* **3**, 213-218.
- Jeffries, T.W. (1981b). Fermentation of xylulose to ethanol using xylose isomerase and yeast. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*. **11**, 315-324.
- Jeffries T.W. (1990). Fermentation of D-xylose and Cellobiose. En: Yeast Biotechnology and Biocatalysis, Verachert, H., De Mot, R. (Eds.), Marcel Dekker, Nueva York, pp. 349-394.
- Jeffries T.W., Jin Y.S. (2000). Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. *Advances in Applied Microbiology* **47**, 221–268.
- Jeffries T.W., Jin Y.S. (2004). Metabolic Engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**, 495-509.

- Jeffries T.W., Kurtzman C.P. (1994). Strain selection, taxonomy, and genetics of xylose fermenting yeasts. *Enzyme and Microbial Technology* **16**, 922–932.
- Jiménez L., López F., Sánchez I. (1990) Caracterización de residuos de la tala del olivo para la obtención de pastas celulósicas. *El papel Julio-Agosto*, 57-61.
- 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*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **49**, 691-697.
- Kamakura M., Kaetsu I. (1982) Radiation degradation and the subsequent enzymatic hydrolysis of waste papers. *Biotechnology and Bioengineering* **24**(4), 991-997.
- Kádár Z., Szengyel Z., Ráczey K. (2004). Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products* **20**(1), 103-111.
- Kim J.W., Barrington S., Sheppard J., Lee B.H. (2006). Optimization for the production of citric acid by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown on peatmoss enriched with glucose. *Process Biochemistry* **41**, 1253-1260.
- Kötter P., Ciriacy M. (1993). Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **38**, 776-783.
- Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J., Stroeve P. (2009). Methods of pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research* **48**, 3713-3729.
- Kurylenko O.O., Ruchala J., Hryniv O.B., Abbas C.A., Dmytruk K.V., Sibirny A.A. (2014). Metabolic engineering and classical selection of the methylotrophic thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* for improvement of high-temperature xylose alcoholic fermentation. *Microbial Cell Factories* **13**, 122-132.
- Laplace J.M., Delgenes J.P., Moletta R. Navarro J.M. (1991). Alcoholic fermentation of glucose and xylose by *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*: oxygen requirement as a key factor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **36**, 158-162.
- Larsson S., Reimann A., Nilvebrant N.O., Jönsson L.J. (1999). Comparison of different methods for detoxification of lignocellulosic hydrolysates of spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **77-79**, 91-103.

- Lee H., Sopher C. R., Yau, K.Y.F. (1996), Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities on mixed sugars in *Candida guilliermondii*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **66**, 375-379.
- Ligthelm, M E Prior B A., du Preez J C (1988). The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology* **28**, 63-68.
- Linde M. (2007). Process development of bioethanol production from wheat and barley residues steam pretreatment and SSF. Tesis Doctoral, Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Lund (Suecia).
- Linde M., Galbe M., Zacchi G. (2007). Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 1100-1107.
- Lohmeier-Vogel E.M., Hahn Hägerdal B., Vogel H.J. (1995). Phosphorus-31 and carbon - 13 nuclear magnetic resonance studies of glucose and xylose metabolism in *Candida tropicalis* cell suspensión. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1414-1419.
- Long T.M., Su Y.K., Headman J., Higbee A., Willis L.B., Jeffries T.W. (2012). Cofermentation of glucose, xylose and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Applied and Environmental Microbiology* **78**(16), 5492-5500.
- Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnololly. *Microbiology and Molecular Biotechnology Reviews* **66**, 506-577.
- McGinnis G.D., Wilson W.W., Mullen C.E. (1983). Biomass pretreatment with water and highpressure oxygen. The wet-oxidation process. *Industrial and Engineering Chemistry Product Research Development* **22**, 352-357.
- McMillan J.D. (1994). Pretreatment of lignocellulosic biomass. En: *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, Himmel M.E., Baker J.O., Overend R.P. (Eds.), American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 292-324.
- McMillan J.D. (1996). Hemicellulose conversion to ethanol. En: *Handbook on bioethanol: production and utilization*, Wyman (Ed.), Taylor and Francis, Washington, **13** pp. 287-313.
- McMillan J.D., Newman M.M., Templeton D.W., Mohagheghi A. (1999). Simultaneous saccharification and cofermentation of dilute-acid pretreated yellow poplar hardwood to

- ethanol using xylose-fermenting *Zymomonas mobilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **79**(1-3), 649-665.
- Mes-Hartree M., Dale B.E., Craig W.K. (1988). Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology* **29**(5), 462-468.
 - Meyrial V., Delgenes J.P., Moletta R., Navarro J.M. (1991). Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*: fermentation behaviour. *Biotechnology Letters* **11**, 281-286.
 - Millati R., Niklasson C., Taherzadeh M.J. (2002). Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry* **38**, 515-522.
 - Millet M.A., Baker A.J., Scatter L.D. (1976). Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. En: *Biotechnology and bioengineering symposium n° 6*, 8-10 September 1975, Newton and Natick, Massachusetts (USA). Wiley, Nueva York y Toronto, pp.125-153.
 - Moiser N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzapple M., Ladisch M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology* **96**, 673-686.
 - Moroz O.M., Gonchar M.V., Sibirny A.A. (2000). Efficient bioconversion of ethanol to acetaldehyde using a novel mutant strain of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology and Bioengineering* **68**, 44-51.
 - Mussatto S.I., Roberto I.C. (2004). Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology* **93**, 1-10.
 - Nigam P., Singh D. (1995). Processes of fermentative production of xylitol-a sugar substitute. *Process Biochemistry* **30**, 117-124.
 - Nobre A., Duarte L.C., Roseiro J.C., Girio F.M. (2002). A physiological and enzymatic study of *Debaryomyces hansenii* growth on xylose- and oxygen-limited chemostats. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**, 509-516.
 - Ogier J.C., Ballerini J.P., Leygue J.P., Rigal L., Pourquié J. (1999). Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. *Oil and Gas Science and Technology* **54**(1), 67-94.

- Öhgren K., Bengtsson O., Gorwa-Grauslund M.F., Galbe M., Hahn-Hägerdal B., Zacchi G. (2006). Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology* **126**(4), 488-498.
- Olofsson K., Bertilsson M., Lidén G. (2008a). A short review on SSF – An interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels* **1**, 1-14.
- Olofsson K., Rudolf A., Lidén G. (2008b). Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* **134**(1-2), 112-120.
- Olsson L., Hahn-Hägerdal B. (1993). Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulosic hydrolysates. *Process Biochemistry* **28**, 249-257.
- Olsson L., Hahn-Hägerdal B. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology* **18**, 312-331.
- Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Szengyel Z., Zacchi G., Réczey K. (1997). Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicelluloses hydrolysates obtained after steam pretreatment. *Enzyme and Microbial Technology* **20**, 286-293.
- Palmqvist E., Meinander N.Q., Grage H., Hahn-Hägerdal B. (1999). Main interaction effects of acetic acid, furfural and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnology and Bioengineering* **63**, 46-55.
- Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000a). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxication. *Bioresource Technology* **74**, 17-24.
- Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000b). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* **74**, 25-33.
- Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M. (1996). Production of xylitol from concentrated wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii*: effect of the initial cell concentration. *Biotechnology Letters* **18**(5), 593-598.
- Parisi F. (1989). Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilisation of the hydrolysates. *Advanced Biochemistry engineering* **38**, 53-87.

- Park C.Y., Ruy Y.W., Kim C. (2001). Kinetics and rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in supercritical carbon dioxide. *Korean Journal of Chemical Engineering* **18**(4), 475-478.
- Pastor M., Humanes J. (1989). Poda del olivo, moderna olivicultura. Editorial Agrícola Española S.A., Consejería de Agricultura y Pesca.
- Pepper T., Olinger P.M. (1988). Xylitol in sugar-free confections. *Food Technology* **42**(10), 98-106.
- Pfeifer M.J., da Silva S.S., Felipe M.G.A., Roberto I.C., Mancilha I.M. (1996). Effect of culture conditions on xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **57-58**, 423-430.
- Pourquoié J., Vandecasteele J.P. (1993). Conversion de la biomasse lignocellulosique par hydrolyse enzymatique et fermentation. *Biotechnologie*, René Scriban, (4^o Ed.), París, pp. 677-700.
- Reinders A., Romano I., Wiemken A., De Virgilio C. (1999). The thermophilic yeast *Hansenula polymorpha* does not require trehalose synthesis for growth at high temperatures but does for normal acquisition of thermotolerance. *Journal of Bacteriology* **181**(15), 4665–4668.
- Richard P., Putkonen M., Väänänen R., Londesborough J., Penttilä M. (2002). The missing link in the fungal L-arabinose catabolic pathway, identification of the L-xylulose reductase gene. *Biochemistry* **41**(20), 6432–6437.
- Roberto I.C., Sato S., de Mancilha I.M. (1996). Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology* **16**, 348-350.
- Rodríguez A, Rosal A, Jimenez L. (2010). Biorefinery of agricultural residues by fractionation of their components through hydrothermal and organosolv processes. *Afinidad* **67**(545), 14-19.
- Rodríguez-Chong A., Ramírez J.A. Garrote G., Vázquez M. (2004). Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. *Journal of Food Engineering* **61**(2), 143-152.
- Roseiro J.C., Peito M.A., Girio F.M., Amaral-Collaço M.T. (1991). The effects of oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii*. *Archives of Microbiology* **156**, 484-490.

- Rudolf A., Alkasrawi M., Zacchi G., Lidén G. (2005). A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme and Microbial Technology* **37**,195-204.
- Rudolf A., Baudel H., Zacchi G., Hahn-Hägerdal B., Lidén G. (2008). Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. *Biotechnology and Bioengineering* **99**(4) 783-790.
- Ryabova O.B., Chmil O.M., Sibirny A.A. (2003). Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast Research* **4**(2), 157-164.
- Saddler J.N., Ramos L.P., Breuil C. (1993). Steam pretreatment of lignocellulosic residues. En: Bioconversion of forest and agricultural plan residues. Saddler J.N. (Ed.), Wallingford, **3**, pp. 73-91.
- Saha B.C., Bothast R.J. (1999) Production of 2,3-butanediol by a new isolated *Enterobacter cloacae*". *Applied Microbiology and Biotechnology* **52** (3), 321-326.
- Saha B.C., Sakakibara Y., Cotta M.A. (2007). Production of D-arabitol by a newly isolated *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **34**, 519-523.
- Sánchez C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* **27**,185-194.
- Sánchez P. (1990). Procédé de production de sirop de xylose par hydrolyse acide de sorgho. Tesis Doctoral. Instituto Politécnico National de Toulouse (Francia).
- Sánchez S., Bravo V., Castro E., Moya A.J., Camacho F. (1997). The influence of pH and aeration rate on the fermentation of D-xylose by *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology* **21**,355-360.
- Sánchez S., Bravo V., Castro E., Moya A.J., Camacho F. (1998). The production of xylitol from D-xylose by fermentation with *Hansenula polymorpha*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **50**, 608–611.
- Sánchez S., Bravo V., Castro E., Moya A.J., Camacho F. (2002a). The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xilose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **77**, 641-648.

- Sanchez S., Bravo V., García J.F., Cruz N., Cuevas M. (2007). Fermentation of D-glucose and D-xylose mixtures by *Candida tropicalis* NBRC 0618 for xylitol production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**, 709-716.
- Sanchez S., Bravo V., Moya A.J., Castro E., Camacho F. (2004). Influence of temperatura on fermentation of D-xylose by *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol and xylitol. *Process Biochemistry* **39**, 673-679.
- Sánchez S., Bravo V., Moya A.J., Moya M., Romero I., Torrero R., San Miguel M.P. (2002b). Aprovechamiento del residuo de poda del olivar. *Ingeniería química* **391**, 194-202.
- Sassner P., Galbe M., Zacchi G. (2006). Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated Salix at high dry-matter content. *Enzyme and Microbial Technology* **39**(4), 756-762.
- Sassner P., Galbe M., Zacchi G. (2008). Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy* **32**(5), 422-430.
- Schneider H. (1989). Conversion of pentoses to ethanol by yeasts and fungi. *CRC. Critical Reviews in Biotechnology* **9**, 1-40 (1989).
- Schneider H., Wang P.Y., Chan Y.K., Maleszka R. (1981). Conversion of D-xilose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnology Letters* **3**, 89-92.
- Sibirny A.A., Titorenko V.I., Gonchar M.V., Ubiyvovk V.M., Ksheminskaya G.P., Vitvitskaya O.P. (1988). Genetic control of methanol utilization in yeasts. *Journal Basic of Microbiology* **28**, 293-319.
- Singh D., Nigam P., Banat, I.M., Marchant R., McHale A.P. (1998). Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations. Part II: Use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**, 823-834.
- Skoog K., Hahn-Hägerdal B. (1988). Xylose Fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* **10**(2), 66-80.
- Skoog K. (1992). The influence of oxygen in pentose fermentation by yeasts. Tesis doctoral. Universidad de Lund, Suecia.

- Soumalainen H., Oura E. (1971). Yeast nutrition and solute uptake. En: The Yeast, Vol. 2, The Physiology and Biochemistry of yeast, Rose A.H., Harrison J.S. (Eds.), Academic Press, Londres, pp. 3-74.
- Spencer J.F.T., Ragout de Spencer A.L., Lalouche C. (2002). Non-conventional yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**(2), 147-156.
- Splinder D.D., Wyman C.E., Mohagheghi A., Grohmann K. (1988). Thermotolerant yeast for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **17**, 279-293.
- Sreenath H.K., Jeffries T.W. (1996). Effect of corn steep liquor on fermentation of mixed sugars by *Candida shehatae* FPL-702. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **57**, 551-561.
- Strathern J.N., Jones E.W., Broach J.R. (1982). The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Metabolism and gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, pp. 1-37.
- Suihko M.L., Drazic M. (1983). Pentose fermentation by yeasts. *Biotechnology Letters* **5**, 107-112.
- Sun Y., Cheng J. (2002). Hydrolysis of lingocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technology* **83**, 1-11.
- Suwannarangsee S., Oh D.B., Seo J.W., Kim C.H., Rhee S.K., Kang H.A., Chulalaksananukul W., Kwon O. (2010). Characterization of alcohol dehydrogenase 1 of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **88**(2):497-507.
- Suzuki S., Sugiyama M., Mihara Y., Hashiguchi K., Yokozeki K. (2002). Novel enzymatic method for the production of xylitol from D-arabitol by *Gluconobacter oxydans*. *Bioscience, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **66**, 2614-2620.
- Swings J., de Ley J. (1977). The biology of zymomonas. *Bacteriology Reviews* **41**, 1-46.
- Tada K., Horiuchi J.I., Kanno T., Kobayashi M. (2004). Microbial xylitol production from corn cobs using *Candida magnolia*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **98** (3) 228-230.

- Tengborg C., Galbe M., Zacchi G. (2008). Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Biotechnology Progress* **17**, 110-117.
- Thring R.W., Chornet E., Overend R. (1990). Recovery of a solvolytic lignin: effects of spent liquor/acid volume ration, acid concentration and temperature. *Biomass* **23**, 289-305.
- Uhari M., Kontiokari T., Niemelä M. (1998). A novel use of xilitol sugar in preventing acute otitis media. *Pediatrics* **102**(4), 879-984.
- Van Dijken J.P., Harder W., Beardsmore A.J., Quayle R.R. (1978). Dihydroxyacetone: an intermediate in the assimilation of methanol by yeasts. *Microbiology Letters* **4**, 97-102.
- Van Soest P.J., Wine R.H. (1967). Use of detergents in the análisis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Agricultural Chemists* **50**, 50-55.
- Van Vleet J.H., Jeffries T.W. (2009). Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. *Current Opinion in Biotechnology* **20**(3), 300-306.
- Vandeska E., Amartey S., Kuzmanova S., Jeffries T.W. (1995a). Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**, 213-218.
- Vandeska E., Amartey S., Kuzmanova S., Jeffrie T.W. (1996): Fed-batch culture for xylitol production by *Candida boidinii*. *Process Biochemistry* **31**, 265-270.
- Vandeska E., Kuzmanova S., Jeffries T.W. (1995b). Xylitol formation and key enzyme activities in *Candida boidinii* under different oxygen transfer rates. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **80**, 513-516.
- Verho R., Putkonen M., Londesborough J., Penttilä M., Richard P. (2004). A novel NADH-linked L-xylulose reductase in the L-arabinose catabolic pathway of yeast. *The Journal Biological Chemistry* **279**(15), 14746-14751.
- Villarreal M.L.M., Prata A.M.R., Felipe M.G.A., Almeida e Silva J.B. (2006). Detoxification procedures of eucalyptus hemicelluloses hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 17-24.

- Wang V.W., Jeffries T.W. (1990). Purification and properties of xylitol dehydrogenase from the xylose-fermenting *Candida shehatae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **26**(2), 197–206.
- Wang W., Kang L., Wei H., Arora R., Lee Y.Y. (2011). Study on the decreased sugar yield in enzymatic hydrolysis of cellulosic substrate at high solid loading. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **164**, 1139–1149.
- Watson N.E., Prior B.A., du Preez J.C. Lategan P.M. (1984). Oxygen requirements for D-xylose fermentation to ethanol and polyols by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme and Microbial Technology* **6**, 447-450.
- Weber C., Farwick A., Benisch F., Brat D., Dietz H., Subtil T., Boles E. (2010). Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**(4), 1303-1315.
- Weil J., Westgate P.J., Kolhmann K., Ladisch M.R. (1994). Cellulose pretreatment of lignocellulosic substrates. *Enzyme and Microbial Technology* **16**, 1002-1004.
- Wiegel J., Ljungdahl L.G. (1986). The importance of thermophilic bacteria in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology* **3**, 39-107.
- Wingren A., Galbe M., Roslander C., Rudolf A., Zacchi G. (2005). Effect of reduction in yeast and enzyme concentrations in a simultaneous-saccharification-and fermentation–based bioethanol process: technical and economic evaluation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **121-124**, 485-499.
- Wingren A., Galbe M., Zacchi G. (2003). Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress* **19**(4), 1109-17.
- Winkelhausen E., Kuzmanova S. (1998). Review: Microbial conversion of D-xylose to xylitol. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **86**, 1-14.
- Wyman C.E., Spindler D.D., Grohmann K. (1992). Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. *Biomass and Bioenergy*. **3**(5), 301-307.
- Xu F., Liu C.F., Geng Z.C., Sun J.X., Sun R.C., Hei B.H., Lin L., Wu S.B., Je J. (2006). Characterisation of degraded organosolv hemicelluloses from wheat straw. *Polymer Degradation and Stability* **91**(8), 1880-1886.

- Xu J., Taylor K.B. (1993). Characterization of ethanol production from xylose and xylitol by cell-free *Pachysolen tannophilus* system. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 231-235.
- Yahashi Y., Horitsu H., Kawai K., Suzuki T., Takamizawa K. (1996). Production of xilitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-glucose feeding. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **81**(2), 148-152.
- Zhang B., Li L., Zhang J., Gao X., Wang D., Hong J. (2013). Improving ethanol and xylitol fermentation at elevated temperature through substitution of xylose reductase in *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **40**(3-4), 305-316.
- Zheng Y., Lin H.M., When J., Cao N., Yu X., Tsao G.T. (1995). Supercritical carbon dioxide explosion as a pretreatment for cellulose hydrolysis. *Biotechnology Letters* **17**(8), 845-850.
- Zhu H.Y., Xu H., Dai X.Y., Zhang Y., Ying H.J., Ouyang P.K. (2010). Production of D-arabitol by a newly isolated *Kodamaea ohmeri*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **33**(5), 565-571.

3

MATERIALES Y

MÉTODOS

3.1 REACTIVOS QUÍMICOS Y OTROS PRODUCTOS UTILIZADOS

3.1.1 Compuestos químico

- Acetona, CH_3COCH_3 , >99,5%, Sigma Aldrich.
- Ácido cafeico, $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$, Sigma.
- Ácido cítrico, hidratado, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, PA, 99,5%, Sigma-Aldrich.
- Ácido clorhídrico, HCl , 37%, PRS-CODEX, Panreac.
- Ácido etilendiaminotetracético sal disódica dihidratada $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99%, PA, Panreac.
- Ácido fórmico, CH_2O_2 , 98 – 100%, Merck.
- Ácido sulfúrico, H_2SO_4 , 96%, PA, Panreac.
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico, $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_7$, Sigma.
- Agua ultrapura, resistividad 18,2 $\text{M}\Omega\text{-cm}$.
- D(-)-arabinosa, $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$, >99%, calidad HPLC, Fluka.
- D(+)-arabitol, $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$, 99%, Alfa Aesar.
- D(-)-fructosa, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, $\geq 98\%$, Fluka.
- D(+)-galactosa, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, $\geq 98\%$, Sigma- Aldrich.
- D(+)-glucosa, anhidra, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, PA-ACS, Panreac.
- D(+)-manosa, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, $\geq 99\%$, Fluka.
- D(+)-xilosa anhidra, $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$, P.R.S., PRS-CODEX, Panreac.
- Carbonato sódico, anhidro, Na_2CO_3 , PA-ACS-ISO, Panreac.
- Carbonato sódico, anhidro, Na_2CO_3 , EPQ, Panreac.
- Citrato sódico, hidratado, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99%, PA, Panreac.
- Etanol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, 96%, PRS, Panreac.
- Etanol absoluto, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, PA, Panreac.
- Etilenglicol, $\text{CH}_2\text{OHCH}_2\text{OH}$, PA, Panreac.
- Fenol, $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, PA, Carlo Erba.

- Fosfato diácido de potasio, KH_2PO_4 , > 99%, PA-ACS, Panreac.
- Hexadeciltrimetilamonio bromuro, $(\text{C}_{16}\text{H}_{33})\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$, > 99%, Acros Organic.
- Lauril sulfato sódico, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SNa}$, 95%, Sigma.
- L(+)-arabinosa, $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$, >99%, calidad HPLC, Fluka.
- Metanol, CH_4O , $\geq 99.9\%$, para HPLC, Chromasolv, Honey Riedel-de Haën.
- n-hexano, C_6H_{14} , > 95%, ultra resi-analyzed, J. T. Baker.
- Peptona de caseína, Merck.
- Potasio hidróxido, KOH, 85% (lentejas), PA, Panreac.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu, Panreac.
- Reactivo enzimático para determinación de ácido acético, cat. nº 10148261035, Böehringer Mannheim/R-biopharm.
- Reactivo enzimático para determinación de etanol, cat. nº 10176290035, Böehringer Mannheim/R-biopharm.
- Reactivo enzimático para determinación de xilitol, cat. nº 10670057035, Böehringer Mannheim/R-biopharm.
- Sodio fosfato monoácido, hidratado, PA, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Panreac.
- Sodio hidróxido, disolución 50%, calidad HPLC, J.T. Baker.
- Sodio hidróxido, NaOH, 98%, PA, Panreac.
- Sodio tetraborato, hidratado, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, PRS-CODEX, Panreac.
- Sodio y potasio tartrato, hidratado, $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, >99%, Fluka.
- Sulfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, > 99%, PA-ACS-ISO, Panreac.
- Sulfato de magnesio, hidratado, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, PA-ACS, Panreac.
- Sulfito sódico anhidro, Na_2SO_3 , >98%, PA, Panreac.
- Xilitol, $\text{C}_5\text{O}_5\text{H}_{12}$, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich.
- 1-Pentanol, $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}$, >99%, Sigma- Aldrich.
- 4-nitrofenil β -D-glucopiranoside $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_8$, > 98%, Sigma- Aldrich.
- 4-Nitrofenol, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$, >99,5%, Fluka.

3.1.2 Otros productos

- Agar-agar, PRS-Codex, Panreac.
- Algodón hidrófilo, Tegosa.
- Cartucho de relleno C-18, Sep-Pac C18, 12 cc Vac Cartridge, 2g per cartridge, 55 – 105 μm particle size, 20/pk, Waters (Ref. wat 036915).
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, Hellma.
- Cubetas macro y micro de 1 cm de paso óptico, desechables, Kartell.
- Disolución electrolítica, Crisolyt, KCl 3M, Crison.
- Disolución tampón pH 4,01, cat nº 23-110-02, Crison.
- Disolución tampón pH 7,00, cat nº 23-111-02, Crison.
- Extracto de levadura, Becton Dickinson Co.
- Extracto de malta, Merck.
- Filtro de membrana de acetato de celulosa, 47 mm de diámetro y poro de 0,20 μm , Sartorius.
- Filtro de membrana de nitrato de celulosa, 47 mm de diámetro, y tamaño de poro 0,45 μm , Sartorius.
- Gasa esterilizada, Ada.
- Gomas de silicona de diferentes diámetros.
- Lana de vidrio lavada, QP, Panreac.
- Prefiltro de fibra de vidrio, 47 mm de diámetro, Sartorius.

3.2 ORIGEN Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

El material de poda de olivar en el que se ha centrado esta investigación procede de árboles de la variedad 'Picual' de una finca situada en el término municipal de Arjonilla (Jaén), 37° 58' 34,32'' de latitud norte y 4° 6' 43,091'' de longitud oeste.

3.2.1 Recogida del material de poda

En el propio campo se llevó a cabo la separación entre ramas gruesas y ramón para posteriormente, proceder al acondicionamiento de este último mediante su picado con una máquina de la firma Pimasur S.L (Montilla, Córdoba). A continuación, se separó el ramón propiamente dicho de la hoja mediante una mesa densimétrica a escala industrial, propiedad de la empresa Dragados y Construciones S.A. Para esta investigación el material de poda que interesa es el ramón exento de hoja, subproducto que se obtiene de árboles adultos o bien la fracción de formación que es la que se realiza durante los primeros años de las plantas, conjunto al que posteriormente se le separó la hoja.

3.2.2 Recepción, acondicionamiento y almacenamiento

Este material de poda obtenido ha sido recibido en las dependencias del laboratorio de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén, donde se ha mantenido durante un tiempo prolongado dentro de cajas adecuadas asegurando su perfecta aireación, salvaguardándose del exterior, radiación solar, y humedades; en definitiva, secándose a temperatura ambiente dentro del laboratorio.

Una vez alcanza la humedad de equilibrio, este material está en condiciones de pasar por la etapa de trituración. Para la molturación se utilizó un molino de cuchillas Retsch, Mod. SM1 (Fig. 3.1), el cual dispone de granulometría final seleccionable mediante tamices de fondo de acero inoxidable con aberturas de 0,25 – 20 mm. En este caso se ha usado la criba de 1,5 mm, Fig. 3.2. En los tamices con una abertura de malla de hasta 2 mm ésta es de tipo trapezoidal, y a partir de 4 mm es cuadrada. El tamiz de fondo se selecciona según el material alimentado y la granulometría final deseada, dependiendo si es una primera trituración ramón ó se trate de subproducto ya molturado.



Figura 3.1 Molino de cuchillas Retsch, Mod. M1.

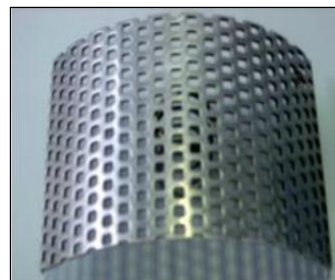


Figura 3.2 Detalle del tamiz de 20 mm de abertura de malla.

Es obvio pensar que, como resultado de la molturación, el material va a estar caracterizado por una amplia variedad de tamaños de partícula. Ésta será una variable que influirá significativamente en el desarrollo de los tratamientos aplicables al subproducto. Es por tanto de gran importancia que las muestras tengan un tamaño lo más uniforme posible con el fin de evitar diferencias durante los diferentes tratamientos. Por todo ello, tras la trituración, se sometió el material a una clasificación por tamaños. Para ello, se hizo uso de una tamizadora Retsch, Mod. Vibro (Fig. 3.4), para la que se utilizó tamices de 500, 120, 50, 40, 30, 20 y 16 número de mallas ASTM, según la norma ISO 3310-1 (Fig. 3.3), sometiéndolo a 100 rpm durante 10 minutos con el fin de llevar a cabo su adecuada separación.



Figura 3.3 Detalle de tamices con diferente luz de malla.



Figura 3.4 Tamizadora Retsch, Mod. Vibro, con tamices instalados.

De acuerdo con estudios previos (Moya, 1997), se ha usado el tamaño de partícula más adecuado y éste se corresponde a la fracción comprendida entre 0,3 y 0,425 mm, que será sobre la cual se ha centrado este trabajo de investigación, es decir, partículas retenidas en la malla número 50 ASTM (Tabla 3.1).

Tabla 3.1
RECEPCIÓN, ACONDICIONAMIENTO Y ALMACENAMIENTO
Número y luz de malla, y tamaño de retención

Nº malla	Luz, mm	Observación
16	1,20	Retiene partículas $d > 1,200$ mm
20	0,85	Retiene partículas $0,850 \text{ mm} < d < 1,200$ mm
30	0,6	Retiene partículas $0,600 \text{ mm} < d < 0,850$ mm
40	0,425	Retiene partículas $0,425 \text{ mm} < d < 0,600$ mm
50	0,3	Retiene partículas $0,300 \text{ mm} < d < 0,425$ mm
120	0,125	Retiene partículas $0,125 \text{ mm} < d < 0,300$ mm
500	0,025	Retiene partículas $0,025 \text{ mm} < d < 0,125$ mm

Cuando finaliza la separación de partículas, según retención en los diferentes tamices, se pesó cada conjunto por separado y se almacenó en botes bien cerrados. Con el fin de llevar un control del material existente de cada uno de los diferentes tamaños, se ha anotado en cada recipiente la cantidad pesada. Éstos se han mantenido en lugar limpio y fresco, alejados de luz y calor, pendientes de ser utilizados.

3.3 MICROORGANISMOS Y ENZIMAS UTILIZADAS

3.3.1 Microorganismo utilizado y conservación

3.3.1.1 Levadura utilizada

Para el desarrollo de las fermentaciones se ha trabajado con una levadura denominada *Hansenula polymorpha*, también llamada *Pichia angusta* suministrada por “American Type Culture Collection” (ATCC 34438), con un número de lote: 2931218.

3.3.1.2 Composición del medio de cultivo sólido

Una vez recibida la levadura, se transfirió a un medio sólido en tubos cilíndricos de base plana y de 0,1 dm³ de capacidad en el que se ha mantenido hasta que fue utilizada. Este medio consta de los siguientes componentes, Tabla 3.2.

Tabla 3.2
MICROORGANISMOS UTILIZADOS Y CONSERVACIÓN
Componentes del medio de cultivo sólido

Compuesto	Concentración, g dm ⁻³
Extracto de levadura	3
Extracto de malta	3
Peptona de caseína	5
D-xilosa ó D-arabinosa	10
Agar	20

El medio sólido se preparó por disolución de todos los componentes, excepto el agar, en agua ultrapura, ajustando el *pH* a 7 con KOH 1 M, con el fin de favorecer el poder gelificante del agar. La disolución se colocó sobre una placa calefactora-mezcladora Selecta, Mod. Agimatic-N, con calefacción para ser calentada mientras su agitación automáticamente gracias a la previa introducción de una varilla de agitación. Cuando se alcanzó los 80°C, temperatura a la cual se mantuvo la disolución, se disolvió el agar y se mantuvo el conjunto hasta la mezcla y disolución completa de los componentes.

Se cesó el calentamiento pero no la agitación con el fin de evitar la formación de grumos, y se traspasaron unos 25 cm³ de la disolución a cada tubo. Para su posterior esterilización se tapó la boca del tubo con algodón hidrófilo envuelto en gasa y cubierto con papel de filtro para evitar la entrada de agua al interior. La esterilización se ha llevado a cabo en el

autoclave durante 30 minutos a la sobrepresión comprendida entre 58,8 y 78,5 kPa en un intervalo de temperatura entre 110 y 115°C.

Los tubos conteniendo el medio se dejaron enfriar en forma inclinada para que, al solidificar el medio, se disponga de la máxima superficie sobre la que se pueda inocular el microorganismo.

3.3.1.3 Inoculación del microorganismo sobre medio sólido

El microorganismo se ha inoculado sobre este medio sólido en una cabina de flujo laminar. En primer lugar, se esterilizó toda la superficie y paredes de la cabina utilizando etanol absoluto, para posteriormente mantener la luz ultravioleta durante 10 minutos. A continuación, se prendió la mecha para asegurar un ambiente aséptico y se esterilizó el asa de Pt (ó de una aleación Ni-Co) que se ha utilizado para transferir el microorganismo al medio de cultivo sólido fresco, en zig-zag, sobre el que crecerá mientras se conserva en estufa de cultivo Memmert, Mod. BE 400, a una temperatura en el rango de 25 – 30°C.

Es preciso renovar el inóculo de la levadura, para su mantenimiento en un medio sólido fresco, cada dos semanas aproximadamente.

3.3.1.4 Composición del medio de cultivo líquido

Según Lindegren *et al.* (1958), para garantizar un buen crecimiento de las levaduras, se necesita un aporte externo de componentes. Estos nutrientes son aportados a través de un medio de cultivo líquido, Tabla 3.3.

Tabla 3.3
MICROORGANISMOS UTILIZADOS Y CONSERVACIÓN
Componentes del medio de cultivo líquido

Compuesto	Concentración, g dm ⁻³	
	Lindegren <i>et al.</i> (1958)	Concentración utilizada para sacarificación y fermentación simultánea
Extracto de levadura	4,00	2,00
Peptona de caseína	3,60	1,80
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,00	1,50
MgSO ₄ 7H ₂ O	2,05	1,025
KH ₂ PO ₄	2,00	1,00

En realidad, el medio se completa también con D-glucosa, con una concentración de 25 g dm⁻³ cuando se pretende acelerar el crecimiento de la levadura, obteniendo una elevada concentración celular en el precultivo en medio líquido.

En nuestra etapa experimental, las fermentaciones en medio sintético llevadas a cabo por *H. polymorpha* han sido las de los azúcares puros D-arabinosa, L-arabinosa y D-xilosa. Éstos fueron disueltos en este medio de cultivo líquido en una concentración de 25 g dm⁻³. Sin embargo, en el caso de los hidrolizados procedentes de la hidrólisis ácida a presión han sido éstos los que ya hayan proporcionado dichos azúcares como punto de partida para la sacarificación y fermentación simultánea, con lo que el medio de cultivo que se utilizó no ha aportado azúcares y su concentración en cuanto a nutrientes ha sido la mitad de la indicada por Lindegren *et al.* (1958).

3.3.1.5 Precultivos en medio líquido

A. Precultivo I

Entre 48 y 60 h antes del comienzo del bioproceso, se ha tomado un determinado número de tubos de ensayo con medio de cultivo sólido fresco sobre el que se realizó la inoculación de *H. polymorpha*, tal y como se indica en el apartado 3.3.1.3. Los tubos con los inóculos se han mantenido en la estufa de cultivo a 30°C con el fin de conseguir células con un mismo estado de crecimiento.

La preparación del precultivo se ha realizado en la cabina de flujo laminar. En primer lugar se limpió y desinfectó toda la superficie y paredes de la cabina, utilizando para ello etanol absoluto para posteriormente mantener la luz ultravioleta durante 10 minutos. A continuación, se ha prendido la mecha para asegurar un ambiente aséptico. Los tubos inoculados en medio sólido a 30°C se extrajeron de la estufa y se colocaron en la cabina, pudiéndose observar un crecimiento considerable de la biomasa, Fig. 3.5.

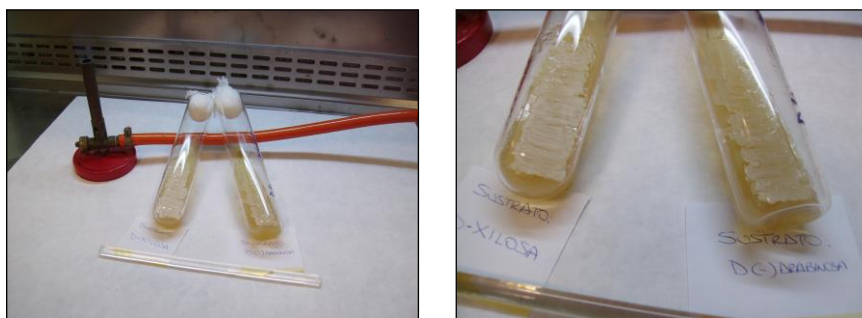


Figura 3.5 Detalle del crecimiento de *H. polymorpha* sobre medio de cultivo sólido.

Se preparó un volumen adecuado de medio de cultivo líquido, apartado 3.3.1.4. Según las condiciones establecidas, el *pH* del medio de cultivo se ajustó usando un pHmetro Crison, Mod. GLP 22, provisto de un electrodo combinado sensible a los hidrogeniones que está constituido por un indicador de vidrio, formado éste por una varilla de plata recubierta de AgCl, y otro de referencia montados en un único cuerpo. El ajuste se ha llevado a cabo con disoluciones de ClH 0,1 M y NaOH 0,1 M previamente preparadas. Mediante la bomba peristáltica Millipore, Mod. XX80 202 30, se ha añadido a cada uno de estos tubos con levadura inoculada un volumen determinado de medio de cultivo líquido esterilizado a través de un filtro estéril con prefiltro de porosidad de 0,45 μm . Tras mover con cuidado el medio líquido para facilitar el contacto con la superficie de medio de cultivo sólido, se consigue en cada uno de los tubos una suspensión de levadura que se transfirió a otro tubo de ensayo esterilizado, obteniendo un volumen total de suspensión celular.

Ante un proceso de fermentación del hidrolizado procedente de un pretratamiento a presión, no se ha utilizado el medio de cultivo líquido para la resuspensión de la levadura sino que se añadió a cada uno de los tubos inoculados un volumen determinado del propio hidrolizado (esterilizado mediante filtración con membranas de 0,45 μm de tamaño de poro), obteniendo un volumen total de suspensión celular.

B. Precultivo II

Cuando se desea obtener una elevada concentración celular en la suspensión celular, se debe realizar otro tipo de precultivo. Entre 48 y 60 h antes de preparar éste, se ha tomado un determinado número de tubos de ensayo con medio de cultivo sólido fresco sobre el que se realizó la inoculación de *H. polymorpha*, tal y como se indica en el apartado 3.3.1.3. Los tubos con los inóculos se mantuvieron en la estufa de cultivo, a 30°C con el objetivo de conseguir células en un mismo estado de crecimiento.

Con algodón hidrófilo envuelto en gasa se tapó la boca de 3 matraces Erlenmeyer de 50 cm^3 y 1 de 250 cm^3 . A continuación, se ha preparado dos portafiltros con filtro de nitrato de celulosa de porosidad 0,45 μm y prefiltros de lana de vidrio. Tanto los matraces como los portafiltros, se han envuelto en papel de filtro para evitar que el vapor de agua entre durante la operación de esterilización. Se situó un tapón hidrófilo en la boca de dos tubos cilíndricos vacíos de base plana y de 0,1 dm^3 de capacidad. Todo este material se esterilizó en el autoclave durante 30 minutos a la sobrepresión comprendida entre 58,8 y 78,5 kPa en un rango de temperatura de 110 y 115°C.

A continuación, se limpió y desinfectó toda la superficie y paredes de la cabina de flujo laminar utilizando etanol absoluto para posteriormente mantener la luz ultravioleta durante 10 minutos. Después, se prendió la mecha para asegurar el ambiente aséptico. Se ha preparado medio de cultivo líquido, apartado 3.3.1.4, incluyendo en este caso una concentración de 25 g dm^{-3} de D-glucosa. Dentro de la cabina, mediante un filtro estéril de porosidad $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ y haciendo uso de la bomba peristáltica, se ha esterilizado un volumen determinado de medio de cultivo líquido y se ha vertido posteriormente en el tubo vacío previamente esterilizado. A partir de éste se tomó 25 cm^3 , añadiéndolo en uno de los tubos previamente inoculados. Tras agitar unos minutos, se consiguió una suspensión de la levadura la cual se transfirió al siguiente tubo inoculado para repetir de nuevo el procedimiento sobre otro tubo con levadura inoculada. Cuando se ha conseguido la máxima suspensión celular en el medio de cultivo líquido a partir de todos los tubos inoculados, esta suspensión celular se vertió en el segundo tubo esterilizado ausente de medio sólido. Finalmente, se tomó 5 cm^3 del medio de cultivo líquido esterilizado y se vertió en el primer tubo inoculado a modo de arrastre final y limpieza de posibles restos de levadura, transfiriendo su contenido al resto de los tubos inoculados y finalmente al tubo con la suspensión final de levadura, homogeneizando la suspensión total.

A continuación, se ha adicionado 25 cm^3 de medio de cultivo esterilizado a cada matraz de 50 cm^3 así como el mismo volumen de la suspensión homogénea de levadura. Se agitó con cuidado para homogeneizar el contenido. Una vez colocado el tapón de algodón hidrófilo en cada Erlenmeyer, se introdujo en el agitador orbital Ovan MAXI, Mod. OL30-HE, previamente limpio y desinfectado con etanol, donde permaneció entre 48 y 72 h a una temperatura de 40°C y 150 rpm, período tras el cual la levadura habría consumido el azúcar suministrado en el medio de cultivo líquido y por tanto su crecimiento estaría garantizado. Tras este período de tiempo se llevó los tres Erlenmeyer a la cabina de flujo laminar, y se unificó su contenido en el Erlenmeyer esterilizado de 250 cm^3 , mezclándose bien la suspensión de levadura.

3.3.1.6 Inoculación del microorganismo en el reactor

A. Fermentación

Se limpió y desinfectó toda la superficie y paredes de la cabina de flujo laminar con etanol absoluto para posteriormente mantener la luz ultravioleta durante 10 minutos. A continuación, se prendió la mecha para asegurar el ambiente aséptico. En ella se situaron

los matraces Erlenmeyer esterilizados de 50 cm³ así como la disolución de monosacárido realizada en medio líquido de concentración 25 g dm⁻³ y con el *pH* ajustado a las condiciones establecidas. Mediante una bomba peristáltica, se hizo pasar el medio de cultivo a través de un portafiltros con filtro de nitrato de celulosa de porosidad 0,45 μm y prefiltros de lana de vidrio, con el fin de esterilizarlo, vertiéndose en un frasco de vidrio Pyrex estéril.

A partir del volumen total de suspensión celular obtenido en el precultivo en medio líquido, apartado 3.3.1.5, y utilizando una pipeta Pasteur estéril de 3 cm³, se adicionó a la disolución esterilizada un volumen determinado de dicho precultivo, agitándose posteriormente el conjunto con el fin de homogeneizar la mezcla. Finalmente, se añadió 40 cm³ entre los diferentes matraces utilizando una pipeta Pasteur.

B. Sacarificación y fermentación simultáneas

Se limpió y desinfectó toda la superficie y paredes de la cabina de flujo laminar con etanol absoluto para posteriormente mantener la luz ultravioleta durante 10 minutos. A continuación, se prendió la mecha para asegurar el ambiente aséptico y se situaron cuidadosamente los siguientes elementos:

- Biorreactores tipo tanque agitado montado y esterilizado.
- Matraz Erlenmeyer de vidrio Pyrex que contiene el volumen de hidrolizado esterilizado con los nutrientes ya disueltos, y con *pH* ajustado a las condiciones de operación.
- Precultivo de *H. polymorpha* en medio líquido, apartado 3.3.1.5.

Dentro del ambiente estéril, se vertió el hidrolizado, contenido en el matraz Erlenmeyer, en el interior del biorreactor. A partir del volumen total de suspensión celular obtenido en el precultivo en medio líquido, apartado 3.3.1.5, y utilizando una pipeta Pasteur estéril de 3 cm³, se ha adicionado al reactor un volumen determinado de suspensión de levadura procedente del precultivo.

Ante un proceso de fermentación del hidrolizado pretratado a presión, se procedería de igual forma pero al reactor se le añade un volumen determinado de hidrolizado (exento de sólidos en suspensión).

3.3.2 Descripción de los enzimas utilizados

3.3.2.1 Tipos de enzimas

- Celulasa [EC 3.2.1.4], de *Trichoderma reesei* (ATCC 26921).

Nombre comercial: Celluclast 1.5 L, CCN03133.

Su sinónimo es 1,4-(1,3:1,4)- β -D-Glucan 4-glucano-hydrolase.

Fabricante: Novo Nordisk Bioindustrial (Novozymes, Ref. C2730).

Cataliza la descomposición de la celulosa en D-glucosa, celobiosa y oligosacáridos.

- β -glucosidasa [EC 3.2.1.21], de *Aspergillus niger*.

Nombre comercial: Novozym 188, DCB00219.

Fabricante: Novo Nordisk Bioindustrial (Novozymes, Ref. C6105).

La β -glucosidasa actúa sobre los enlaces glucosídicos β 1- \rightarrow 4 entre dos moléculas de D-glucosa. Así, cataliza la hidrólisis de la celobiosa en D-glucosa.

3.3.2.2 Determinación de la actividad enzimática

A. Actividad del enzima celulasa

Para llevar a cabo la determinación de esta actividad se ha seguido el procedimiento descrito por Ghose (1987). Para ello se han preparado una serie de disoluciones:

Disolución tampón de citrato sódico 0,05 M, pH 4,8

Se ha preparado una disolución de ácido cítrico 0,1 M y otra de citrato sódico 0,1 M. Para conseguir 100 cm³ de una disolución tampón de citrato sódico 0,05 M y pH 4,8 se han de mezclar 23 cm³ de disolución de ácido cítrico 0,1 M con 27 cm³ de disolución de citrato sódico 0,1 M, enrasando con agua ultrapura, Tabla 3.4.

Tabla 3.4
DESCRIPCIÓN DE LOS ENZIMAS UTILIZADOS
Preparación de la disolución tampón de citrato sódico 0,05 M

$V_{\text{disolución ácido cítrico 0,1 M, cm}^3}$	$V_{\text{disolución citrato sódico 0,1 M, cm}^3}$	$V_{\text{agua ultrapura, cm}^3}$	$pH_{\text{disolución citrato sódico 0,05 M}}$
46,5	3,5		3,0
43,7	6,3		3,2
40,0	10,0		3,4
37,0	13,0		3,6
35,0	15,0		3,8
33,0	17,0		4,0
31,5	18,5		4,2
28,0	22,0		4,4
25,5	24,5	50,0	4,6
23,0	27,0		4,8
20,5	29,5		5,0
18,0	32,0		5,2
16,0	34,0		5,4
13,7	36,3		5,6
11,8	38,2		5,8
9,5	41,5		6,0
7,2	42,8		6,2

Disoluciones de celulasa

El objetivo ha sido preparar 4 disoluciones de menor a mayor concentración del enzima celulasa utilizando la disolución tampón de citrato sódico, Tabla 3.5.

Tabla 3.5
DESCRIPCIÓN DE LOS ENZIMAS UTILIZADOS
Preparación de las disoluciones de celulasa

Disolución	$V_{\text{enzima, cm}^3}$	$V_{\text{total cm}^3}$	$V_{\text{celulasa}} / V_{\text{total}} \cdot 10^3$	Factor de dilución
C ₁	1	50	20	50
C ₂	1	100	10	100
C ₃	0,769	100	7,69	130
C ₄	0,625	250	2,50	400

Disoluciones de D-glucosa

Para relacionar los valores de la absorbancia de las muestras con las concentraciones en D-glucosa, es preciso obtener previamente una recta de calibrado que relacione ambas variables, partiendo de disoluciones con concentración en D-glucosa conocida. A partir de

3. Materiales y métodos

una disolución madre en D-glucosa de concentración 10 g dm^{-3} , se obtuvieron cuatro disoluciones de diferentes concentraciones, Tabla 3.6.

Tabla 3.6
DESCRIPCIÓN DE LOS ENZIMAS UTILIZADOS
Preparación de las disoluciones de D-glucosa

Disolución	V _{dis. madre} 10 g D-glucosa dm^{-3} , cm^3	V _{dis. citrato sódico} 0,05 M, pH 4,8 cm^3	[D-glucosa], mg cm^{-3}
G ₁	1	0,5	$10 \cdot 1 / 1,5 = 6,67$
G ₂	1	1	$10 \cdot 1/2 = 5$
G ₃	1	2	$10 \cdot 1/3 = 3,33$
G ₄	1	4	$10 \cdot 1/5 = 2$

Una vez preparadas las disoluciones anteriores, usando tubos de ensayos de 15 cm^3 , se añadieron los volúmenes de la disolución tampón de citrato sódico 0,05 M, así como de las disoluciones de D-glucosa y enzima celulasa, Tablas 3.7 a 3.9. Además, hay que tener en cuenta que en las disoluciones de celulasa, se ha introducido en el interior de estos tubos de vidrio papel de filtro de dimensiones $6 \times 1 \text{ cm}^2$ (50 g aproximadamente), previamente preparados.

Tabla 3.7
DESCRIPCIÓN DE LOS ENZIMAS UTILIZADOS
Preparación de tubos de vidrio con las disoluciones en D-glucosa

Tubos	V _{dis. citrato sódico 0,05 M,} pH 4,8, cm^3	V _{dis. D-glucosa,} cm^3
G ₁	1	0,5 de disolución G ₁
G ₂	1	0,5 de disolución G ₂
G ₃	1	0,5 de disolución G ₃
G ₄	1	0,5 de disolución G ₄
BLANCO _G	1,5	—

Tabla 3.8
DESCRIPCIÓN DE LOS ENZIMAS UTILIZADOS
Preparación de tubos de vidrio con los blancos de las disoluciones de celulasa

Tubo	V _{dis. citrato sódico 0,05 M, pH 4,8,} cm^3	V _{dis. celulasa,} cm^3
B _{C1}	1	0,5 de disolución C ₁
B _{C2}	1	0,5 de disolución C ₂
B _{C3}	1	0,5 de disolución C ₃
B _{C4}	1	0,5 de disolución C ₄

Tabla 3.9
DESCRIPCIÓN DE LOS ENZIMAS UTILIZADOS
Preparación de tubos de vidrio con las disoluciones de celulasa

Tubo	V _{dis.} citrato sódico 0,05 M, pH 4,8, cm ³	V _{dis.} celulasa, cm ³
C1	1	0,5 de disolución C ₁
C2	1	0,5 de disolución C ₂
C3	1	0,5 de disolución C ₃
C4	1	0,5 de disolución C ₄

Se ha introducido agua destilada en un baño de agua Selecta, Mod. Digiterm S-542, estableciéndose la temperatura a 50°C. A continuación, los tubos anteriormente preparados se cerraron con un tapón y se introdujeron en dicho baño manteniéndose a 50°C durante un período de 1 h. Transcurrido dicho tiempo, se le añadieron a cada tubo 3 cm³ de reactivo DNS (apartado 3.10.2), agitándose con cuidado para asegurar la homogeneidad.

Sobre la placa calefactora se calentó agua en un vaso de precipitado hasta 100°C, momento en el que introdujeron los tubos de vidrio para permanecer durante 5 minutos a dicha temperatura. Posteriormente, se sometieron a un enfriamiento brusco con hielo durante otros 5 minutos más. Finalmente, se le ha adicionado a cada tubo 20 cm³ de agua ultrapura y mezclándose adecuadamente el conjunto.

En un espectrofotómetro UV-VIS Thermo Mod. Helios Gamma, de un solo haz, se fijó la longitud de onda a 640 nm y se procedió a la medida de la absorbancia de una muestra de cada uno de los tubos preparados a partir de la disolución de D-glucosa (G1, G2, G3, G4), así como su blanco. De esta forma, al representar las diferentes concentraciones de D-glucosa en la disolución (expresadas en mg de D-glucosa por 0,5 cm³ de disolución) versus a sus correspondientes valores de absorbancia, se obtuvo la recta de calibrado para D-glucosa.

A igual longitud de onda se midió en el espectrofotómetro las muestras de cada uno de los tubos preparados a partir de las disoluciones de celulasa (C1, C2, C3, C4), teniendo en cuenta sus correspondientes blancos en cada caso (B_{C1}, B_{C2}, B_{C3}, B_{C4}). A partir de estos valores de absorbancia, y en función de la recta de calibrado anteriormente deducida, se obtuvieron los valores de concentración de D-glucosa (en mg de D-glucosa por 0,5 cm³ de disolución) en cada una de las disoluciones de enzima evaluadas.

A continuación, se representó el logaritmo de la concentración de disolución de enzima (expresada en cm³ enzima por cm³ de volumen total) en función de la concentración de D-

glucosa, determinándose gráficamente el valor de ordenada cuando la abscisa equivale a 2 mg de D-glucosa por 0,5 cm³ de disolución. Por tanto, tras el antilogaritmo, se obtuvo un valor de concentración de disolución de enzima que, una vez sustituido en la Ec. 3.1 (Goshe, 1987), dio como resultado la actividad del enzima celulasa en unidades de papel de filtro, *UPF* (expresado en unidades por cm³ de enzima).

$$UPF = \frac{0,37}{[H]} \quad [3.1]$$

siendo [*H*] la concentración de celulasa correspondiente 2 mg de D-glucosa por 0,5 cm³ de disolución.

B. Actividad del enzima β-glucosidasa

Para determinar la actividad de este enzima, se ha seguido el procedimiento descrito por Bailey y Nevalainen (1981), siendo necesario disponer de las siguientes disoluciones:

Disolución tampón de citrato sódico 0,05 M, pH 4,8

Obtenida de igual forma que en la determinación de la actividad de la celulasa.

Disoluciones de 4-nitrofenol

Se ha preparado una disolución madre en 4-nitrofenol 2,5 mM mediante la disolución tampón de citrato sódico 0,05 M y pH = 4,8. A partir de ésta se han obtenido 5 disoluciones de diferente concentración en 4-nitrofenol, Tabla 3.10.

Tabla 3.10
DESCRIPCIÓN DE LOS ENZIMAS UTILIZADOS
Preparación de las disoluciones de 4-nitrofenol

Disolución	V _{dis. madre} 4-nitrofenol 2,5 mM cm ³	V _{total} cm ³	Factor de dilución	[4-nitrofenol]·10 ² mM
N ₁	1	100	100	2,5·1 / 10 ² = 2,5
N ₂	1	200	200	2,5·1 / 200 = 1,25
N ₃	1	250	250	2,5·1 / 250 = 1,0
N ₄	0,5	250	500	2,5·0,5 / 250 = 0,5
N ₅	0,4	250	625	2,5·0,4 / 250 = 0,4

Disoluciones de β -glucosidasa

A partir de una disolución madre de β -glucosidasa con factor de dilución 1/100, se han preparado disoluciones de dicha enzima de menor a mayor concentración utilizando para ello la disolución tampón de citrato sódico de concentración 0,05 M y 4,8 de *pH*, Tabla 3.11.

Tabla 3.11
DESCRIPCIÓN DE LOS ENZIMAS UTILIZADOS
Preparación de las disoluciones de β -glucosidasa

Disolución	$V_{\text{dis. madre}} \beta\text{-glucosidasa 1/100, cm}^3$	$V_{\text{total, cm}^3}$	$V_{\beta\text{-glucosidasa}} / V_{\text{total}} 10^5, \text{ cm}^3 \text{ cm}^{-3}$	Factor de dilución
βG_1	5,0	50	$(5 \cdot 1 / 100) / 50 = 100$	1.000
βG_2	5,0	100	$(5 \cdot 1 / 100) / 100 = 50$	2.000
βG_3	4,0	100	$(4 \cdot 1 / 100) / 100 = 40$	2.500
βG_4	8,33	250	$(8,33 \cdot 1 / 100) / 250 = 33,32$	3.000
βG_5	6,87	250	$(6,87 \cdot 1 / 100) / 250 = 27,48$	3.636
βG_6	5,0	250	$(5 \cdot 1 / 100) / 250 = 20$	5.000
βG_7	0,5	50	$(0,5 \cdot 1 / 100) / 50 = 10$	10.000
βG_8	0,5	100	$(0,5 \cdot 1 / 100) / 100 = 5$	20.000
βG_9	0,5	200	$(0,5 \cdot 1 / 100) / 200 = 25$	40.000
βG_{10}	0,5	250	$(0,5 \cdot 1 / 100) / 250 = 2$	50.000

Disolución de 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosido 1 mM

Se pesaron 0,0301 g de dicho sustrato y se llevaron a un volumen final de 100 cm³ con la disolución tampón de citrato sódico de concentración 0,05 M y 4,8 de *pH*.

Disolución en Na₂CO₃ 1 M

Tras pesar 1,06 g de carbonato sódico se han diluido en la disolución de citrato sódico de concentración 0,05 M y *pH* 4,8, hasta alcanzar un volumen total de 10 cm³. Una vez que se disponen de las disoluciones anteriores, usando tubos de ensayos de 15 cm³, se han añadido los volúmenes de las diferentes disoluciones, Tablas 3.12 y 3.13, agitándose posteriormente para homogeneizar la mezcla.

Mediante tapones apropiados se cerraron los tubos de ensayo y se introdujeron en el baño de agua destilada, una vez alcanzada la temperatura establecida de 50°C, manteniéndose durante un período de 10 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se le añadieron a cada tubo 1 cm³ de la disolución Na₂CO₃ 1 M, agitándose con cuidado para asegurar la homogeneidad de la mezcla.

3. Materiales y métodos

En el espectrofotómetro UV-VIS de un solo haz, tras fijar la longitud de onda a 400 nm, se procedió a medir la absorbancia del contenido de los tubos de las disoluciones de 4-nitrofenol (N₁, N₂, N₃, N₄, N₅), así como su blanco. De esta forma, se ha representado los valores de absorbancia obtenidos frente a las concentraciones conocidas de las disoluciones de 4-nitrofenol, obteniéndose una recta de calibrado que relaciona ambas variables.

Tabla 3.12
DESCRIPCIÓN DE LOS ENZIMAS UTILIZADOS
Preparación de los tubos de vidrio con disoluciones de 4-nitrofenol

Tubo	V_{dis.} citrato sódico 0,05 M, pH 4,8, cm³	V_{dis.} 4-nitrofenol, cm³
N ₁	0	2 de N ₁
N ₂	0	2 de N ₂
N ₃	0	2 de N ₃
N ₄	0	2 de N ₄
N ₅	0	2 de N ₅
BLANCO _N	2	—

Tabla 3.13
DESCRIPCIÓN DE LOS ENZIMAS UTILIZADOS
Preparación de los tubos de vidrio con disoluciones de β-glucosidasa

Tubo	V_{dis.} 4-nitrofenil-β-D-glucopiranosido 1 mM, cm³	V_{dis.} citrato sódico 0,05 M, pH 4,8, cm³	V_{dis.} β-glucosidasa, cm³
βG ₁	1,8	0	0,2 de βG ₁
βG ₂	1,8	0	0,2 de βG ₂
βG ₃	1,8	0	0,2 de βG ₃
βG ₄	1,8	0	0,2 de βG ₄
βG ₅	1,8	0	0,2 de βG ₅
βG ₆	1,8	0	0,2 de βG ₆
βG ₇	1,8	0	0,2 de βG ₇
βG ₈	1,8	0	0,2 de βG ₈
βG ₉	1,8	0	0,2 de βG ₉
βG ₁₀	1,8	0	0,2 de βG ₁₀
BLANCO _{βG}	0	2	—

A igual longitud de onda se midió en el espectrofotómetro el contenido de cada uno de los tubos preparados a partir de las disoluciones de β -glucosidasa (β G₁- β G₁₀) y su blanco. A partir de estos valores de absorbancia y con la recta de calibrado anteriormente deducida, se calculó para cada una de las muestras de disoluciones de β -glucosidasa la concentración molar de 4-nitrofenol obtenida a partir del sustrato 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosido. Teniendo en cuenta estas concentraciones y que la reacción se produce en un volumen total de 3 cm³ y a lo largo de 600 s, se puede calcular la actividad enzimática en nkat, Ec. 3.2.

$$nkat = \frac{0,003 [4\text{-nitrofenol}]}{600} 10^9 = \frac{[4\text{-nitrofenol}]}{2} 10^4 \quad [3.2]$$

unidad que equivale a 1 nmol s⁻¹, o lo que es lo mismo, la cantidad de enzima que se necesita para generar 1 nmol s⁻¹ del producto resultante de la reacción, que en este caso sería 4-nitrofenol.

Finalmente, se representaron las actividades enzimáticas obtenidas, expresados en nkat, frente al factor de dilución de las disoluciones de β -glucosidasa correspondiente, obteniéndose una recta de calibrado que relaciona dichas variables. Para el cálculo de la actividad enzimática, se considera el factor correspondiente a 1 nkat de actividad, por tanto, la actividad enzimática tendrá un valor inverso a dicho factor.

3.4 INSTALACIÓN EXPERIMENTAL DE HIDRÓLISIS

Todos los experimentos se han realizado en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales en el Campus Universitario de Jaén.

3.4.1 Reactor a presión

En la etapa de pretratamiento del material de poda de olivo se ha utilizado una instalación experimental que permite realizar una hidrólisis ácida a presión (o tratamiento hidrotérmico), Fig. 3.6.



Figura 3.6 Dispositivo experimental para los tratamientos hidrotérmicos.

Se trata de un reactor discontinuo heterogéneo, tipo tanque agitado a presión, Parr Mod. 4522, con una cabeza de agitación, Mod. A1120HC (Fig. 3.7). El sistema de agitación está formado por dos turbinas ó hélices regulables en altura, tipo Rushton, cada una de las cuales posee 6 brazos, Fig. 3.8.



Figura 3.7 Cabeza de agitación Parr, Mod A1120HC.



Figura 3.8 Tapa, turbina de agitación y serpentín interno del reactor.

Dispone de un dispositivo eléctrico para el calentamiento de la carga y un sistema de serpentines internos de ocho tubos verticales conectados en U entre sí, para su enfriamiento (Fig. 3.8). Se utiliza agua como fluido refrigerante. La agitación se consigue gracias a un rotor de velocidad variable, siendo 700 rpm la velocidad máxima alcanzable. Este sistema de agitación funciona correctamente para reacciones con mezclas de viscosidad superior a $25 \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Para cargas más viscosas, la cabeza fija puede ser equipada con unidades magnéticas y motores más potentes capaces de mantener la agitación requerida.

La presión máxima es de 1.900 psi (13.100 kPa) aunque está limitado por un disco de ruptura y un reloj de lectura de presión, reduciéndose ésta a un 30%, lo que equivale a una presión de 1.400 psi (9.653 kPa) ó 300°C . Su capacidad es de 2 dm^3 , aunque el volumen máximo de carga no ha de superar $1,043 \text{ dm}^3$ y 350°C . Las características del reactor son las siguientes:

- Diámetro interno: 10,16 cm.
- Altura interna: 26,67 cm.
- Peso: 14,51 kg.
- Capacidad: 2 dm^3 .

Los elementos principales son (Fig. 3.10):

- Cuerpo del reactor a presión (Fig. 3.9), construido en acero inoxidable T316.

Anchura: 39,37 cm.

Altura: 81,28 cm.

Peso: 54,43 kg.



Figura 3.9 Cuerpo del reactor.

- Controlador PID, Parr Mod. 4842, conectado a sonda digital de temperatura y presión. Permite programar la temperatura de trabajo, la potencia calefactora y la velocidad de agitación.

- Medidor de presión analógico de esfera.
- Sonda digital de presión.
- Sonda digital de temperatura (termopar).

3. Materiales y métodos

- Camisa calefactora eléctrica capaz de proporcionar una potencia máxima de 1.100 W (posición II) y una potencia intermedia de 750 W (posición I).
- Válvulas de toma de muestra e inyección de un determinado gas.
- Válvula de descompresión.
- Válvulas de entrada y salida del agua de refrigeración.
- Cuerpo cilíndrico de vidrio protector ('liner') del interior del equipo ante muestras ácidas (corrosivas).

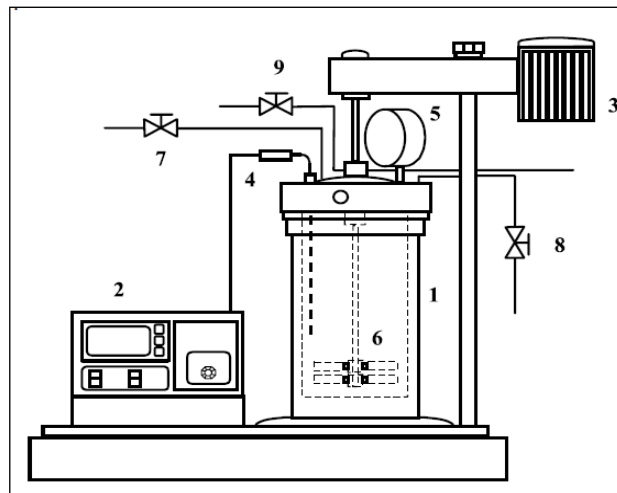


Figura 3.10 Detalle esquemático del reactor a presión. 1: Cuerpo del reactor. 2: Panel de control. 3: Motor. 4: Sonda de temperatura. 5: Medidor de presión. 6: Agitador. 7: Entrada del sistema de refrigeración. 8: Salida del sistema de refrigeración. 9: Sistema de refrigeración del agitador.

3.5 INSTALACIONES EXPERIMENTALES DE FERMENTACIÓN

Todos los experimentos de fermentación así como de sacarificación y fermentación simultánea se han llevado a cabo en instalaciones construidas y desarrolladas por el Grupo de Investigación 'Bioprocesos'.

3.5.1 Agitador orbital

Se trata de una cámara incubadora refrigerada transparente digital Ovan CLEAR C, Mod. IC10-CE + Acop E. Sus características más importantes son:

- Cámara transparente (metacrilato) de sobremesa con puerta frontal con cierre hermético.
- Temperatura controlada por microprocesador.
- Pantalla digital LCD retroiluminada con indicación del valor seleccionado y real de temperatura, y temporizador (con avisador acústico).
- Teclado con pulsadores de membrana, sensibles al tacto.
- Circulación de aire forzado.
- Refrigeración por compresor silencioso de 1/10 CV.
- Sistema de seguridad por sobre temperatura.
- Su ficha técnica:

Rango de temperatura: 10 – 60°C.

Temporizador: 0 – 240 min.

Dimensión interior: 4 cm.

Dimensión exterior: 48 x 53 x 48 cm³.

Peso: 31 kg.

Capacidad: 122 kg.

Esta cámara está acoplada sobre un agitador orbital digital Ovan, MAXI HD. Sus características son:

- Movimiento orbital para recipientes de gran volumen y trabajos exhaustivos, controlado por microprocesador y motor Brushless (sin escobillas) de máxima duración.

- Pantalla digital LCD retroiluminada con indicación del valor seleccionado y real de velocidad y temporizador (con avisador acústico).
- Teclado con avisador de membrana, sensibles al tacto.
- Mantenimiento constante de la velocidad seleccionada, independientemente de la carga.
- Órbita de 30 mm de amplitud.
- Inicio y paro suave y progresivo, independientemente de la velocidad seleccionada.
- Su ficha técnica:

Accesorios:	Doble plataforma antideslizante 35 x 40 cm ² .
Carga máxima:	25 kg.
Peso:	12 kg.
Rango de velocidad:	20 – 220 rpm con resolución de 5 rpm.
Tipo de motor:	Brushless /sin escobillas.
Temporizador:	0 – 120 min.
Superficie útil:	35 x 40 cm ² .
Dimensiones:	41 x 57 x 14 cm ³ .

3.5.2 Biorreactores tipo tanque agitado

Estos biorreactores están incluidos en una instalación experimental diseñada para la realización de los experimentos de hidrólisis y fermentación simultánea llevados a cabo con *H. polymorpha*, y β -glucosidasa. Esta instalación está constituida por los siguientes elementos:

① Biorreactor, tipo tanque agitado (Fig. 3.11): Vaso de cultivo de vidrio Pyrex, cilíndrico de fondo plano. Va provisto de una camisa de termostatación por la que circula agua, asegurando el mantenimiento de una temperatura constante en la suspensión del cultivo durante el desarrollo del experimento. Posee un volumen útil de 2 dm³, un diámetro interior y exterior de 10,5 y 13,5 cm, respectivamente; una altura interior de 25 cm y exterior de 26,5 cm.

② Columna de refrigeración. Se destina una para cada biorreactor. Con el fin de llevar a cabo la refrigeración de estas columnas se utilizó agua destilada a temperatura ambiente (23 – 24°C) impulsada por una bomba de recirculación ubicada en un baño. Estos refrigerantes de vidrio se comunican entre sí a través de gomas de silicona, de tal forma que la entrada de refrigeración de la primera columna procede directamente del baño y su salida se dirige hacia la entrada de la segunda columna, así sucesivamente.

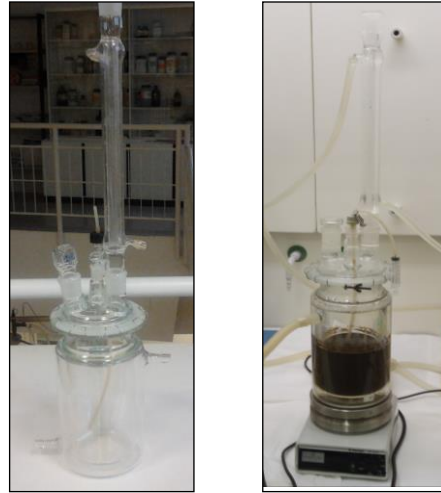


Figura 3.11 Biorreactor cerrado con tapa, tapones y columna de refrigeración.

③ Tubos de gomas de silicona por donde circula el agua de termostatación para la conexión de los vasos de cultivo así como de sus respectivas columnas de refrigeración. Tanto los vasos como las columnas poseen ambos refrigeraciones diferentes ya que no se trata de la misma temperatura.

④ Tubos de goma de silicona, a través de los cuales se extraen las muestras del interior de los vasos. Se abre y cierra mediante pinza Hoffman. La muestra se succiona mediante jeringa estéril de 5 cm³.

⑤ Baño de agua Selecta, Digiterm S-542, con termostato y bomba de recirculación que impulsa el agua de termostatación a las columnas de refrigeración.

⑥ Baño de agua Selecta, Mod. Tectron Cod. 3473200 con termostato y bomba de recirculación que impulsa el agua de termostatación a las camisas de refrigeración de los biorreactores. Posee un intervalo de calentamiento más suave, 20 – 100°C, y otro más intenso, 80 – 200°C. Este último intervalo se conecta/desconecta mediante un interruptor.

⑦ Cada reactor de cultivo lleva instalado un equipo de agitación, compuesto por:

- Un agitador magnético Heidolph, MR2000, situado debajo del vaso, que posee un intervalo de revoluciones de 0 – 1.500 rpm.

- Una varilla de agitación magnética cubierta de teflón de forma cilíndrica de 4 cm de longitud y 0,8 cm de diámetro, que se ubica en el interior del biorreactor.

Debido al campo magnético rotatorio generado por el agitador magnético, se provoca la rotación mecánica del imán ó varilla magnética, asegurando las condiciones homogéneas

en el interior del reactor. Esta relación agitación/volumen dentro del biorreactor se mantiene constante durante todo el experimento de fermentación, es por ello que dicha velocidad irá reduciéndose a medida que disminuya el volumen en el vaso de cultivo, concretamente 50 rpm por cada 50 cm³.

Por otra parte, la absorción del oxígeno necesario para la supervivencia de la levadura se realiza a través de la superficie en contacto con la fase gaseosa (aire), incluido el vórtice originado como consecuencia de la agitación, Fig. 3.12. Gracias a éste se consigue la entrada de aire al medio de cultivo y, por tanto, las condiciones microaeróbicas.



Figura 3.12 Vórtice de agitación.

⑧ Cuentarrevoluciones Heidolph digital, Mod. 2002, que permite controlar la velocidad de agitación en los biorreactores.

La instalación completa, Fig. 3.13, se ubicó en el interior de una cabina de sobremesa de extracción de gases, con cierre proporcionado por cristalera corredera. Durante los experimentos permaneció siempre con las cristaleras semiabiertas para permitir una pequeña aeración en el interior.

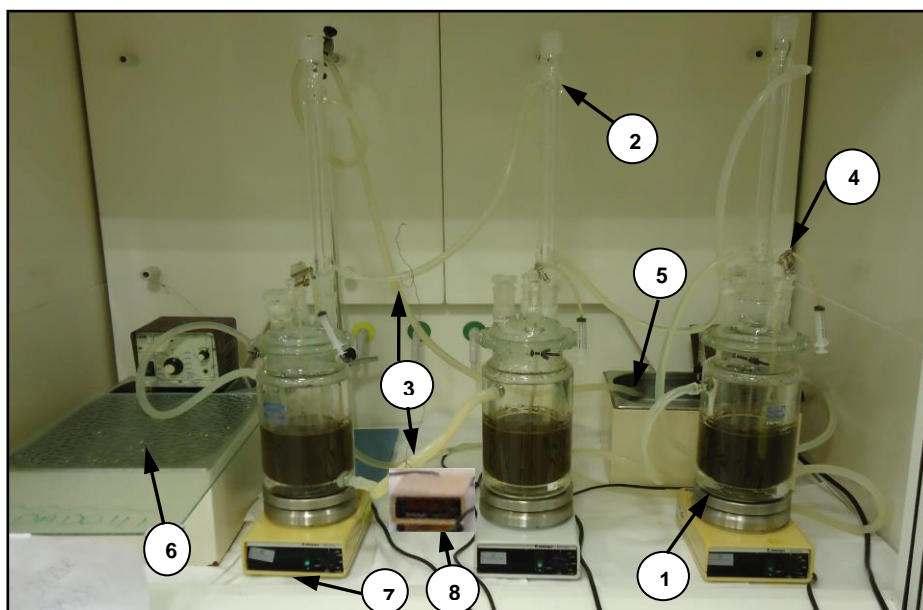


Figura 3.13 Instalación experimental de hidrólisis y fermentación simultánea.
1: Biorreactor. 2: Torre de refrigeración. 3: Tubos de goma de silicona. 4: Sistema toma de muestra. 5: Baño de refrigeración para torres. 6: Baño de refrigeración del encamisado de biorreactores. 7: Agitador magnético. 8: Cuentarrevoluciones.

3.6 DESARROLLO DE LOS PROCESOS DE HIDRÓLISIS

3.6.1 Hidrólisis ácida a presión

Con este pretratamiento hidrotérmico, lo que se pretende es esponjar la fibra para que se mejore el posterior ataque enzimático en el proceso de sacarificación y fermentación simultánea, Fig. 3.14.

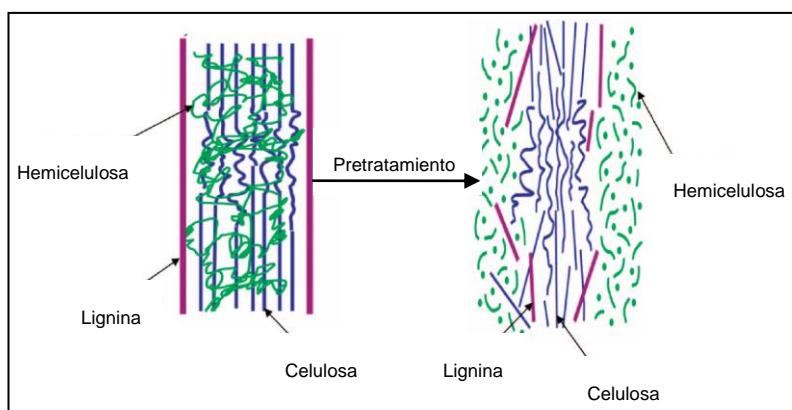


Figura 3.14 Material lignocelulósico tras ser sometido a pretratamiento físico ó 'steam-explosion' (Kumar *et al.*, 2009).

Con una relación 1/6 (p/V) de sólido con respecto a líquido (S/L), expresada en kg dm^{-3} , se puede hidrolizar completamente la fracción hemicelulósica operando a menos de 215°C (Cuevas, 2007). Según Moya (1997) y Romero (2003), el material de poda es más fácilmente accesible al ataque hidrolítico con ácidos y contiene menos proporción en hemicelulosa que el hueso de aceituna.

El material lignocelulósico del que se partió es subproducto de poda, exento en hoja, de un tamaño entre 0,300 y 0,425 mm (apartado 3.2). Utilizando un granatorio Mettler Toledo, Mod. PB 5001-S, se pesó la cantidad de material lignocelulósico correspondiente a 50 g en base seca, con lo que previamente se ha determinado la humedad y materia volátil del mismo (apartado 3.8.1). Con el fin de mantener la relación 1/6 (S/L), se le añadió 300 cm^3 de una disolución de ácido sulfúrico 0,05 M y se vertieron en el 'liner' del reactor, agitando cuidadosamente la mezcla con el fin de asegurar su homogeneización. A continuación, se introdujeron en el interior del cuerpo externo de acero inoxidable del reactor para posteriormente proceder a su cierre. Seguidamente, el reactor se insertó dentro de la camisa calefactora eléctrica, se introdujo la sonda digital de temperatura dentro del reactor, y se conectó el controlador de presión así como los sistemas de refrigeración. Una vez establecida 200°C como temperatura máxima (T_{max}), así como 250 rpm, se inició el calentamiento y la agitación.

El objetivo ha sido evaluar la evolución de la temperatura y presión a lo largo del tiempo. Cuando se alcanzó los 100°C en el reactor se consideró tiempo inicial, t_0 . Cada minuto se ha registrado la temperatura asociada hasta alcanzar 200°C en un tiempo t_1 . A continuación, y sin tiempo de operación del tratamiento ácido ($t_h = 0$), se desconectó la calefacción y se introdujo agua fría en la camisa del reactor para provocar una gran descompresión en el sistema ('Steam explosion') y con ella la hidrólisis parcial del subproducto. Los valores de temperatura se han registrado cada minuto hasta que la temperatura descendió a 100°C, en un tiempo t_2 . Posteriormente, la agitación se interrumpió cuando la temperatura hubo alcanzado los 50°C, extrayéndose el reactor de la camisa calefactora eléctrica, para introducirse en un baño de hielo con el fin de acelerar su enfriamiento (hasta 30°C). Tras la apertura del reactor, en una probeta de 1 dm³, se vertió el hidrolizado y el volumen de agua ultrapura utilizado para limpiar tanto el cabezal de agitación como el 'liner'. Tras la decantación, se determinó el volumen de ambas fases, sólida y líquida, en el total.

A partir de este hidrolizado se ha tomado en tubo Falcon una muestra de 12 cm³ que se llevó a una centrífuga digital de sobremesa Hettich, Mod. Universal 32, a 5.000 rpm durante 10 minutos. Tras verter el sobrenadante en un tubo estéril, a éste se le determinaron los compuestos fenólicos totales, apartado 3.10.4, así como el índice de inhibidores, apartado 3.10.6.

El hidrolizado restante se ha sometido posteriormente a sacarificación y fermentación simultánea con *H. polymorpha* y enzimas celulasa [EC 3.2.1.4] y β -glucosidasa [EC 3.2.1.21], apartado 3.7.2, o bien, una vez filtrado, a un proceso de fermentación con *H. polymorpha* (apartado 3.7.2).

Para caracterizar el material lignocelulósico tras el tratamiento hidrotérmico, se ha tomado un embudo büchner con papel de filtro en su interior y tras introducirlo en un matraz kitasato y conectar el conjunto a una trompa de vacío, se vertió el hidrolizado a través del filtro del embudo, quedándose retenida la fase sólida en el papel de filtro. A continuación, se extrajo el papel con el material lignocelulósico del filtro y se dejó secar durante un mínimo de 72 h. Tras separar cuidadosamente el material lignocelulósico del papel de filtro, se introdujo en un recipiente con cierre hermético y se conservó en un lugar limpio y fresco para posteriormente caracterizarlo, apartado 3.8.

Para el cálculo de las velocidades de calentamiento (v_c) y enfriamiento (v_e) en el reactor, se ha representado la temperatura frente al tiempo de proceso, observándose dos zonas, Fig. 3.15.

- Zona de calentamiento. Desde la temperatura inicial, 100°C, hasta la máxima establecida, 200°C, se produce un aumento lineal de ésta, Ec. 3.3,

$$T(t) = at + b \quad [3.3]$$

siendo a y b constantes.

- Zona de enfriamiento: Descenso exponencial desde 200°C hasta 100°C, que se puede ajustar mediante una función polinómica, Ec. 3.4,

$$T(t) = a't^2 + b't + c' \quad [3.4]$$

siendo a', b' y c' constantes.

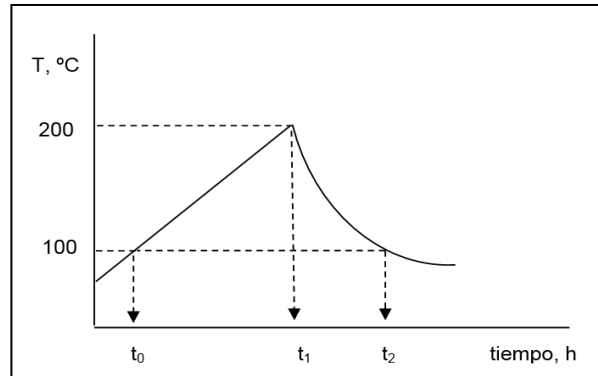


Figura 3.15 Evolución de la temperatura frente al tiempo en hidrólisis con agua caliente a presión.

Es de gran interés el estudio de la combinación de ambas variables en un único parámetro con el fin de correlacionar la severidad del pretratamiento con su eficacia. Overend *et al.* (1987) plantean una valoración conjunta tanto del efecto del tiempo como de la temperatura a través del parámetro de severidad, R_0 , con el fin de describir su influencia en el pretratamiento de material lignocelulósico, Ec. 3.5,

$$R_0 = \int e^{\frac{T(t)-T_r}{w}} dt \quad [3.5]$$

donde t es tiempo de residencia, en minutos, $T(t)$ es la función que relaciona la temperatura con el tiempo. Como valor de T_r , en esta investigación, se ha considerado 100°C, temperatura base para un tiempo inicial de proceso $t = 0$, por debajo de la cual no existen alteraciones significativas en la estructura de los polisacáridos de esta biomasa. Estrictamente hablando, en un proceso de autohidrólisis, cada tipo de biomasa y sus fracciones tendrán distintos valores de w . Este parámetro se define por la expresión, Ec. 3.6, donde R es la constante de los gases, y E_a la energía de activación aparente.

$$w = \frac{R T_r^2}{E_a} \quad [3.6]$$

Para un gran número de biomazas lignocelulósicas se ha operado con un valor de w igual a 14,75 (Heitz *et al.*, 1987; Fernández-Bolaños *et al.*, 2001). El adoptar este valor implica asumir una energía de activación aparente de 78,4 kJ mol⁻¹, Ec.3.7

$$R_o = \int e^{\frac{T(t)-T_r}{14,75}} dt \quad [3.7]$$

Se define el factor de severidad, S , Ec. 3.8.

$$S = \log R_o \quad [3.8]$$

Para hidrólisis ácida a presión, utilizando ácido diluido, R_o se modificó para tener en cuenta la influencia del pH en la severidad del pretratamiento, utilizándose el factor de severidad combinado (FSC), Ec. 3.9,

$$FSC = \log R_o - pH \quad [3.9]$$

En este trabajo, para el cálculo concreto de la severidad se ha empleado la Ec. 3.10, es decir, la severidad global se determinó como suma de las severidades individuales de cada etapa.

$$R_o = (R_o)_{calen} + (R_o)_{enfr} \quad [3.10]$$

Para la región de calentamiento los valores de temperatura se ajustaron a una función lineal, $T(t) = a \cdot t + b$. De esta forma, la ecuación [3.7] se transforma en la ecuación 3.11,

$$(R_o)_{calen} = \frac{14,75}{a} \left(\exp \frac{a t_1 + b - 100}{14,74} - \exp \frac{b - 100}{14,75} \right) \quad [3.11]$$

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

En la zona en la que se produce el enfriamiento del reactor la función $T(t)$ que se ha usado para el ajuste de los datos experimentales es una ecuación polinómica de segundo ó tercer grado según el caso. Debido a la dificultad para resolver la integral analíticamente, en la Ec.3.7 se ha optado por aplicar un método de integración numérica (método de Simpson), donde t_1 y t_2 corresponden a los tiempos de comienzo y finalización de la etapa de enfriamiento, Ec. 3.12.

$$(R_o)_{enfr} = \int_{t_1}^{t_2} e^{\frac{T(t) - 100}{14,75}} \quad [3.12]$$

3.7 DESARROLLO DE LOS BIOPROCESOS

3.7.1 Fermentación

Los procesos de fermentación se han llevado a cabo utilizando un agitador orbital que permite estudiar simultáneamente diferentes variables de operación. En este trabajo se ha abordado el estudio de la temperatura de operación, *pH* de trabajo, nivel de aeración y naturaleza del sustrato.

Previo al comienzo del proceso de fermentación, ha sido necesario preparar el siguiente material:

- Matraces Erlenmeyer de plástico de 50 cm³ con tapón de rosca. En la boca de cada matraz se ha colocado un tapón de algodón hidrófilo envuelto en gasa. Se ha introducido en un pipetero ó envueltos en papel de filtro, impidiendo así la posible entrada de agua en el interior.

- Portafiltros de policarbonato, con filtro de membrana de nitrato de celulosa, 47 mm de diámetro y tamaño de poro 0,45 µm y prefiltro de lana de vidrio. Todo el conjunto se ha envuelto en papel de filtro y se ha introducido en el pipetero.

- Frascos de vidrio Pyrex vacíos, limpios y con agua ultrapura.

- Vasos de precipitado de diferentes capacidades envueltos en papel de filtro. También se han introducido en el pipetero.

- Pipetas de 5, 10 y 25 cm³, con ambas puntas cerradas mediante papel de aluminio, envueltas con papel de filtro e introducidas en el pipetero.

Tras ser esterilizado este conjunto en el autoclave a 121°C durante 30 min, a una sobrepresión de 117,7 kPa, se preparó disoluciones de medio de cultivo líquido (apartado 3.3.1.4). Una de éstas se ha destinado a preparar el medio de 25 g dm⁻³ del monosacárido que se va a fermentar con *H. polymorpha*. Su *pH* se ajustó a las condiciones establecidas usando un pHmetro y con disoluciones de ClH 0,1 M y NaOH 0,1 M, dispuestas previamente. En esta disolución ajustada se realizó la inoculación de la levadura (apartado 3.3.1.6).

Tras disponer de un volumen inicial (en torno a 50 cm³) en cada uno de los Erlenmeyer y mediante una balanza de precisión Mettler Toledo, Mod. AB204-S Fact Classic Plus, se pesó cada uno de éstos, incluido el tapón de algodón hidrófilo envuelto en gasa. Este dato ha servido para el cálculo del agua evaporada durante la fermentación. Ésta fue añadida de

forma externa hasta alcanzar ese peso inicial, Ec. 3.13. En todos los casos se adicionó del agua ultrapura esterilizada inicialmente a 121°C durante 30 min.

$$m_{at} = m_{eo} - m_{et} \quad [3.13]$$

siendo

m_{at} : masa de agua evaporada a tiempo t.

m_{eo} : masa total del Erlenmeyer a tiempo cero.

m_{et} : masa total del Erlenmeyer a tiempo t.

Tras limpiar y desinfectar con etanol absoluto toda la superficie y paredes del agitador orbital Ovan CLEAR C, Mod. IC10-CE, se introdujeron los Erlenmeyer en la cámara incubadora, estableciéndose las condiciones de temperatura y 100 rpm de agitación.

Para la toma de muestra en la fermentación, se limpió y desinfectó con etanol absoluto toda la superficie y paredes de la cabina de flujo laminar, para posteriormente mantener la luz ultravioleta durante 10 minutos y prender la mecha asegurando el ambiente aséptico. A continuación, se tomó un Erlenmeyer del interior de la cámara incubadora y se pesó en la balanza de precisión, m_{et} , añadiendo con una pipeta Pasteur estéril de 3 cm³ la cantidad de agua ultrapura esterilizada (m_{at}) hasta alcanzar su peso inicial (m_{eo}), Ec. 3.13, agitándose cuidadosamente para homogeneizar la mezcla. En un tubo estéril de 15 cm³, se centrifugaron 10 cm³ a 5.000 rpm durante 10 minutos, período tras el cual se vertió el sobrenadante en tubos estériles de 15 cm³, etiquetados respecto a condiciones de proceso, sustrato y tiempo transcurrido de fermentación. Se mantuvieron a -18°C hasta realizar la caracterización de sustratos (apartado 3.10), así como la determinación de bioproductos (apartado 3.11). Del volumen restante que quedó en el Erlenmeyer, se determinó la concentración celular (apartado 3.9.1), así como el *pH*.

3.7.2 Hidrólisis y fermentación simultánea (SFS)

Los procesos de hidrólisis y fermentación simultáneos (SFS) se han llevado a cabo en biorreactores discontinuos, tipo tanque agitado.

Previo al comienzo de los bioprocesos SFS, ha sido necesario la preparación del siguiente material:

- Biorreactores con columna de refrigeración, tapones de vidrio esmerilado, sistema de toma de muestra (goma de silicona para toma de muestra, pinza Hoffman) y varilla de

agitación magnética. Se ha cerrado con papel de aluminio cualquier posible entrada al interior y se ha envuelto el conjunto con papel de filtro.

- Portafiltros con filtro de acetato de celulosa, de 47 mm de diámetro y poro de 0,20 ó 0,45 μm , y prefiltros de lana de vidrio, que se ha envuelto en papel de filtro para introducirse en el pipetero.

- Frascos de vidrio Pyrex con agua ultrapura.

Tras esterilizar estos elementos en el autoclave a 121°C durante 30 minutos a una sobrepresión de 117,7 kPa, se desinfectó con etanol absoluto la superficie y paredes de la cabina de extracción de gases, ubicándose los baños de refrigeración, agitadores y cuentarrevoluciones. Con etanol absoluto se esterilizó la superficie y paredes de la cabina de flujo laminar, para posteriormente mantener la luz ultravioleta durante 10 minutos y seguidamente prender la mecha para asegurar el ambiente aséptico. El hidrolizado procedente de la hidrólisis ácida a presión (apartado 3.6.1), se vertió en un matraz Erlenmeyer de vidrio Pyrex de 1 dm³, que tras cerrarse con un tapón de algodón hidrófilo, se sometió a esterilización en el autoclave, durante 30 minutos a 110°C. En la balanza de precisión, en función del volumen total establecido para el biorreactor, se pesaron los nutrientes a la mitad de la concentración indicada por Lindegren *et al.* (1958), apartado 3.3.1.4. Éstos se vertieron en el hidrolizado esterilizado y se agitó la mezcla con el fin de conseguir una máxima homogenización. A continuación se ajustó su *pH* a las condiciones establecidas usando disoluciones de KOH 10 M y H₂SO₄ 5 M previamente preparadas, ya que los hidrolizados obtenidos tienen un carácter muy ácido y ha sido necesario realizar una neutralización previa. La concentración de la disolución de KOH es alta para evitar la dilución de los azúcares en el proceso de neutralización.

Dentro de la cabina de flujo laminar se ha llevado a cabo la inoculación del microorganismo en el reactor, apartado 3.3.1.6. Mediante puntas estériles y micropipetas se añadieron al reactor la cantidad necesaria de la enzima celulasa [EC 3.2.1.4] y β -glucosidasa [EC 3.2.1.21]. Estos volúmenes se han calculado en función de las actividades enzimáticas, apartado 3.3.2.2, que están relacionadas con la masa en base seca del material lignocelulósico sometido a hidrólisis ácida a presión, y por tanto, indirectamente, con la humedad y materia volátil del mismo, apartado 3.8.1. El volumen total final dispuesto a tiempo cero en el biorreactor corresponde al volumen de hidrolizado, agua ultrapura esterilizada añadida en su caso, volumen de suspensión de levadura y volumen enzimático. Por tanto, la concentración inicial de biomasa en el biorreactor, $[I]_{B_0}$, se calcula según ecuación 3.14:

$$[I]_{Bo} = \frac{[I] V_i}{V_o} \quad [3.14]$$

siendo $[I]$ la concentración de inóculo (g dm^{-3}), determinada según se indica en el apartado 3.9.1; V_i el volumen de inóculo introducido en el biorreactor (cm^3) y V_o el volumen total de comienzo en el vaso de cultivo (cm^3).

Los biorreactores se situaron sobre un agitador magnético en la cabina de extracción de gases y se montó el resto de la instalación, según apartado 3.5.2. Establecida una velocidad de agitación de 500 rpm en el agitador, usando el medidor de revoluciones, se consideró el momento de inicio del proceso SFS. La toma de muestra, tanto a tiempo inicial como a lo largo del proceso, se ha llevado a cabo tal y como se indica a continuación:

1. Tras detener la agitación, se mantuvo el biorreactor estable durante 5 minutos para conseguir una separación de la mezcla sólido-líquido por decantación, depositándose la fase sólida en el fondo.
2. Se abrió la pinza Hoffman, y mediante una jeringa estéril de 5 cm^3 , se extrajeron aproximadamente 10 cm^3 del interior del biorreactor que se vertieron en un tubo estéril de 15 cm^3 . Una vez cerrado, se reanudó de nuevo la agitación. Parte de la muestra extraída se ha utilizado para llevar a cabo la determinación del crecimiento celular, según apartado 3.9.
3. Se midió el pH de un pequeño volumen de la muestra y a partir de este valor, se ha ajustado mediante las disoluciones preparadas de KOH 10 M y H_2SO_4 5 M, el contenido del biorreactor a las condiciones de pH inicialmente establecidas del proceso de SFS.
4. Usando la placa calefactora se calentó agua en un vaso de precipitado hasta 70°C y se introdujo el tubo estéril con la toma de muestra restante, manteniéndose durante 10 minutos con el fin de detener la actividad de los enzimas existentes en la misma.
5. En una centrifuga refrigerada Jouan, Mod. MR 1822, se centrifugó la muestra a 5.000 rpm durante 10 minutos, vertiéndose el sobrenadante en tubos esterilizados. Éstos se etiquetaron respecto a tiempo transcurrido de proceso así como condiciones de operación y se mantuvieron a baja temperatura (-18°C), con el fin de posteriormente poder llevar a cabo una caracterización de sustratos (apartado 3.10), así como la determinación de bioproductos (apartado 3.11).

Durante el proceso de SFS existe una disminución del volumen interior del biorreactor, ΔV (en cm^3), que es debida tanto a la toma de muestras, $V_{\text{extraído}}$ (en cm^3), como a un fenómeno de evaporación de agua. Ésta última se produce en función de la velocidad de evaporación constante, v_{evap} ($\text{cm}^3 \text{h}^{-1}$) y del tiempo transcurrido, t (h). Esta pérdida de agua se ha repuesto adicionando externamente agua ultrapura esterilizada en autoclave a 121°C durante 30 minutos, Ec. 3.15:

$$\Delta V = v_{\text{evap}} t + \sum V_{\text{extraído}} \quad [3.15]$$

Mediante un agitador magnético, y utilizando una varilla de agitación, se han asegurado las condiciones homogéneas en el interior del reactor. La relación agitación/volumen dentro del biorreactor se ha mantenido constante durante todo el experimento de fermentación, es por ello que dicha velocidad fue reduciéndose a medida que disminuyó el volumen en el vaso de cultivo, concretamente 50 rpm por cada 50 cm^3 . Finalizado el proceso de SFS, se virtió el contenido del biorreactor en probetas para obtener el volumen total. Tras unos minutos, se separaron por decantación la fase sólida de la líquida, con lo que se determinaron los volúmenes de éstas.

Para caracterizar el material lignocelulósico tras el proceso de SFS, se ha tomado un embudo büchner con papel de filtro en su interior y tras introducirlo en un matraz kitasato y conectar el conjunto a una bomba de vacío, se virtió el contenido del vaso del biorreactor a través del filtro del embudo, quedándose retenida la fase sólida en el papel de filtro. A continuación, se extrajo el papel con el material lignocelulósico del filtro y se dejó secar durante un mínimo de 72 h, Fig. 3.16. Tras



Figura 3.16 Material lignocelulósico 72 h tras el proceso de SFS.

separar cuidadosamente el material lignocelulósico del papel de filtro, se introdujo en un recipiente con cierre hermético y se conservó en un lugar limpio y fresco para posteriormente caracterizarlo, apartado 3.8.

Como experimento control se ha realizado solo la fermentación del hidrolizado a presión (FHP-pH2) sin el uso enzimas. Este hidrolizado procede de dos hidrólisis a presión, A1 y A2, En este caso, los hidrolizados obtenidos tras el pretratamiento de hidrólisis a presión (apartado 3.6.1) se sometieron a un proceso de filtración con objeto de separar la fracción sólida. Para ello se tomó un embudo büchner con papel de filtro en su interior y tras

introducirlo en un matraz kitasato y conectar el conjunto a una trompa de vacío, se vertió el hidrolizado a través del filtro del embudo, quedándose retenida la fase sólida en el papel de filtro. A continuación, se extrajo el papel con el material lignocelulósico del filtro y se dejó secar durante un mínimo de 72 h. Tras separar cuidadosamente el material lignocelulósico del papel de filtro, se introdujo en un recipiente con cierre hermético y se conservó en un lugar limpio y fresco para posteriormente caracterizarlo, apartado 3.8.

Las fases líquidas de los hidrolizados se unieron y fueron destinadas al proceso de fermentación con *H. polymorpha*, llevada a cabo en biorreactores discontinuos, tipo tanque agitado.

3.8 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

En la caracterización fisicoquímica se han determinado los contenidos en humedad y materia volátil, hemicelulosa, celulosa, lignina, cenizas y extractos. El contenido en extractos se calculó por diferencia hasta 100, teniendo en cuenta los porcentajes de humedad, celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas anteriormente determinados.

3.8.1 Humedad y materia volátil (*HMV*)

Para la determinación de humedad y materia volátil presentes en el subproducto se ha seguido la norma TAPPI T 11 m-59. Se ha calculado a partir de la pérdida de masa que experimenta la muestra cuando se somete a una temperatura de $105 \pm 1^\circ\text{C}$, durante un tiempo suficiente hasta alcanzar una pesada constante.

El crisol de porcelana limpio ha permanecido en la estufa Memmert, Mod. UE 500, durante un tiempo determinado para eliminar toda humedad existente en el mismo. A continuación, se ha mantenido durante 15 minutos en un desecador, que dispone de gel de sílice como elemento desecante, hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se pesó el crisol vacío (m_c) en la balanza de precisión, y una vez tarado, se ha tomado aproximadamente 1 g de muestra húmeda (m_o). La muestra se secó en estufa a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h y se llevó al desecador durante 15 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente, momento en el que se pesó en la balanza de precisión. Se introdujo de nuevo en la estufa durante mínimo 1 hora y se repitió el procedimiento descrito hasta que dos pesadas consecutivas diesen el mismo valor ó bien que la diferencia de ambas con respecto al valor medio no excediera del 0,05%, considerándose como pesada constante la última pesada (m_f). Finalmente, el contenido en humedad y materia volátil (*HMV*) se ha determinado, en %, mediante la expresión, Ec. 3.16:

$$HMV = \frac{m_o - (m_f - m_c)}{m_o} 100 \quad [3.16]$$

3.8.2 Fibra Neutro Detergente (*FND*)

Para su determinación se ha seguido el método propuesto por Van Soest y Wine (1967). La FND es la fracción insoluble, correspondiente a lignina, celulosa y hemicelulosa, que se obtiene tras someter una muestra a ebullición lenta con disolución neutro detergente. La

fracción soluble está constituida por sustancias fácilmente asimilables como azúcares sencillos y otras materias solubles en agua.

La disolución neutro detergente se ha preparado, haciendo uso de un granatario cuando proceda, tal y como se especifica a continuación:

1. En un pequeño volumen de agua ultrapura, se han disuelto 37,2 g de ácido etilenodiaminotetracético sal disódica dihidratada y 16,2 g de sodio tetraborato decahidratado. Para facilitar la disolución de los solutos, se calentaron ligeramente mediante la placa calefactora.
2. Se adicionaron 60 g de lauril sulfato sódico a la disolución anterior junto con 20 cm³ de etilenglicol.
3. Se han disuelto 33,0072 g de sodio fosfato monoácido dodecahidrato en un pequeño volumen de agua ultrapura.
4. Finalmente, se mezclaron ambas disoluciones y se enrasaron a un volumen final de 2 dm³ con agua ultrapura, agitando con el fin de homogeneizar la disolución neutro detergente.

La placa porosa limpia ha permanecido en la estufa durante un cierto tiempo para eliminar toda humedad existente en el mismo. A continuación, se ha mantenido durante 15 minutos en el desecador, hasta alcanzar la temperatura ambiente. En la balanza de precisión se pesó la placa porosa (m_p), y una muestra de 1 g aproximadamente de material lignocelulósico seco o de humedad conocida (m_s). Ésta se introdujo en un matraz de fondo



Figura 3.17 Determinación de FND. Ebullición con condensación a reflujo.

esférico con capacidad de 500 cm³, junto con 0,5 g de sulfito sódico, 100 cm³ de la disolución neutro detergente y algunas gotas de pentanol como agente antiespumante. Tras añadir al matraz un par de anillos Raschig, el conjunto se ha sometido a ebullición durante 1 h manteniendo constante el volumen mediante un condensador de reflujo, Fig. 3.17.

Se ha acoplado la placa porosa adecuadamente a un matraz kitasato y, tras conectar el conjunto a una trompa de vacío del laboratorio, se filtró el contenido del matraz a través de la placa, lavándose varias veces con agua destilada caliente y finalmente con acetona. A continuación, se mantuvo la placa porosa con el material filtrado en la estufa a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ en

durante un período entre 16 y 24 h hasta pesada constante (m_{FND}). La determinación del contenido en fibra neutro detergente (FND), en %, se realiza según Ec. 3.17:

$$FND = \frac{m_{FND} - m_p}{m_s} 100 \quad [3.17]$$

3.8.3 Fibra Ácido Detergente (FAD)

Para su determinación se ha seguido también el método propuesto por Van Soest y Wine (1967). 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 a la hemicelulosa, ya que estas sustancias son fácilmente despolimerizables por este disolvente.

La disolución ácido detergente se ha preparado tal y como se indica a continuación:

1. Se ha tomado el volumen de ácido sulfúrico necesario para preparar 1 dm³ de disolución 0,5 M.
2. Con una balanza de precisión, se pesó 20 g de bromuro de hexadeciltrimetilamonio, y se ha disuelto en el volumen anterior.
3. Finalmente, se ha enrasado la disolución hasta 1 dm³ y se agitó para homogeneizar la mezcla.

La placa porosa limpia ha permanecido en la estufa durante un cierto tiempo para eliminar toda humedad existente en el mismo. A continuación, se ha mantenido durante 15 minutos en el desecador, hasta alcanzar la temperatura ambiente y la humedad de equilibrio. En la balanza de precisión se pesó la placa porosa (m_p), y una muestra de 1 g aproximadamente de material lignocelulósico seco ó de humedad conocida (m_s). Ésta se introdujo en un matraz de fondo esférico con capacidad de 500 cm³, junto con 100 cm³ de la disolución ácida detergente y algunas gotas de pentanol como agente antiespumante. Tras añadir al matraz un par de anillos Raschig, el conjunto se ha sometido a ebullición durante 2 h manteniendo constante el volumen mediante un condensador de reflujo, Fig. 3.18.



Figura 3.18 Determinación de FAD. Ebullición con condensación a reflujo.

Se ha acoplado la placa porosa adecuadamente a un matraz kitasato y, tras conectar el conjunto a una trompa de vacío, se filtró el contenido del matraz a través de la placa, lavándose varias veces con agua destilada caliente, y finalmente con acetona. Se mantuvo la placa porosa con el material filtrado en la estufa a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un período entre 16 y 24 h hasta pesada constante (m_{FAD}). La determinación del contenido en fibra ácido detergente (FAD), en %, se ha realizado de acuerdo a la siguiente expresión, Ec. 3.18:

$$FAD = \frac{m_{\text{FAD}} - m_p}{m_s} 100 \quad [3.18]$$

3.8.4 Lignina ácido insoluble (LAI)

Esta determinación se ha llevado a cabo aplicándose la norma TAPPI T 222 os-74, según la cual la lignina se define como el constituyente de la madera, ó biomasa, insoluble en ácido sulfúrico al 72% (*p/p*). La lignina es una resina aromática amorfa que contiene grupos metoxi e hidroxilo.

Se ha rellenado con lana de vidrio el interior de la placa porosa limpia y se ha introducido en la estufa durante cierto tiempo para eliminar toda humedad existente en la misma. Se mantuvo durante 15 minutos en el desecador, hasta alcanzar la temperatura ambiente. En la balanza de precisión se pesó la placa porosa (m_{pi}) y, tras tarar un vaso de precipitado de 100 cm^3 , una muestra de 1 g aproximadamente de material lignocelulósico seco ó de humedad conocida



Figura 3.19 Determinación de LAI. Ebullición con condensación a reflujo.

(m_s). A esta muestra se le adicionó 15 cm^3 de ácido sulfúrico al 72% (*p/p*), y se cubrió con parafilm. Se mantuvo 2 h a 20°C en un baño de agua, agitándose frecuentemente, a fin de conseguir la dispersión del material. Posteriormente, se introdujo en un matraz de fondo esférico con capacidad de 1.000 cm^3 , donde se llevó hasta un volumen total de 575 cm^3 mediante agua ultrapura. Tras añadir al matraz un par de anillos Raschig, el conjunto se ha sometido a ebullición durante 4 h manteniendo constante el volumen mediante un condensador de reflujo, Fig. 3.19. A continuación, se ha dejado que el material insoluble (lignina) precipitase.

Se acopló la placa porosa adecuadamente a un matraz kitasato y, tras conectar el conjunto a una trompa de vacío, se filtró el contenido del matraz a través de la placa filtrante provista de lana de vidrio, lavándose varias veces con agua destilada caliente. Esta lana de vidrio impide que la lignina forme dispersiones coloidales que obstruyan los poros de la placa. Después, se ha mantenido la placa porosa con la fracción insoluble en la estufa a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un período entre 16 y 24 h hasta pesada constante (m_{LAI}). La determinación del contenido en lignina (LAI), en %, se ha realizado según Ec. 3.19:

$$LAI = \frac{m_{LAI} - m_{pl}}{m_s} 100 \quad [3.19]$$

A partir de los contenidos en FND , FAD y LAI se ha podido determinar los porcentajes de las fracciones celulósica (CEL) y hemicelulósica (HEM) presentes en el material lignocelulósico, según Ec. 3.20 y 3.21.

$$CEL = FAD - LAI \quad [3.20]$$

$$HEM = FND - FAD \quad [3.21]$$

3.8.5 Cenizas (CEN)

Esta determinación se ha llevado a cabo aplicándose la norma TAPPI T 15 os-58. Se entiende por cenizas, ó materia mineral, el residuo que queda tras someter la muestra a una temperatura de $575 \pm 25^\circ\text{C}$ durante el tiempo necesario para incinerar la materia orgánica ó residuo carbonoso; este tiempo es del orden de unas tres horas, aunque puede ser modificado para garantizar que el residuo final resultante tenga color blanco. Las cenizas constituyen una medida del contenido en sales minerales de la muestra.

Previamente, se ha procedido a la determinación de la HMV , en %, de aproximadamente 1 g de muestra húmeda (m_o), según apartado 3.8.1. El crisol (m_c) y la muestra exenta de humedad (m_s) se ha introducido en un horno de mufla Hobersal, Mod. HD 230, donde ha permanecido a 575°C durante 4 h, tiempo que garantiza una calcinación completa del residuo. Tras extraer el crisol del horno, se mantuvo en el desecador 30 minutos como mínimo hasta alcanzar temperatura ambiente, momento en el que se procedió a su pesada en la balanza de precisión, m_{CEN} . El porcentaje en cenizas se ha determinado finalmente mediante la expresión, Ec. 3.22:

$$CEN = \frac{m_{CEN} - m_c}{m_s} 100 \quad [3.22]$$

3.9 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR

Para realizar un seguimiento de la evolución del cultivo con el tiempo se han determinado dos parámetros: concentración celular y contaje de células en microscopio óptico.

3.9.1 Concentración celular

Para el cálculo de este parámetro se ha utilizado una recta de calibrado previamente obtenida, que relaciona el peso seco de biomasa con la absorbancia de la suspensión celular medida a una longitud de onda de 620 nm. Esta recta de calibrado obtenida para *H. polymorpha* fue obtenida en experimentos previos (Moya, 1997), Ec. 3.23.

$$x = 0,215 A_{620} - 4,53 \cdot 10^{-3} \quad [3.23]$$

siendo,

x: concentración de biomasa, g dm⁻³.

A₆₂₀: absorción a λ = 620 nm de las muestras frente al blanco.

Para llevar a cabo la medida de la absorbancia de la suspensión de células de levadura, se ha utilizado un espectrofotómetro UNICAM, Mod. UV-VIS UV2, de doble haz. A partir del valor obtenido de la absorbancia de las muestras frente al blanco, se ha sustituido en la recta de calibrado con el fin de calcular la concentración de biomasa a ese tiempo. Estas muestras pueden estar diluidas mediante medio de cultivo de Lindegren *et al.* (1958), con lo que la concentración de biomasa se obtiene tras aplicar el factor de dilución.

3.9.2 Contaje celular

Cuando se trata de una suspensión exenta de contaminación (fundamentalmente bacterias y hongos), el crecimiento celular puede determinarse mediante el recuento de células de *H. polymorpha* observadas a través de un microscopio Olympus, Mod. CHS, utilizando una cámara de contaje Neubauer, Fig. 3.20. Se trata de una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, 30 x 70 x 4 mm³. Posee dos zonas de contaje deprimidas 0,1 mm respecto a la superficie, con un cuadrado marcado en el fondo de 3 x 3 mm², subdividida a su vez en 9 cuadrados de 1 mm de lado cada uno. En cada zona de contaje, se distinguen 16 cuadrículas, Fig. 3.21. Cada cuadrícula está constituida por 16 cuadrillos. El área de cada cuadrillo es 0,05 x 0,05 = 0,0025 mm².

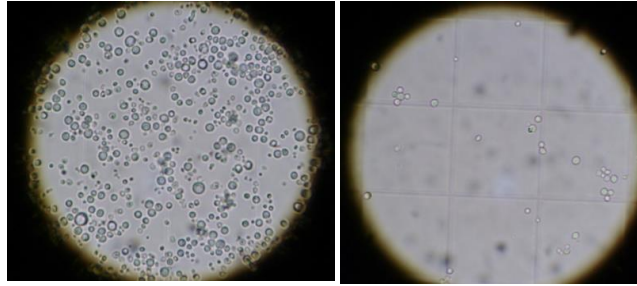


Figura 3.20 Imágenes al microscopio que muestran crecimiento celular de *H. polymorpha* sin existencia de contaminación.

Tras depositar la muestra en ambas zonas de contaje del portaobjetos, se colocó el cubreobjetos de cristal de dimensiones 22 x 22 mm. Se situó el foco en la zona superior de contaje, y se enfocó sobre la superficie dividida por 16 cuadrículas, dividida a su vez en 16 cuadrillos. A continuación, se ha realizado el recuento celular en cada una de las cuadrículas,

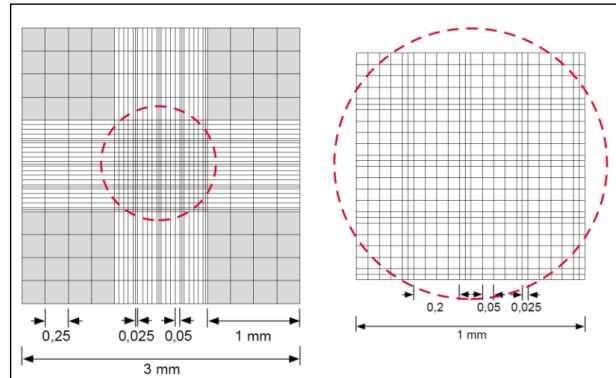


Figura 3.21 Detalle de la rejilla de recuento de la cámara de Neubauer.

mediante el contaje celular de su diagonal, es decir, 4 cuadrillos por cuadrícula. Tras proceder de igual forma con la zona pendiente, se sumó el total de células contadas, $N_{\text{células}}$. A partir de este valor se ha podido determinar la concentración celular de la muestra (N), Ec. 3.24. Considérese que el número de cuadrillos donde se realiza el recuento por zona es 64, y que existen dos zonas de contaje; el volumen de cada cuadrillo es el producto de su superficie ($0,0025 \text{ mm}^2$) por su depresión ($0,1 \text{ mm}$).

$$N = \frac{\text{Número de células}}{\text{dm}^3} = \frac{N_{\text{células}}}{32} 10^9 F_{\text{dilución}} \quad [3.24]$$

siendo $F_{\text{dilución}}$ el factor de dilución de la muestra.

Esta cámara de recuento también permite evaluar el tamaño de las células, siempre que no exista formación de colonias.

3.10 CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATOS

3.10.1 Azúcares. Cromatografía líquida iónica de alta resolución HPLIC

El equipo utilizado es de la firma DIONEX, Mod. ICS-3000. Básicamente se trata de un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, bomba, inyector, precolumna, columna de separación y detector amperiométrico. La muestra acondicionada pasa previamente por la precolumna (Dionex, Mod. CarboPack PA10 Guard, 4x50 mm), después por la columna (Dionex, CarboPack PA10 Analytical, 4x250 mm) a través de la fase fija ó estacionaria con la que es inmisible mediante el bombeo de la fase móvil (líquido) a alta presión. La muestra a analizar se ha introducido en pequeñas cantidades (10 mm³) y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas con la fase estacionaria a medida que avanzan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra en la columna depende de diferentes factores:

- Naturaleza del compuesto.
- Composición de la fase estacionaria.
- Fase móvil.

3.10.1.1 Parámetros del equipo

Los parámetros que se han fijado cuando se operó en el HPLIC son los siguientes:

- Caudal de la fase móvil: 1 cm³ min⁻¹.
- Presión de la bomba: 2.870 psi.
- Volumen inyectado de muestra: 10 mm³.
- Temperatura de la columna: 30°C.
- Naturaleza y concentración de las disoluciones que constituyen la fase móvil:
 - Frasco A y D: Agua ultrapura.
 - Frasco B: Disolución acuosa de NaOH, utilizando como reactivo hidróxido sódico al 50%, calidad HPLC. Concretamente, se ha tomado 4,71 cm³ de disolución de NaOH al 50% y se ha enrasado a 1 dm³.

- Frasco C: Disolución acuosa de NaOH, usando como reactivo hidróxido sódico al 50%, calidad HPLC. En este caso, se ha tomado 15 cm³ de disolución de NaOH al 50% y se ha enrasado a 1 dm³.

3.10.1.2 Patrones de calibración

Para la correcta calibración del equipo se ha establecido un intervalo de concentración del componente a determinar en la muestra. En nuestro experimento se han realizado 4 disoluciones patrón de diferentes concentraciones en alcoholes (xilitol y arabitol), así como también azúcares (D-arabinosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-galactosa, D-manosa y D-fructosa), utilizando como disolvente agua ultrapura, Tabla 3.14.

Tabla 3.14
CARACTERIZACIÓN DE AZÚCARES CON HPLIC
Disoluciones patrón HPLIC

Analito	Concentración, g dm ⁻³			
	Patrón 1	Patrón 2	Patrón 3	Patrón 4
Xilitol	0,10	1,00	2,00	10,00
Arabitol	0,10	1,00	2,00	10,00
D-arabinosa	0,25	2,50	5,00	10,00
L-arabinosa	0,25	2,50	5,00	10,00
D-galactosa	0,10	1,00	2,00	5,00
D-glucosa	1,00	10,00	20,00	40,00
D-xilosa	0,50	5,00	10,00	20,00
D-manosa	0,10	1,00	2,00	20,00
D-fructosa	0,02	0,05	0,20	0,50

A partir de la medida estos patrones en el HPLIC, y conocidas sus concentraciones en dichos componentes, se ha obtenido una curva y recta de calibración asociada a cada uno de ellos que describe la relación entre la concentración del componente y la respuesta del detector amperiométrico del HPLIC.

3.10.2 Método de Miller para azúcares reductores totales

Mediante este método se calcula la concentración de azúcares reductores totales existentes en una disolución. Está basado en la reacción entre el grupo reductor aldehído de los azúcares y el reactivo dinitrosalicílico (DNS) que origina un compuesto coloreado (ácido

3-amino-5-nitrosalicílico) en una reacción 1:1 cuya concentración, y por tanto la de los azúcares reductores presentes, puede determinarse aplicando un método fotocolorimétrico, Miller (1959).

Para la obtención del reactivo DNS se ha pesado cada uno de los componentes mediante la balanza de precisión ó el granatario, según proceda, Tabla 3.15. Tras preparar el volumen necesario de disolución de NaOH al 2% (*p/V*), se le ha añadido los reactivos en el siguiente orden: fenol, ácido 3-5 dinitrosalicílico y finalmente el sulfito sódico. A continuación, se diluyó con agua ultrapura hasta alcanzar aproximadamente 3/4 partes del volumen total de reactivo DNS. Tras añadir una varilla de agitación magnética y cubrir el vaso que contiene la disolución con un papel de aluminio, se situó el conjunto sobre un agitador magnético, creando un vórtice adecuado con el fin de homogeneizar la mezcla. Este sistema se ubicó en lugar protegido de la luz, a una temperatura entre 18 y 20°C, manteniéndose la agitación durante 24 h. Una vez transcurrido ese tiempo y asegurándose la perfecta disolución de todos los reactivos, se enrasó hasta el volumen final con agua ultrapura. El reactivo DNS se ha mantenido dentro de un bote cerrado, que impida el paso de la luz y en sitio fresco.

Tabla 3.15
CARACTERIZACIÓN DE AZÚCARES CON MÉTODO DE MILLER
Composición del reactivo DNS, Miller (1959)

Reactivos	Concentración, g dm ⁻³
Ácido 3, 5-dinitrosalicílico	10,0
Fenol	2,0
Sodio y potasio tartrato hidratado	200,0
Sulfito sódico anhidro	0,5
Disolución de hidróxido sódico al 2% (<i>p/V</i>)	500,0

Este método requiere la determinación de una recta de calibrado, es decir, la expresión matemática lineal, que relaciona la concentración en azúcares reductores totales en la muestra (*ART*), expresado en g dm⁻³, con su absorbancia a $\lambda = 640$ nm (A_{640}), Ec.3.25,

$$ART = r A_{640} + s \quad [3.25]$$

siendo *r* y *s* constantes empíricas. Para obtener dicha expresión se han utilizado disoluciones de concentración conocida ó patrón de D-arabinosa ó D-xilosa, Tabla 3.16.

Tabla 3.16
CARACTERIZACIÓN DE AZÚCARES CON MÉTODO DE MILLER
Disoluciones de concentración conocida para determinar
la recta de calibrado en el método Miller

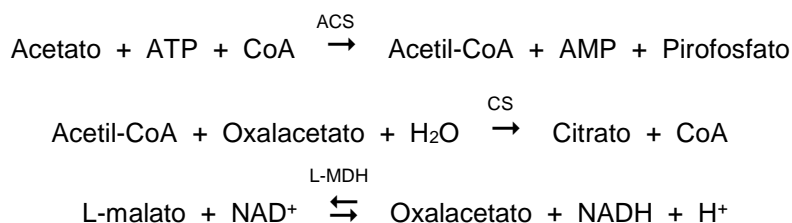
Disolución	[D-xilosa] ó [D-arabinosa], g dm ⁻³
Disolución madre	1,00
Patrón nº 1	0,05
Patrón nº 2	0,10
Patrón nº 3	0,25
Patrón nº 4	0,40
Patrón nº 5	0,50

La determinación de *ART* según este método se realizó según se indica a continuación:

1. En un tubo de ensayo de vidrio de 15 cm³ se añadieron 2 cm³ de patrón, muestra ó agua ultrapura, según sea el caso. Posteriormente, se adicionó a cada tubo 3 cm³ de reactivo DNS.
2. Se introdujo el conjunto en un baño de agua calentada previamente a 80 – 85°C utilizando una placa calefactora, manteniéndose durante 10 minutos. A continuación, se dejó enfriar dentro de un baño de hielo durante 10 minutos.
3. Utilizando el espectrofotómetro UV-VIS, de doble haz, se midió la absorbancia frente al blanco, a una longitud de onda de 640 nm, de los tubos de ensayo referidos a muestras y disoluciones patrón.
4. A partir de los datos de absorbancia de las disoluciones de concentración conocida se obtuvo la recta de calibrado (Ec. 3.25). A continuación, se sustituyó las absorbancias de la muestra en dicha expresión obteniéndose el valor de la concentración en *ART*.

3.10.3 Ácido acético

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



El ácido acético (acetato) es convertido a acetil-CoA en presencia del enzima acetil-CoA sintetasa (ACS), también conocido como acetato tioquinasa, en presencia de adenosín-5-trifosfato (ATP) y coenzima A (CoA). El ATP pasa a adenosín-monofosfato (AMP). Seguidamente, el acetil-CoA reacciona con oxalacetato en presencia del enzima citrato sintasa (CS), produciendo citrato. El oxalacetato requerido se obtiene de la reacción entre el L-malato y el dinucleótido nicotinamida-adenina (NAD) en presencia del enzima L-malato deshidrogenasa (L-MDH), reduciéndose el NAD⁺ a NADH. La determinación de la concentración de ácido acético está basada en la formación de NADH, medido por el aumento de la absorción de luz en el espectrofotómetro a $\lambda = 340 \text{ nm}$.

Utilizando el reactivo enzimático para determinación de ácido acético de la firma Böehringer Mannheim, se ha seguido el siguiente procedimiento:

1. En una cubeta de 1 cm de paso de luz se introdujo 0,5 cm³ de tampón trietanolamina-malato (pH = 8,4), y 0,1 cm³ de la disolución que contiene ATP, CoA y NAD.
2. Se añadió 0,05 cm³ de muestra seguida de 0,95 cm³ de agua ultrapura. En el caso del blanco, sólo se ha añadido 1 cm³ de agua ultrapura.
3. A continuación, se cubrieron las cubetas con parafilm y se agitaron cuidadosamente, midiendo posteriormente en el espectrofotómetro UV-VIS, de un solo haz, la absorbancia a $\lambda = 340 \text{ nm}$, tanto de la muestra (A_{A0}) como del blanco (A_{B0}).
4. Se adicionó 0,005 cm³ de la suspensión L-MDH y CS, cubriendo posteriormente las cubetas con parafilm para agitarse cuidadosamente. Pasados 3 minutos, se midió en el espectrofotómetro UV-VIS, la absorbancia a $\lambda = 340 \text{ nm}$ tanto de la muestra (A_{A1}) como del blanco (A_{B1}).
5. Posteriormente, se añadió 0,010 cm³ de ACS para empezar la reacción y tras cubrir las cubetas con parafilm, se agitaron cuidadosamente, esperando 15 minutos

para que completar la reacción. Finalmente, se midió en un espectrofotómetro UV-VIS, la absorbancia a 340 nm, tanto de la muestra (A_{B2}) como del blanco (A_{AB2}).

La concentración de ácido acético no es directamente proporcional a la del NADH producido, Ec. 3.26:

$$Ac = \frac{V_F \cdot PM_{Ac}}{\epsilon_{Ac} \cdot K \cdot V_m \cdot 1000} \Delta A_{Ac} \cdot F_{dilución} \quad [3.26]$$

donde:

Ac: concentración de ácido acético, g dm^{-3} .

V_F : volumen final, cm^3 .

PM_{Ac} : peso molecular del ácido acético, g mol^{-1} .

ϵ_{Ac} : coeficiente de absorción del NADH a $\lambda = 340$ nm, equivalente a $6,3 \text{ dm}^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

K: paso de luz de la cubeta, equivalente a 1 cm.

V_m : volumen de muestra, cm^3 .

$F_{dilución}$: factor de dilución de la muestra.

ΔA_{Ac} : se determina según la expresión, Ec. 3.27

$$\Delta A_{Ac} = [(A_{Ac2} - A_{Ac0}) - \frac{(A_{Ac1} - A_{Ac0})^2}{(A_{Ac2} - A_{Ac0})}] - [(A_{AcB2} - A_{AcB0}) - \frac{(A_{AcB1} - A_{AcB0})^2}{(A_{AcB2} - A_{AcB0})}] \quad [3.27]$$

Sustituyendo en Ec. 3.26, se simplifica la expresión, Ec. 3.28.

$$Ac = 0,3079 \Delta A_{Ac} \cdot F_{dilución} \quad [3.28]$$

3.10.4 Compuestos fenólicos totales (CFT)

Los polifenoles, antioxidantes naturales, contienen dos ó más radicales fenólicos y son atrapadores de radicales libres. En su mecanismo de reacción, el fenol se oxida a quinona y después a peróxido (-OOR), Fig. 3.22. El peróxido más sencillo es el peróxido de hidrógeno, H_2O_2 . Los peróxidos superiores se forman sustituyendo un hidrógeno por un resto R.

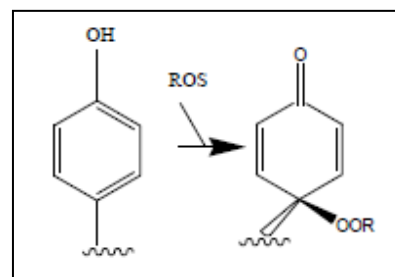


Figura 3.22 Mecanismo de reacción de los compuestos fenólicos.

Uno de los compuestos fenólicos básicos es el ácido gálico y sus derivados, Fig. 3.23. Este ácido, en forma de resto galoilo, se encuentra en la fracción de compuestos denominados colectivamente flavonoides, incluidos los taninos flavánicos. Todos poseen la estructura básica de 2-benzo-pirona. Otro compuesto fenólico muy común es el ácido cafeico que posee como grupo fenólico el catecol, Fig. 3.24.

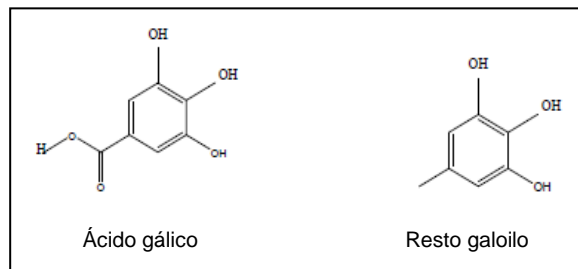


Figura 3.23 Estructura molecular del ácido gálico y el resto galoilo.

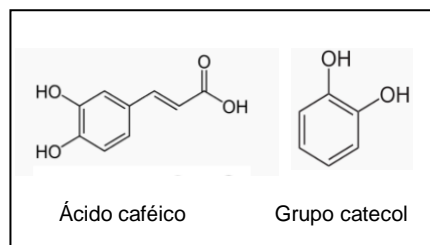


Figura 3.24 Estructura molecular del ácido cafeico y grupo catecol.

El contenido en compuestos fenólicos totales se ha determinado utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR) de acuerdo con un procedimiento que ha sido aplicado por diferentes grupos de investigación (Swain y Hillis, 1959; Singleton y Rossi, 1965). Se trata de modificaciones de un método desarrollado por Folin y Ciocalteu (1927) empleado para la determinación de tirosina, basado en la oxidación de los fenoles por un reactivo de molibdeno y wolframio (tungsteno). La mejora introducida por Singleton y Rossi fue el uso de un heteropolianión fosfórico de molibdeno y wolframio que oxida los compuestos fenólicos con mayor especificidad ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$ y $3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-14\text{WO}_3-4\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$).

El FCR contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico que reacciona con restos fenólicos presentes (ácido gálico y sus derivados, ácido cafeico, flavonoides, etc). La oxidación de los compuestos fenólicos presentes en la muestra lleva consigo la reducción de Mo^{6+} a Mo^{5+} , es decir, el ácido fosfomolibdotungstico de color amarillo, formado por las dos sales en el medio ácido, se reduce a un complejo de color azul intenso (Fig. 3.25) que presenta un máximo de absorción a 730 nm (Huang *et al.*, 2005). Éste se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido cafeico.

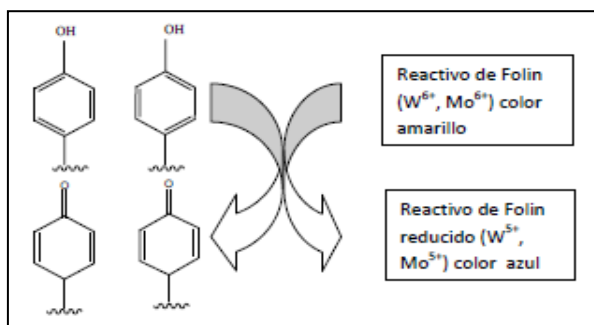


Figura 3.25 Mecanismo de reacción de reactivo Folin con fenoles

A partir de una disolución madre de ácido cafeico de concentración $0,5 \text{ g dm}^{-3}$ se preparó 7 disoluciones de menor a mayor concentración, utilizando agua ultrapura como disolvente, Tabla 3.17.

Tabla 3.17
CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATO. COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES
Preparación de las disoluciones de ácido cafeico
partiendo de una disolución madre de $0,5 \text{ g ac. cafeico dm}^{-3}$

Disolución	V _{dis. madre} cm ³	V _{final} cm ³	[ácido cafeico] mg dm ⁻³
1	1		$1 \cdot 0,5 / 0,1 = 5$
2	2		$2 \cdot 0,5 / 0,1 = 10$
3	5		$5 \cdot 0,5 / 0,1 = 25$
4	10	100	$10 \cdot 0,5 / 0,1 = 50$
5	15		$15 \cdot 0,5 / 0,1 = 75$
6	20		$20 \cdot 0,5 / 0,1 = 100$
7	25		$25 \cdot 0,5 / 0,1 = 125$

Para la obtención de la recta de calibrado de ácido cafeico se ha procedido de la misma forma que con cada una de sus disoluciones:

1. En un matraz aforado de 50 cm^3 , se añadió 5 cm^3 de disolución de ácido cafeico ó agua ultrapura si se refiere al blanco. A continuación, se adicionó 35 cm^3 de agua ultrapura y $2,5 \text{ cm}^3$ del FCR, agitándose bien para homogeneizar la mezcla.
2. Tras 3 minutos de reacción, se añadió 5 cm^3 de una disolución de NaOH al 5% (*p/V*) y se enrasó hasta 50 cm^3 con agua ultrapura. Tras homogeneizar la mezcla, se dejó en la oscuridad durante 45 minutos.

3. Mediante el espectrofotómetro UV-VIS de un solo haz, se midió la absorbancia a 725 nm (A_{725}) frente al blanco. A partir de estos resultados, y conociendo la concentración en ácido cafeico de cada una de las disoluciones, se ha podido determinar una recta de calibrado, Fig. 3.26. Se trata de una expresión matemática lineal que relaciona la concentración de compuestos fenólicos totales en la muestra (CFT), expresado en mg dm^{-3} , con el valor de su absorbancia frente al blanco, Ec. 3.29.

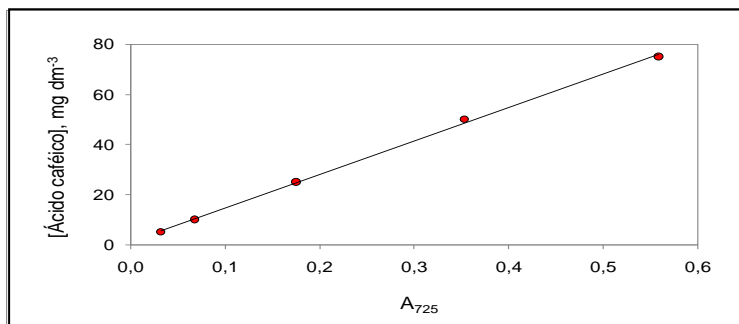


Figura 3.26 Concentración de ácido cafeico frente a su absorbancia a 725 nm. Ajuste que permite determinar la recta de calibrado entre ambos parámetros.

$$CFT = 133,73 A_{725} + 1,2519 \quad r^2 = 0,999 \quad [3.29]$$

Para la determinación de los compuestos fenólicos totales se ha procedido de la misma forma, pero en este caso, el volumen añadido inicialmente ha pertenecido a la muestra a analizar. A partir de este valor de absorbancia frente al blanco a 725 nm, y utilizando la recta de calibrado anteriormente calculada (Ec. 3.29), se obtuvo la concentración de CFT , en mg dm^{-3} .

3.10.5 Perfil de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se han determinado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un detector de espectrometría de masas, triple cuádrupolo, Varian Mod. 1200L. Se ha utilizado una columna Polaris Metachen, Mod. C18 (150 x 2 mm), con una precolumna del mismo tipo, operando a 30°C.

Básicamente, la preparación consiste en la disolución de las muestras en n-hexano y una extracción posterior con metanol, seguida de una nueva extracción en fase sólida

(usando un cartucho con relleno C-18). La muestra así preparada se inyecta en el HPLC utilizando como patrón interno *p*-bromofenol. El flujo ó caudal volumétrico utilizado ha sido de $0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, empleando como fase móvil A una disolución de agua ultrapura con un 0,1% de ácido fórmico, y como fase móvil B de metanol con un 0,1% de ácido fórmico. Se ha operado en gradiente pasando de un 90% inicial de fase móvil A hasta llegar a un tiempo final de 25 minutos con un 100% de fase móvil B. En definitiva,

Caudal de la fase móvil:	$0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$.
Volumen de muestra inyectado:	$5,0 \text{ mm}^3$.
Tiempo de análisis:	25 min.

En espectrometría de masas se ha utilizado una técnica conocida como ionización por 'electrosprays', en modo negativo.

3.10.6 Índice de inhibidores.

La degradación de la hemicelulosa deriva en hexosas, pentosas y ácido acético. A elevadas temperaturas y presiones, las hexosas y pentosas pasan a 5-hidroxi-metil-furfural (5-HMF) y furfural, respectivamente. Cuando ambos se degradan se forma ácido fórmico. El ácido levulínico se forma por la degradación de 5-HMF y los componentes fenólicos se generan por ruptura parcial de lignina (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). Todos son compuestos negativos para las etapas posteriores, inhibidores. Ciertos autores (Tada *et al.*, 2004) han verificado la relación existente entre concentración de inhibidores en una muestra y el valor de su absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, concretamente referida a furfural y 5-HMF. En ausencia de estos componentes, una muestra no determina señal alguna a esta longitud de onda.

Utilizando cubetas de cuarzo, se ha medido en un espectrofotómetro UV-VIS de doble haz, la absorbancia de la muestra frente al blanco (agua ultrapura) a 280 nm. El índice de inhibición (I) se ha determinado según la expresión, Ec. 3.30,

$$I = A_{280} F_{\text{dilución}} \quad [3.30]$$

siendo $F_{\text{dilución}}$ el factor de dilución en la muestra. Si además se tiene en cuenta la existencia de evaporación de agua a lo largo del tiempo hay que considerar a su vez el factor de evaporación, F_{evap} , en dicha expresión, Ec. 3.31.

$$I_1 = A_{280} F_{\text{dilución}} F_{\text{evap}} \quad [3.31]$$

El factor de evaporación se ha calculado según la expresión, Ec. 3.32,

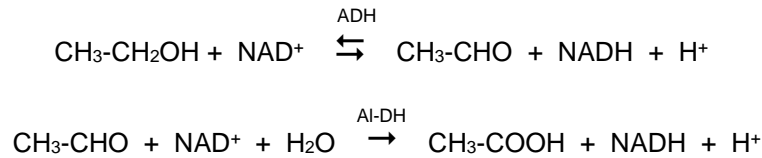
$$F_{\text{evap}} = \frac{V_t}{V_{\text{SE.t}}} \quad [3.32]$$

donde V_t es el volumen existente en el biorreactor a un tiempo t , y $V_{\text{SE.t}}$ el volumen sin considerar la pérdida por evaporación.

3.11 DETERMINACIÓN DE BIOPRODUCTOS

3.11.1 Etanol

El procedimiento que se ha seguido se basa en el método enzimático descrito por Beutler y Michal (1977) y Beutler (1984), que consta de las siguientes reacciones:



El etanol es oxidado a acetaldehído por NAD^+ mediante el 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 del enzima aldehído deshidrogenasa (Al-DH) [EC 1.2.1.5]. El dinucleótido nicotinamida-adenina en forma reducida (NADH) queda determinado a través de la medida de la absorbancia a $\lambda = 340 \text{ nm}$.

Utilizando un reactivo enzimático para determinación de etanol de la firma Böehringer Mannheim, se ha procedido de la siguiente forma:

1. Por cada 2 muestras previstas a analizar, se disolvió 1 tableta (4 mg NAD^+ y 0,8 unidades de actividad enzimática, U, de Al-DH) en 3 cm^3 de la disolución tampón de difosfato potásico de $\text{pH} = 9,0$.
2. En la cubeta de 1 cm de paso de luz se añadió 1,5 cm^3 de dicha disolución. A continuación, se adicionó 0,05 cm^3 de muestra ó 0,05 cm^3 de agua ultrapura en caso del blanco.
3. En un espectrofotómetro UV-VIS de un solo haz, se midió la absorbancia tanto de la muestra (A_{E1}) como del blanco (A_{EB1}) a 340nm.
4. A continuación, se añadió 0,025 cm^3 de la suspensión que contiene el enzima ADH y dejando completar la reacción durante 10 minutos. Finalmente, se midió en el espectrofotómetro UV-VIS de un solo haz la absorbancia a 340 nm, tanto de la muestra (A_{E2}) como del blanco (A_{EB2}).

La concentración de etanol se calcula según la expresión, Ec. 3.33.

$$E = \frac{V_F \cdot PM_E}{\epsilon_E \cdot K \cdot V_m \cdot 2000} \Delta A_E \cdot F_{\text{dilución}} \quad [3.33]$$

donde,

E : concentración de etanol, g dm⁻³.

V_F : volumen final, cm³.

PM_E : peso molecular del etanol, g mol⁻¹.

ϵ_E : coeficiente de absorción del NADH a $\lambda = 340$ nm, equivalente a 6,3 dm³ mM⁻¹ cm⁻¹.

K : paso de luz, cm.

V_m : volumen de muestra, cm³.

$F_{\text{dilución}}$: factor de dilución.

ΔA_E : se determina según la expresión Ec. 3.34:

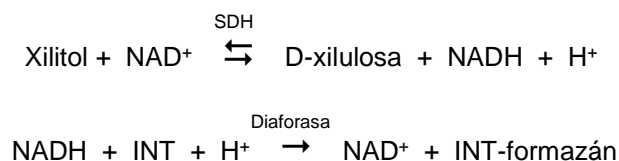
$$\Delta A_E = (A_{E2} - A_{E1}) - (A_{EB2} - A_{EB1}) \quad [3.34]$$

Sustituyendo en Ec. 3.33, se obtiene la expresión Ec. 3.35:

$$E = 0,113 \Delta A_E F_{\text{dilución}} \quad [3.35]$$

3.11.2 Xilitol

El procedimiento que se ha seguido se basa en el método enzimático descrito por Beutler y Becker (1977), que consta de las siguientes reacciones:



El xilitol es oxidado a D-xilulosa por el NAD⁺ mediante el enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH) [EC1.1.1.14], también llamado polialcohol deshidrogenasa, con formación de NADH. 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 mediante la retirada del NADH. Éste reduce cuantitativamente al cloruro de iodonitrotetrazolio (INT), C₁₉H₁₃ICIN₅O₂, hasta INT-formazán, C₁₉H₁₄IN₅O₂, en presencia del enzima diaforasa [EC 1.8.1.4]. La formación de INT-formazán se realiza a través de medidas de absorbancia a $\lambda = 492$ nm.

Utilizando un reactivo enzimático para determinación de xilitol/sorbitol de la firma Böehringer Mannheim, el procedimiento que se ha seguido sigue es el siguiente:

3. Materiales y métodos

1. En la cubeta de 1 cm de paso de luz, se ha adicionado 0,3 cm³ de la disolución tampón de fosfato potásico/trietanolamina de pH = 8,6, junto con 0,1 cm³ de disolución de diaforasa y NAD⁺, y 0,1 cm³ de disolución INT.
2. A continuación, se añadió 0,05 cm³ de muestra seguida de 0,95 cm³ de agua ultrapura. En el caso del blanco, se ha añadido directamente 1 cm³ de agua ultrapura.
3. En el espectrofotómetro UV-VIS de un solo haz, se midió la absorbancia a 492 nm tanto de la muestra (A_{Xi1}) como del blanco (A_{XiB1}).
4. Tras añadir 0,025 cm³ de SDH, se dejó completar la reacción durante 30 minutos. Finalmente, se midió en el espectrofotómetro UV de un solo haz la absorbancia a 492 nm, tanto de la muestra (A_{Xi2}) como del blanco (A_{XiB2}).

La concentración de xilitol se ha calculado mediante la expresión, Ec. 3.36.

$$X_i = \frac{V_F \cdot PM_{X_i}}{\varepsilon_{X_i} \cdot K \cdot V_m \cdot 1000} \Delta A_{X_i} F_{\text{dilución}} \quad [3.36]$$

donde,

X_i : concentración de xilitol, g dm⁻³.

V_F : volumen final, cm³.

PM_{X_i} : peso molecular del xilitol, g mol⁻¹.

ε_{X_i} : coeficiente de absorción del INT-formazán a 492 nm (19,9 dm³ mM⁻¹ cm⁻¹).

K : paso de luz, cm.

V_m : volumen de muestra, cm³.

$F_{\text{dilución}}$: factor de dilución.

ΔA_{X_i} : se determina según la expresión Ec. 3.37.

$$\Delta A_{X_i} = (A_{X_i2} - A_{X_i1}) - (A_{X_iB2} - A_{X_iB1}) \quad [3.37]$$

Sustituyendo los valores de cada uno de los parámetros en la Ec.3.36, se obtiene la expresión Ec. 3.38:

$$X_i = 0,2332 \Delta A_{X_i} F_{\text{dilución}} \quad [3.38]$$

3.11.3 Arabitol

Se determinó mediante cromatografía líquida iónica de alta resolución, apartado 3.10.1.

3.12 BIBLIOGRAFÍA

- Bailey M.J., Nevalainen K.M.H. (1981). Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulose. *Enzyme and Microbial Technology* **3**(2), 153-157.
- Bergmeyer H.U., Möllering H. (1974). Acetic acid. En: Methods of enzymatic analysis, Vol. 3, Bergmeyer H.U. (Ed.), Verlag Chemie (2ª Ed), Weinheim, pp.1520-1528.
- Beutler H.O., Michal G. (1977). Neue methode zur enzymatischen bestimmung von ethanol in lebensmitteln. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* **284**(2), 113-117.
- Beutler H.O., Becker J. (1977). Enzymatische bestimmung von D-sorbit und xylit in lebensmitteln. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **6**, 182-187.
- Beutler H.O. (1984). Ethanol. En: Methods of enzymatic analysis, Vol. 6, Bergmeyer H.U. (Ed.), Verlag Chemie (3ª Ed.), Weinheim, pp. 598-606.
- Cuevas M. (2007). Hidrólisis enzimática del hueso de aceituna. Fermentación de hidrolizados con levaduras. Tesis doctoral. Universidad de Jaén, Jaén.
- Fernández-Bolaños J., Felizón B, Heredia A., Rodríguez R., Guillén R., Jiménez A. (2001). Steam-explosion of olive stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresource Technology* **79**(1), 53-61.
- Folin O., Ciocalteu V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **73**, 627-650.
- Ghose T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* **59**, 257-268.
- Heitz M., Carrasco F., Rubio M., Brown A., Chornet E., Overend R.P. (1987). Physico-chemical characterization of lignocellulosic substrates pretreated via autohydrolysis: an application to tropical woods. *Biomass* **13**(4), 255-273.
- Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (6), 1841-1856.
- Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J., Stroeve P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research* **48**(8), 3713-3729.
- Lindegren C.C., Nagai S., Nagai H. (1958). Induction of respiratory deficiency in yeast by manganese, copper, cobalt and nickel. *Nature* **182**(4633), 446-448.

- Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* **31**(3), 426-428.
- Moya A.J. (1997). Hidrólisis y fermentación del residuo de poda del olivo. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén. Jaén.
- Overend R.P., Chornet E., Gascoigne J.A. (1987). Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions of the Royal Society London Series A*. **321**, 523-536.
- Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxication. *Bioresource Technology* **74**, 17-24.
- Romero M.I. (2003). Hidrólisis ácida y enzimática del residuo de poda de olivo. Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen tannophilus*. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén, Jaén.
- Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enologic and Viticulture* **16**, 144-158.
- Swain T., Hillis W.E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **10**(1), 63-68.
- Tada K., Horiuchi J.I., Kanno T., Kobayashi M. (2004). Microbial xylitol production from corn cobs using *Candida magnolia*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **98**(3), 228-230.
- Van Soest P.J., Wine R.H. (1967). Use of detergents in the análisis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Agricultural Chemists* **50**, 50-55.

4

RESULTADOS Y

DISCUSIÓN

4.1 HIDRÓLISIS A PRESIÓN

En este apartado se lleva a cabo un estudio del proceso de hidrólisis ácida con agua caliente a presión del material de poda, utilizando un reactor discontinuo heterogéneo.

En todos los experimentos se utilizó material de poda procedente de árboles de la variedad 'Picual', exento de hoja y con un tamaño de partícula fijo entre 0,300 y 0,425 mm. En la serie experimental se usó una disolución de ácido sulfúrico muy diluido (0,05 M), utilizando una relación de 1/6 (p/V) de sólido respecto a líquido (S/L), expresada en kg dm^{-3} , proporción establecida en estudios previos para el hueso de aceituna (Cuevas, 2007). La temperatura máxima alcanzada hasta la descompresión (T_{max}) fue 200°C y la velocidad de agitación en el reactor (v_{agit}) se mantuvo a 250 rpm. El tiempo de contacto a la temperatura máxima fue de 0 minutos, es decir, se produjo el enfriamiento justo al alcanzar la temperatura máxima.

4.1.1 Caracterización del material de poda

El material de poda se recibió en las dependencias del laboratorio de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales, donde se mantuvo durante un tiempo prolongado dentro de cajas adecuadas que han asegurado perfecta aireación, secándose a temperatura ambiente. Una vez que alcanzó la humedad de equilibrio, se sometió al proceso de trituración. Como resultado de la molturación, el material está caracterizado por una amplia variedad de tamaños de partícula. Ésta es una variable que influye significativamente en el desarrollo de los tratamientos aplicables al subproducto. Por tanto, las muestras se sometieron a continuación a un proceso de tamizado para obtener diferentes fracciones cada una con un tamaño lo más uniforme posible, Fig. 4.1.

Al igual que en la clasificación de otras partículas sólidas, se observa que la distribución de tamaño se ajusta en cierta medida a una curva de Gaus, Coulson y Richardson (1981), fundamentalmente en la parte de ascenso. La parte descendente es poco pronunciada debido a que en la tamizadora han faltado tamices intermedios, existiendo rangos de fracciones muy amplias, tales como 1,2 a 2,0 mm, que impiden detectar nítidamente esta caída.

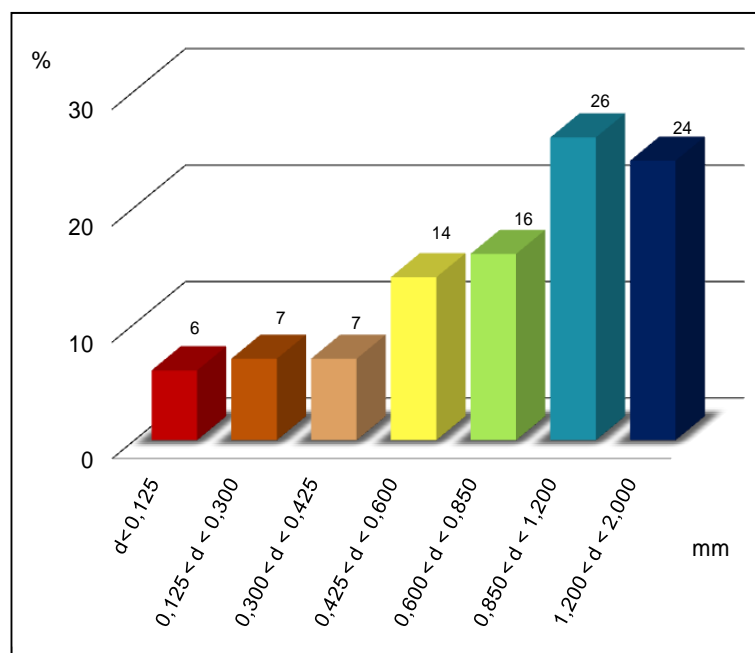


Figura 4.1 Porcentaje de las diferentes fracciones obtenidas tras el tamizado del material de poda de olivo sin hoja vs al rango de diámetro de partícula, d (mm).

En este trabajo de investigación se utilizó el tamaño de partícula que corresponde a la fracción comprendida entre 0,300 y 0,425 mm. Esta fracción, junto con la de 0,425 a 0,600 mm, han sido consideradas apropiadas para procesos de hidrólisis ácida, de acuerdo con estudios realizados previamente (Moya, 1997). A esta fracción se le realizó una caracterización fisicoquímica donde quedó determinado su contenido en humedad y materia volátil (*HMV*), celulosa (*CEL*), hemicelulosa (*HEM*), lignina (*LAI*), cenizas ó material mineral (*CEN*) y extractos (*EXT*), expresado en porcentaje en base seca, Tabla 4.1. De igual forma se calculó su contenido en holocelulosa (*HOL*), como suma de las fracciones celulósica y hemicelulósica. Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado, lo que ha permitido determinar en todos los casos su desviación estándar (σ).

Tabla 4.1
Caracterización del material de poda del olivo. Fracción entre 0,300 y 0,425 mm de diámetro

Parámetro	Composición, %	σ	Saleh, 2014*
Humedad y materia volátil (<i>HMV</i>)	7,24	0,02	8,90
Holocelulosa (<i>HOL</i>)	53,54	0,49	54,90
Celulosa (<i>CEL</i>)	29,85	0,80	25,90
Hemicelulosa (<i>HEM</i>)	23,69	0,31	29,00
Lignina ácido insoluble (<i>LAI</i>)	15,58	0,43	33,3
Cenizas (<i>CEN</i>)	2,80	0,20	0,71
Extractos (<i>EXT</i>)	20,32	0,27	11,1

(*) Caracterización del hueso de aceituna. Fracción de diámetro comprendida entre 0,425 y 0,600 mm.

Los contenidos en humedad y materia volátil, cenizas, lignina, celulosa y hemicelulosa existentes en el material de poda analizado, resultan bastante coincidentes con los ya obtenidos en investigaciones anteriores por este grupo de investigación (Sánchez *et al.*, 2002b). Estos resultados se encuadran dentro del rango de composición que se atribuyen a otras biomásas de tipo lignocelulósico, como son los residuos de paja de cereal, el bagazo de la caña de azúcar y, en general, el de plantas forrajeras, donde los contenidos en lignina, celulosa y hemicelulosa oscilan en los rangos de 10 – 30%, 25 – 40% y 25 – 50%, respectivamente (McGinnis *et al.*, 1983).

Este material lignocelulósico presenta un mayor contenido celulósico, 29,9%, si se compara con hueso de aceituna, 25,9% (Saleh, 2014). De igual forma cabe destacar el bajo porcentaje de material mineral, *CEN*, en el hueso de aceituna (0,7%), presentando el material de poda de olivo un 2,8%.

4.1.2 Severidad del tratamiento hidrotérmico

Durante los tratamientos de hidrólisis ácida a presión, aplicados sobre el material lignocelulósico, se registraron los valores de la temperatura y presión en el reactor a lo largo del tiempo de proceso. Para todos los tratamientos de hidrólisis ácida a presión, los datos de temperaturas, presiones y tiempos de proceso se presentan en el Anexo A de esta Memoria. De igual forma en este Anexo, quedan reflejadas las gráficas de T vs t para temperaturas superiores a 100°C, así como los cálculos de las velocidades de calentamiento (v_C) y enfriamiento (v_E) en el reactor y factores de severidad ($\log R_o$ y FSC).

Con respecto a la velocidad de calentamiento, se aprecia que es prácticamente constante a lo largo de todas las hidrólisis ácidas a presión realizadas, con un valor medio de $5,32^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y $\sigma = 0,65$, Tabla 4.2. Los factores de severidad y de severidad combinados, $\log R_0$ y FSC , ponen de manifiesto la intensidad del proceso sobre el material lignocelulósico, teniendo en cuenta que este último incluye el efecto del pH en la hidrólisis ácida de baja concentración. Además, mediante $\log R_0$ y FSC se pueden apreciar las diferencias encontradas en dos experimentos realizados bajo las mismas condiciones de operación. Cabe destacar, la excelente reproducibilidad en estos catorce experimentos, puesto de manifiesto en los bajos valores de la desviación estándar, fundamentalmente en los parámetros correspondientes a los factores de severidad ($\log R_0$ y FSC), Tabla 4.3.

Tabla 4.2
HIDRÓLISIS ÁCIDA A PRESIÓN. ÁCIDO SULFÚRICO 0,05 M. RELACIÓN S/L = 1/6
Velocidades de calentamiento y enfriamiento

Expto.	V_c $^{\circ}\text{C min}^{-1*}$	r^2	V_E $^{\circ}\text{C min}^{-1}$	r^2
A.1	5,30	0,998	$-1,92 \ell + 84,78 t - 944,3$	0,976
A.2	5,10	0,999	$7,08 \ell - 312,8 t + 3.424$	0,989
A.3	3,55	0,992	$-0,63 \ell + 36,78 t - 548,94$	0,997
A.4	5,54	0,998	$2,14 t - 63,50$	0,992
A.5	5,52	0,997	$-0,60 t - 8,01$	0,996
A.6	5,53	0,998	$-4,35 \ell + 179,14 t - 1.861$	0,980
A.7	5,77	0,998	$-0,57 \ell + 27,88 t - 343$	0,996
A.8	5,76	0,993	$5,94 t - 146,8$	0,991
A.9	5,64	0,990	$4,82 t - 121,4$	0,981
A.10	4,55	0,992	$-1,208 t - 0,79$	0,997
A.11	4,57	0,980	$4,68 t - 136,6$	0,984
A.12	5,26	0,989	$26,49 \ell - 1.041 t + 10.170$	0,999
A.13	5,74	0,997	$5,16 t - 120,5$	0,985
A.14	6,41	0,998	$-1,23 \ell + 52,82 t - 574,7$	0,978
A.15	5,49	0,997	$6,38 t - 151$	0,955

(*) $\sigma = 0,65$.

Tabla 4.3
 HIDRÓLISIS ÁCIDA A PRESIÓN. ÁCIDO SULFÚRICO 0,05 M. RELACIÓN S/L = 1/6
 Tiempo de inicio de etapa de enfriamiento, presión máxima alcanzada,
 severidad, factor de severidad y factor de severidad combinado.

Expto.	t^* min	P_{max} kpa	R_o	Log R_o	FSC
A.1	19	1.724,3	3.799,65	3,58	2,28
A.2	20	1.600,1	6.450,79	3,81	2,51
A.3	27	1.200,1	4.998,96	3,70	2,40
A.4	18	1.579,4	2.434,22	3,39	2,09
A.5	18	1.538,1	2.575,09	3,41	2,11
A.6	18	1.613,9	2.275,14	3,36	2,06
A.7	17	1.738,1	2.371,63	3,38	2,08
A.8	19	1.855,3	3.182,30	3,50	2,20
A.9	19	1.820,8	3.084,62	3,49	2,19
A.10	22	1.531,2	4.418,57	3,65	2,35
A.11	21	1.510,5	4.389,85	3,64	2,34
A.12	18	1.538,1	3.418,73	3,53	2,23
A.13	17	1.889,8	2.493,88	3,40	2,10
A.14	16	1.917,4	3.243,54	3,51	2,21
A.15	18	1.813,9	2.833,28	3,45	2,15
VM**		1.658,1	3.464,68	3,52	2,22
σ		184,3	1.132,20	0,13	0,13

(*) Tiempo en el que se alcanza la T_{max} del tratamiento y da comienzo la etapa de enfriamiento.

(**) Valor medio.

Cuando es hueso de aceituna el material lignocelulósico sometido a hidrólisis ácida a presión, con una concentración de ácido sulfúrico 0,025 M, una relación S/L = 1/6, una temperatura máxima en el reactor de 200°C, se obtiene $\log R_o = 3,46$ (Cuevas *et al.*, 2015), mientras que en esta investigación usando astillas de poda de olivar, una concentración 0,05 M del mismo ácido, igual temperatura máxima y relación S/L, el factor de severidad fue ligeramente superior, 3,52.

4.1.3 Composición de los hidrolizados líquidos

Para cuantificar los azúcares existentes en los hidrolizados líquidos procedentes de pretratamiento se realizó una determinación mediante HPLIC y el método de Miller, Tabla 4.4. Esta determinación se llevó a cabo por duplicado, en dos procesos de hidrólisis, lo que ha permitido calcular en todos los casos su desviación estándar.

Tabla 4.4
 HIDRÓLISIS ÁCIDA A PRESIÓN. ÁCIDO SULFÚRICO 0,05 M. RELACIÓN S/L = 1/6
 Concentración de azúcares al final del proceso de hidrólisis ácida a presión

Azúcares, g dm ⁻³	Expto. A.1	Expto. A.2	VM	σ	García, 2007*
ART**	41,25	41,97	41,61	0,36	10,98
D-glucosa***	14,37	14,20	14,28	0,08	1,33
D-xilosa***	8,05	8,68	8,36	0,32	0,30
D/L-arabinosa***	2,48	2,71	2,59	0,12	0,90
D-galactosa***	1,15	1,22	1,18	0,03	0,16
D-manosa***	0,69	0,75	0,72	0,03	—

(*) Concentraciones de azúcares reductores totales, D-glucosa, D-xilosa, D/L-arabinosa, D-galactosa y D-manosa del hidrolizado tras ser sometido a hidrólisis a presión sin ácido con una relación S/L = 1/6.

(**) Método de Miller.

(***)HPLIC.

Las concentraciones más elevadas en monosacáridos corresponden a D-glucosa y D-xilosa, siendo D/L-arabinosa el tercer azúcar en cuanto a cantidad generada en el pretratamiento. También, se observa una buena reproducibilidad entre los dos experimentos que se indican, Tabla 4.4, con desviaciones estándar menor o igual a 0,36. Por otra parte, estos valores se han comparado con los obtenidos en un pretratamiento a presión realizado con el mismo material lignocelulósico y las mismas condiciones de operación en el reactor, pero sin utilizar ácido en el proceso en una investigación anterior (García, 2007); como era de esperar, se observa concentraciones bastante más bajas en azúcares reductores totales y en todos los monosacáridos analizados, no detectándose en este caso D-manosa.

A partir de las concentraciones en azúcares obtenidos experimentalmente, en las muestras de los hidrolizados procedentes de la hidrólisis ácida a presión, se determinaron los rendimientos en azúcares reductores totales (Y_{ART}), D-glucosa (Y_{GLU}), D-xilosa (Y_{XIL}), D/L-arabinosa (Y_{ARA}), D-galactosa (Y_{GAL}) y D-manosa (Y_{MAN}), según las ecuaciones 4.1 a 4.6, Tabla 4.5.

$$Y_{ART} = \frac{\text{kg ART en hidrolizado}}{\text{kg residuoseco inicial}} 100 \quad [4.1]$$

$$Y_{GLU} = \frac{\text{kg D- glucosa en hidrolizado}}{\text{kg residuoseco inicial}} 100 \quad [4.2]$$

$$Y_{XIL} = \frac{\text{kg D-xilosa en hidrolizado}}{\text{kg residuo seco inicial}} 100 \quad [4.3]$$

$$Y_{ARA} = \frac{\text{kg D/L-arabinosa en hidrolizado}}{\text{kg residuo seco inicial}} 100 \quad [4.4]$$

$$Y_{GAL} = \frac{\text{kg D-galactosa en hidrolizado}}{\text{kg residuo seco inicial}} 100 \quad [4.5]$$

$$Y_{MAN} = \frac{\text{kg D-manosa en hidrolizado}}{\text{kg residuo seco inicial}} 100 \quad [4.6]$$

También, se ha definido el rendimiento en hexosas, Y_{HEX} , como la suma de los rendimientos obtenidos en D-glucosa, D-galactosa y D-manosa, así como el rendimiento en pentosas, Y_{PEN} , calculado como la suma de los rendimientos en D-xilosa y D/L-arabinosa, ecuaciones 4.7 y 4.8, Tabla 4.5. Se observa que los rendimientos en azúcares reductores totales y en D-glucosa son muy superiores en esta investigación si se comparan con los obtenidos por García (2007) sin usar ácido en la hidrólisis a presión.

$$Y_{HEX} = \frac{\text{kg hexosas en hidrolizado}}{\text{kg residuo seco inicial}} 100 \quad [4.7]$$

$$Y_{PEN} = \frac{\text{kg pentosas en hidrolizado}}{\text{kg residuo seco inicial}} 100 \quad [4.8]$$

Tabla 4.5
HIDRÓLISIS ÁCIDA A PRESIÓN. ÁCIDO SULFÚRICO 0,05 M. RELACIÓN S/L = 1/6
Rendimientos de los diferentes azúcares en los hidrolizados

Rendimientos, %	Experimentos		VM	σ	García, 2007*
	A.1	A.2	%		
Y_{ART}	28,75	29,25	29,00	0,25	$17,1 \pm 0,1$
Y_{GLU}	10,02	9,90	9,96	0,06	$0,7 \pm 0,1$
Y_{XIL}	5,61	6,05	5,83	0,22	
Y_{ARA}	1,73	1,89	1,81	0,08	
Y_{GAL}	0,80	0,85	0,83	0,02	
Y_{MAN}	0,48	0,53	0,50	0,02	
Y_{HEX}	11,30	11,27	11,29	0,02	
Y_{PEN}	7,34	7,94	7,64	0,30	

(*) Rendimientos en azúcares reductores totales y D-glucosa de hidrolizado tras ser sometido a hidrólisis a presión sin ácido con una relación S/L = 1/6.

En relación a los monosacáridos los rendimientos D-glucosa y D-xilosa presentan los mayores valores, y el rendimiento en D/L-arabinosa representa el 9,3% en relación al conjunto de las hexosas y pentosas, Tabla 4.5.

Por otro lado, se determinó el índice de inhibidores (*I*), la concentración de ácido acético (*Ac*), así como la concentración de compuestos fenólicos totales (*CFT*) existentes en cada uno de los hidrolizados tras el proceso de hidrólisis ácida a presión, Tabla 4.6.

Tabla 4.6
HIDRÓLISIS ÁCIDA A PRESIÓN. ÁCIDO SULFÚRICO 0,05 M. RELACIÓN S/L = 1/6
Índice de inhibidores, concentración de ácido acético y compuestos fenólicos totales

Expto.	<i>I</i>	σ	<i>Ac</i> g dm ⁻³	σ	<i>CFT</i> g dm ⁻³	σ
A.1	350,27	2,50	1,98	0,130		
A.2	382,31	1,01	2,33	0,018		
A.3	382,13	1,25	2,11	0,025		
A.4	432,17	2,22	3,15	0,128		
A.5	443,79	1,05	2,59	0,146		
A.6	387,36	2,59	4,21	0,026		
A.7	384,30	2,70			4,59	0,013
A.8	501,40	5,03			5,02	0,039
A.9	458,19	0,73				
A.10	464,22	0,00				
A.11	542,88	1,09			4,99	0,117
A.12	607,29	1,32				
A.13	382,85	0,97			5,82	0,065
A.14	454,45	1,09				
A.15	459,75	0,00			6,67	0,102
VM $\pm \sigma$	442,22 \pm 67,20		2,73 \pm 0,76		5,42 \pm 0,74	

Se determinan resultados muy elevados del índice de inhibidores, con un valor medio de 442,2, comparado con los obtenidos por García (2007) en procesos de hidrólisis ácida con hidrolizados procedentes de pretratamiento a presión sin usar ácido; en este último caso, con el mismo subproducto y relación S/L, se obtuvieron valores máximos del orden de 45,0. También la concentración de ácido acético es muy superior en este trabajo, con valores en el rango 1,98 – 4,21 g dm⁻³, si se comparan los obtenidos por García (2007) que determinó una concentración máxima de 0,76 g dm⁻³, al final del pretratamiento con agua a presión. Por otra parte, en pretratamientos mediante 'Steam explosión' de poda de álamo con

temperatura máxima de operación de 210°C en el reactor y tiempo de residencia de 4 minutos, Oliva *et al.* (2003) determinaron una concentración de ácido acético de 2,1 g dm⁻³, valor algo menor al obtenido en este trabajo. En relación a los compuestos fenólicos totales, cabe destacar las altas concentraciones generadas durante el proceso de pretratamiento ácido a presión, alcanzándose un valor medio de 5,42 g dm⁻³, lo que pone de manifiesto que la concentración de compuestos fenólicos puede presentar un mayor papel como inhibidor que el propio ácido acético.

Con el fin de estudiar la generación de compuestos fenólicos, la mayor parte de los cuales pueden proceder de la degradación de la lignina, se determinó la concentración de estos componentes en el hidrolizado al final del pretratamiento ácido, Tabla 4.7, mediante la técnica espectrometría de masas y cromatografía (HPLC-MS). Las determinaciones se realizaron por duplicado, calculándose así su desviación estándar.

Tabla 4.7
HIDRÓLISIS A PRESIÓN. ÁCIDO SULFÚRICO 0,05 M. RELACIÓN S/L = 1/6
Concentraciones de compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado tras el pretratamiento ácido a presión

Compuesto fenólico	Concentración mg dm ⁻³
Vanillina	55,30 ± 1,50
Oleuropeína	< 0,5
Naringenina	< 0,5
Luteolina / Kaemferol	< 0,5
Epicatequina galato	< 0,5
Catequina	< 0,5
Apigenina	< 0,5
Ácido-t-cinámico	< 0,5
Ácido p-cumárico	0,51 ± 0,01
Ácido gálico	2,86 ± 0,03
Hidroxitirosol	141,50 ± 1,50
Ácido caftárico	< 0,5
Ácido protocatéquico	3,33 ± 0,05
4-Hidroxibenzaldehido	0,58 ± 0,02
Ácido cafeico	< 0,5
Ácido ferúlico	2,16 ± 0,01
Quercetin 3-o-Glucopiranosido	< 0,5
Quercetina	< 0,5

En general, se observa que la concentración de los compuestos fenólicos no es muy elevada, lo cual quiere decir que la degradación de la lignina se ha producido en muy poca extensión o ha permanecido inalterada a pesar de ser un tratamiento ácido a presión.

Tras someter el mismo material lignocelulósico a hidrólisis con ácido sulfúrico (1 N) utilizando una relación 1/20 (*p/V*) de sólido respecto a líquido (*S/L*), sin pretratamiento inicial a presión, manteniendo la temperatura de proceso a 90°C, García (2007) determinó en los hidrolizados una presencia en vanillina y hidroxitirosol, 2,48 y 2,09 mg m⁻³, concentración muy inferior a la obtenida en esta investigación, Tabla 4.7. En este trabajo, también se observa que los dos compuestos fenólicos en mayor concentración son hidroxitirosol y vanillina pero en concentraciones más altas, 141,5 y 55,3 mg dm⁻³, respectivamente.

4.1.4 Caracterización de los residuos sólidos después del proceso hidrolítico

Tras el tratamiento hidrotérmico, el hidrolizado ha de ser filtrado con el fin de retener la fase sólida. Transcurridos un mínimo de 72 h para asegurar su secado, el residuo sólido se pesó para determinar el porcentaje de sólido recuperado durante el tratamiento (*SR*), y se caracterizó según su contenido en *HMV*, *CEL*, *HEM*, *LAI*, *CEN* y *EXT*, en base seca, Tabla 4.8. Las determinaciones se realizaron por duplicado, calculándose así su desviación estándar.

Tabla 4.8
HIDRÓLISIS A PRESIÓN. ÁCIDO SULFÚRICO 0,05 M. RELACIÓN S/L = 1/6
Caracterización del residuo separado del hidrolizado al final del pretratamiento

Parámetro	VM	σ	García, 2007*	Saleh, 2014**
<i>HMV</i> , %	5,68	0,02	6,70	6,20
<i>HOL</i> , %	36,07	0,01	46,20	
<i>CEL</i> , %	35,06	0,05	45,00 ± 3,40	37,10
<i>HEM</i> , %	1,01	0,06	1,20 ± 0,60	2,20
<i>LAI</i> , %	42,97	0,01	32,90 ± 3,30	38,10
<i>CEN</i> , %	2,00	0,09	1,90	0,00
<i>EXT</i> , %	13,28	0,06	12,20	22,60
<i>SR</i> , %	56,06			63,50

(*) Caracterización del residuo de hidrolizado tras ser sometido a hidrólisis a presión sin ácido con una relación S/L = 1/6.

(**) Caracterización de residuo sólido de hueso de aceituna tras pretratamiento con ácido sulfúrico 0,025 M, relación S/L = 1/6.

Se determina un contenido en *HMV* del residuo, 5,68%, que está por debajo de la humedad relativa de equilibrio (8,0 – 12,0%). Este valor se podría justificar considerando que, a pesar de haber realizado un lavado con agua ultrapura durante la filtración del residuo tras la hidrólisis ácida a presión, éste aún conserva un pequeño contenido de ácido sulfúrico. Por este hecho, al introducir el residuo en la estufa a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ para determinar el contenido en *HMV*, el ácido provoca una carbonización de parte del sólido y por tanto no sólo se pierde agua por evaporación sino también masa de residuo.

En el residuo sólido separado del hidrolizado, se observa una disminución elevada en cuanto al contenido hemicelulósico, 1,01%, Tablas 4.8. Este porcentaje es menor que el obtenido por García (2007), tras someter el mismo material lignocelulósico a hidrólisis a presión, sin ácido y con una relación S/L = 1/6, 1,20%. Se observa que las disoluciones ácidas han ejercido un efecto algo mayor sobre la fracción hemicelulósica. De esta forma, el ácido sulfúrico a 200°C condujo casi a la completa eliminación de la fracción hemicelulósica.

En la caracterización de residuo sólido de hueso de aceituna tras pretratamiento con ácido sulfúrico 0,025 M, relación S/L = 1/6 y tiempo a la máxima temperatura de 0,76 minutos, se determinó un contenido en hemicelulosa próximo a 0,5% (Saleh *et al.*, 2014).

Tal como cabría esperar, se ha obtenido un contenido en celulosa, 35,06%, considerablemente inferior al determinado en el residuo de poda del hidrolizado tras la hidrólisis a presión, sin utilizar ácido y con una relación S/L = 1/6 (García, 2007).

En definitiva, en el caso de operar con disoluciones diluidas de ácido sulfúrico 0,05 M durante la hidrólisis a presión, el ataque sobre el sólido se incrementó significativamente respecto a la alternativa que utiliza agua.

La hidrólisis ácida a presión condujo a una solubilización del sólido del 43,94%, valor que es algo inferior si se compara con el obtenido en un pretratamiento a presión utilizando hueso de aceituna (36,5%), también con relación S/L = 1/6, aunque la concentración de ácido sulfúrico era de 0,025 M (Saleh, 2014).

La caracterización del material de poda y del residuo de hidrolizado tras el pretratamiento ácido, Tabla 4.1 y 4.8, permitió calcular las conversiones fraccionales en celulosa (X_{CEL}), hemicelulosa, (X_{HEM}), y lignina (X_{LAI}), de acuerdo con las ecuaciones 4.9 a 4.11, Tabla 4.9.

$$X_{CEL} = \frac{\text{kg celulosatransformados}}{\text{kg celulosainicial}} 100 \quad [4.9]$$

$$X_{HEM} = \frac{\text{kg hemicelulosa transformados}}{\text{kg hemicelulosa inicial}} 100 \quad [4.10]$$

$$X_{LAI} = \frac{\text{kg lignina transformados}}{\text{kg ligninainicial}} 100 \quad [4.11]$$

Tabla 4.9
HIDRÓLISIS A PRESIÓN. ÁCIDO SULFÚRICO 0,05 M. RELACIÓN S/L = 1/6
Conversión fraccional de celulosa, hemicelulosa y lignina

FSC	X_{CEL} %	X_{HEM} %	X_{LAI} %
2,22 ± 0,13	57,41	98,45	0

Tal como se observa, la conversión de la fracción hemicelulósica es prácticamente completa (98,5%). La fracción celulósica fue transformada en un porcentaje elevado, próximo al 58%, mientras que la lignina permaneció inalterada a pesar de ser un tratamiento ácido a presión. En investigaciones previas realizadas por el Grupo Bioprocesos, cuando se realizó una hidrólisis con ácido sulfúrico 0,5 M a 90°C sobre el residuo resultante del pretratamiento a presión del material de poda de olivo (García *et al.*, 2010), se determinó las conversiones fraccionales en fibras obtenidas en la autohidrólisis y post-hidrólisis; tras la autohidrólisis se obtuvo una conversión hemicelulósica inferior, 79,8%, a la conseguida en este trabajo. No obstante, esta cifra se vio lógicamente incrementada tras el proceso de hidrólisis ácida, 97,1%. De igual forma, sucede en el caso de la celulosa, aumenta la conversión desde 29,8% en el pretratamiento hasta 37,7% en la hidrólisis ácida. La conversión celulósica que se ha obtenido en este trabajo es superior en ambos casos, 57,4%. Con respecto a la lignina, García *et al.* (2010) observó una ligera degradación en el pretratamiento con agua a presión (1,8%), mientras que no existía degradación en la post-hidrólisis del residuo.

4.2 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *Hansenula polymorpha*

Para el desarrollo de las fermentaciones de azúcares se trabajó con una levadura denominada *Hansenula polymorpha* (ATCC 34438), también llamada *Pichia angusta*. Es la única levadura metilotrófica termotolerante conocida, con un crecimiento óptimo entorno a los 37°C y una máxima temperatura de crecimiento por encima de los 48°C, capaz de fermentar D-xilosa, D-glucosa, celobiosa y otros azúcares lignocelulósicos a estas temperaturas (Hansen y Hollenberg, 1996).

Con el fin de determinar las condiciones de operación más adecuadas en los biorreactores, se realizó un estudio previo de los procesos de fermentación con *H. polymorpha* usando como sustrato las pentosas encontradas en mayor concentración en los hidrolizados de biomasa lignocelulósicas. Cabe señalar que la fermentación de hexosas en medio sintético usando *H. polymorpha* fue abordado en trabajos previos del Grupo de Investigación Bioprocesos, Moya (1997).

En cada experimento, se estableció la concentración inicial de monosacáridos en 25 g dm⁻³ en medio líquido (Lindgren *et al.*, 1958). Las variables *T* y *pH* se modificaron en un rango de 35 – 50°C y 3,5 – 5,5, respectivamente.

Durante la fermentación se obtuvieron experimentalmente las concentraciones en biomasa producida, azúcares reductores totales, ácido acético residual, así como etanol, xilitol y arabitol. Estos resultados primarios se presentan en el Anexo B de esta Memoria.

A partir de estos resultados, se llevó a cabo un estudio de la formación de biomasa, consumo de sustrato y formación de bioproductos a través de los parámetros cinéticos: velocidad específica máxima de crecimiento, productividad en biomasa, velocidad específica de consumo de sustrato, rendimiento en biomasa, velocidad específica de formación de productos y rendimientos en bioproductos en cada uno de los procesos de fermentación.

4.2.1 Naturaleza del sustrato

Las pentosas que se han fermentado con *H. polymorpha* han sido D y L-arabinosa, realizándose de forma simultánea una comparación con D-xilosa, ésta última analizada parcialmente en estudios previos del Grupo de Investigación “Bioprocesos” (Sánchez *et al.*, 1998).

Los resultados experimentales obtenidos en cuanto a evolución del *pH*, generación de biomasa, consumo de sustrato, y formación de bioproductos durante el transcurso del

proceso de fermentación se han indicado en las Tablas B.1 a B.6, Anexo B.1, y se han representado en las Figuras B.1 a B.6, Anexo B.1, los mismos parámetros excepto el *pH* y la concentración de etanol.

4.2.1.1 Formación de biomasa

Para evaluar cuantitativamente la formación en biomasa utilizando la levadura *H. polymorpha* se emplearon los parámetros característicos del crecimiento celular: velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) y la productividad volumétrica en biomasa (P_b).

Durante el proceso de fermentación el número de células viables se va modificando a lo largo del tiempo. En un principio, comienzan a multiplicarse a expensas de los nutrientes hasta que, finalmente, el crecimiento se detiene por agotamiento de alguno de los componentes del medio de cultivo (sustrato limitante), por acumulación de inhibidores o bien por algún cambio en las condiciones físico-químicas del medio (Quintero, 1981). En el transcurso de la fermentación, en un biorreactor discontinuo, se pueden diferenciar las siguientes fases de crecimiento:

- Fase 'lag' ó de latencia, prácticamente no hay división celular ya que el microorganismo adapta los sistemas enzimáticos para metabolizar el nuevo sustrato, pero sin desarrollarse. La duración de esta fase depende fundamentalmente de las diferencias entre las condiciones del inóculo (edad y concentración) y las del medio (Bailey y Ollis, 1977).
- Fase de aceleración del crecimiento, normalmente de duración muy reducida y frecuentemente no apreciable.
- Fase exponencial, rápido crecimiento donde el número de células aumenta exponencialmente con el tiempo.
- Fase de desaceleración del crecimiento, comienza a disminuir la velocidad del crecimiento celular por algún nutriente limitante, por inhibición de sustrato o por algún cambio físico-químico en el medio.
- Fase estacionaria, donde la velocidad de división celular decrece de tal forma que se iguala al número de células que mueren.
- Fase de declive ó muerte celular, donde el número de células que mueren es superior al generado.

El crecimiento exponencial puede cuantificarse mediante la Ec. 4.12,

$$x = x_1 \exp (\mu_m t) \quad [4.12]$$

donde x_1 corresponde a la concentración de biomasa al inicio de la fase exponencial y μ_m es la velocidad específica máxima de crecimiento definida mediante Ec. 4.13.

$$\mu_m = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad [4.13]$$

La Ec. 4.12 procede de la propia definición de velocidad específica de crecimiento (Aiba *et al.*, 1973), pudiéndose expresar como Ec. 4.14,

$$\ln \frac{x}{x_1} = \mu_m t \quad [4.14]$$

con lo que una representación del $\ln (x/x_1)$ vs t conduciría a un ajuste lineal, es decir, una línea recta, a partir de cuya pendiente se obtendría el valor de la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m .

No obstante, puesto que x_1 no es un valor conocido previamente, la Ec. 4.14 puede modificarse según Ec. 4.15,

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu_m t + Z \quad [4.15]$$

donde se ha sustituido x_1 por la concentración de biomasa al inicio del experimento en discontinuo, x_0 , ya sí conocida a priori. De esta forma, aparece una ordenada en el origen no nula, Z , que sería igual a 0 en el caso en el que la fase 'lag' fuese totalmente despreciable; en definitiva, x_1 tendería a x_0 .

En las curvas de crecimiento en los experimentos de fermentación de las tres pentosas con *H. polymorpha* no se observa fase 'lag', previa a la fase de crecimiento exponencial, Fig. 4.2. Solo para L-arabinosa se detecta una corta fase de latencia de 1,5 h en uno de los experimentos (Anexo B.1, Tabla B.5 y Fig. B.5).

Estas representaciones gráficas permiten establecer claramente el período de crecimiento exponencial y determinar los valores de la velocidad específica máxima de crecimiento, mediante ajuste por mínimos cuadrados a la Ec. 4.15 los datos del logaritmo neperiano de la concentración adimensional de biomasa y tiempo (Tablas B.1 a B.6 del Anexo B.1), Tabla 4.10.

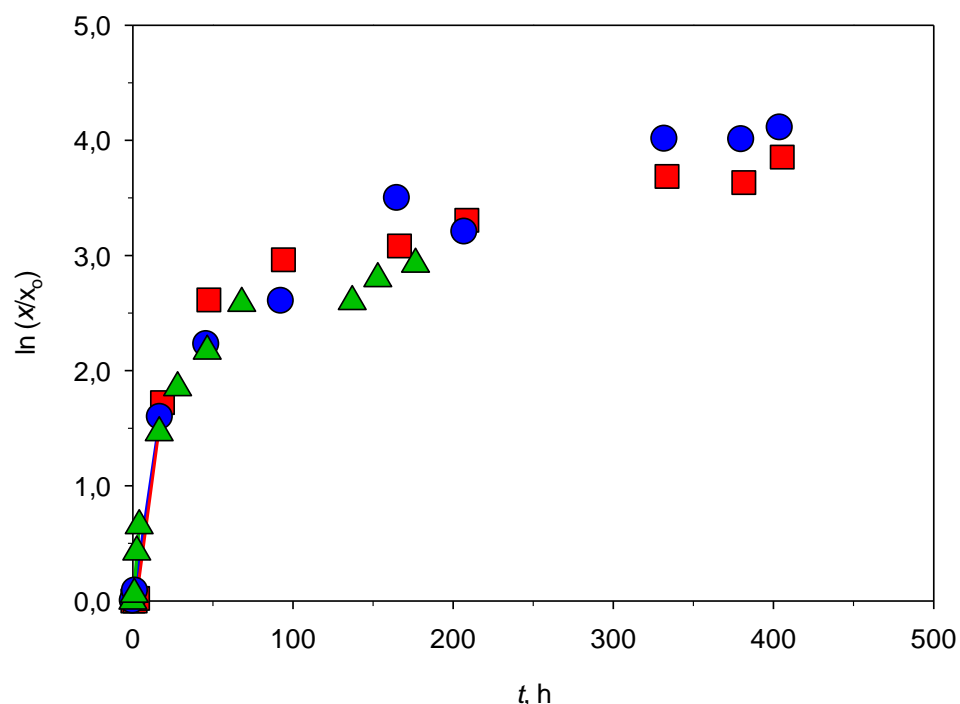


Figura 4.2 Curvas de crecimiento. Determinación de velocidades específicas máximas de crecimiento (μ_m) según la Ec. 4.15 en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (F-S1b, F-S2b y F-S3), en condiciones de microaeración, a 40°C y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm^{-3} de D-ARA₀ (●), L-ARA₀ (■) o D-XIL₀ (▲).

Tabla 4.10
FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
INFLUENCIA NATURALEZA DEL SUSTRATO

Velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) y productividad volumétrica de biomasa (P_b)
 $T = 40^\circ C$, $pH_0 = 4,5$ y condiciones de microaeración

Sustrato	Expto.	μ_m h^{-1}	r^2	VM	σ	P_b $g\ dm^{-3}\ h^{-1}$	r^2	VM	σ
D-arabinosa	F-S1a	—				0,014	0,959		
	F-S1b	0,095	0,999			0,006	0,961	0,013	0,006
	F-S1c	0,075	0,968	0,085	0,010	0,020	0,978		
L-arabinosa	F-S2a	—				0,014	0,954	0,011	0,003
	F-S2b	0,105	0,995	0,105		0,008	0,948		
D-xilosa	F-S3	0,175	0,972	0,175		0,024	0,994	0,024	

Se aprecia una corta fase exponencial de crecimiento cuando el sustrato es D-xilosa, aproximadamente 4 h, mientras que en el resto de la serie experimental tiene una duración máxima de 17 h aproximadamente, excepto en los experimentos F-S1a y F-S2a en los

cuales no se ha podido determinar el periodo correspondiente a la fase exponencial. En los experimentos F-S1b y F-S1c se ha obtenido un valor medio de μ_m de $0,09 \text{ h}^{-1}$. Esta velocidad específica máxima es menor si se compara con la determinada en el experimento en el que el sustrato fue L-arabimosa, $0,11 \text{ h}^{-1}$. No obstante, $0,18 \text{ h}^{-1}$ ha sido el mayor valor alcanzado de μ_m en esta serie experimental, para D-xilosa como sustrato (Expto. F-S3).

Los valores de las velocidades específicas máximas de crecimiento en la fermentación de azúcares sintéticos son muy pequeños si se comparan con los determinados en trabajos previos a esta investigación. En este sentido, en condiciones de pH semejantes en la fermentación de disoluciones de D-xilosa pura con *H. polymorpha* a 30°C se alcanzó un valor de μ_m del orden de $0,43 \text{ h}^{-1}$ (Sánchez *et al.*, 1998). Estas diferencias se pueden justificar considerando las diferentes configuraciones del fermentado que permiten en la investigación previa un mayor nivel de aeración y una mayor concentración de oxígeno disuelto. En el trabajo previo se operó con un biorreactor discontinuo, tipo mezcla perfecta, con un volumen de 500 cm^3 y una agitación de 500 rpm , mientras que en esta investigación se ha operado utilizando matraces Erlenmeyer de 50 cm^3 y usando un agitador orbital con velocidad de agitación de 100 rpm . Lógicamente, estas últimas condiciones conducen a un nivel de aeración más pequeño, y con ello menor formación de biomasa.

En la fermentación de D-xilosa con *C. tropicalis* a 30°C , $pH = 5,0$ y condiciones de microaeración por vórtice (500 rpm), partiendo de una concentración inicial de sustrato de 25 g dm^{-3} (Sánchez *et al.*, 2008) se alcanzó un valor de velocidad específica máxima próximo a $0,29 \text{ h}^{-1}$, utilizando un biorreactor discontinuo tipo tanque agitado y sin aeración adicional.

Lógicamente, en una fermentación discontinua el número de células no puede aumentar indefinidamente. Después de la fase exponencial se observa un período de desaceleración donde la velocidad específica disminuye y se entra en la fase de desaceleración que es causada por algún nutriente limitante, por inhibición de sustrato o por algún cambio físico-químico en el medio. Durante esta fase y con esta levadura se ha comprobado que la concentración de biomasa aumenta de forma lineal durante un intervalo de tiempo relativamente amplio, por lo que podría ser cuantificada mediante Ec. 4.16,

$$x = P_b t + Q \quad [4.16]$$

donde P_b representa la productividad volumétrica en biomasa ($\text{g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) durante ese período de tiempo, y Q es la ordenada en el origen. En comparación con la fase

exponencial, este período de comportamiento lineal de la biomasa con el tiempo de proceso se ha caracterizado por su larga duración, Fig. 4.3.

Tras representar x vs t y establecer la fase de desaceleración en cada uno de los experimentos, se han determinado los valores de la productividad volumétrica en biomasa, mediante ajuste por mínimos cuadrados de los datos de concentración de biomasa y tiempo (Tablas B.1 a B.6 del Anexo B.1) a la Ec. 4.16, Tabla 4.10.

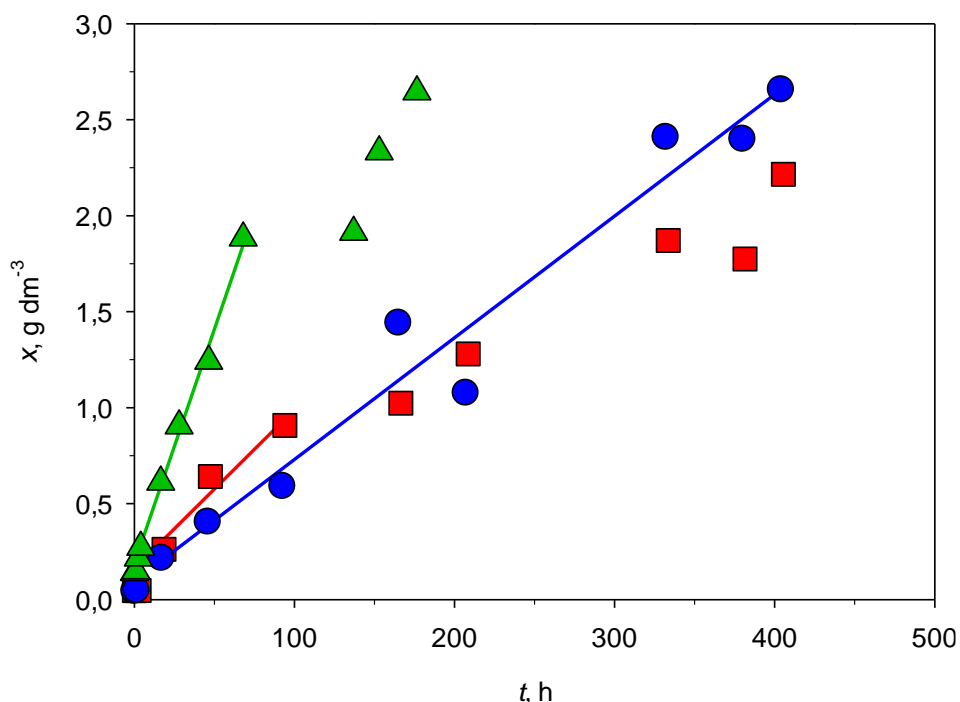


Figura 4.3 Determinación de la productividad volumétrica en biomasa (P_b) según la Ec. 4.16 en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (F-S1b, F-S2b y F-S3), en condiciones de microaeración, a 40°C y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (●), L-ARA₀ (■) o D-XIL₀ (▲).

El máximo valor de productividad en biomasa obtenido en esta serie (40°C, pH_0 4,5 y condiciones de microaeración) se alcanzó durante la fermentación F-S3 de D-xilosa con *H. polymorpha*, 0,02 g dm⁻³ h⁻¹, resultado que es concordante con el obtenido para μ_m . En las mismas condiciones pero diferente sustrato (D ó L-arabinosa) se alcanzaron valores medios próximos a 0,01 g dm⁻³ h⁻¹. En general, estos valores son superiores a los obtenidos en investigaciones previas realizadas por el Grupo Bioprocesos. En este sentido, Sánchez *et al.* (2008) estudió la fermentación con *C. tropicalis* de mezclas de D-glucosa y D-xilosa a 30°C, $pH = 5,0$ y condiciones de microaeración (solo vórtice de agitación), partiendo de una concentración total de sustrato de 25 g dm⁻³. En ausencia de D-glucosa se alcanzó una

productividad en biomasa de $0,0043 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, si bien es cierto que la temperatura en dicho estudio fue inferior a la utilizada para esta serie experimental (40°C).

Esta fase post-exponencial de crecimiento lineal de la biomasa es característica de los procesos controlados por etapas de naturaleza física; en este caso, el control cinético del bioproceso reside en la transferencia de oxígeno en el cultivo celular y ha sido detectada por otros autores en otras levaduras (Detroy *et al.*, 1982; Jeffries, 1982; Sánchez *et al.*, 2002a).

En este sentido, Slininger *et al.* (1987) en la fermentación de disoluciones de D-xilosa con *P. tannophilus* NRRL Y-2460, determinaron que la concentración de oxígeno disuelto se anula rápidamente al final de la fase exponencial, incluso cuando existe aeración en el medio de cultivo; el crecimiento celular llega a estar limitado por la disponibilidad de O_2 disuelto en el medio.

También, Rizzi *et al.* (1989) indican que la cantidad de oxígeno puede ser limitante, concretamente para una concentración de O_2 menor a $3 \mu\text{mol dm}^{-3}$ la velocidad de formación de biomasa es constante, influenciada por la velocidad de aporte de oxígeno. En estas condiciones, encuentran que *P. stipitis* produce etanol a partir de D-xilosa, mientras que aeróbicamente el oxígeno es utilizado mayoritariamente en el proceso de respiración.

Ryabova *et al.* (2003) utilizando la misma levadura, *H. polymorpha*, y como sustrato mezclas de D-glucosa y D-xilosa al 2%, a distintas temperaturas (operando en el intervalo $30 - 48^\circ\text{C}$), alcanzaron un mayor crecimiento celular cuando la fuente de carbono y energía era D-glucosa, en lugar de D-xilosa. El máximo valor de concentración de biomasa, $4,2 \text{ g dm}^{-3}$, fue obtenido a los 37°C , cuando la concentración inicial de inóculo fue $1,0 \text{ g dm}^{-3}$.

En algunos experimentos realizados en esta serie se ha observado un considerable aumento del valor del pH inicial (4,5). Es el caso del Expto. F-S1a, tras 21 h de fermentación con D-arabinosa, el pH de cultivo se elevó hasta 6, manteniéndose en torno a dicho valor hasta el final del bioproceso. De igual forma ocurrió con L-arabinosa (Expto. F-S2a) a las 21 horas. En el mismo sentido, valores de pH próximos a 7 se alcanzaron con la misma pentosa (Expto. F-S2b), una vez transcurridas 167 h. En definitiva, cuando la fuente de carbono y energía es D-xilosa no se aprecia elevación del pH durante el proceso de fermentación, mientras que cuando el sustrato fue arabinosa se detectaba una elevación del pH, siendo más acusada cuando era L-arabinosa.

En esta serie de fermentación a 40°C , en condiciones de microaeración y 4,5 de pH inicial, la máxima concentración de biomasa que se obtuvo fue $3,4 \text{ g dm}^{-3}$ con L-arabinosa como sustrato (Expto. F-S2a), a las 189 h, existiendo todavía una concentración de ART de

9,4 g dm⁻³ y siendo el *pH* 6,2. Cuando el sustrato fue D-arabinosa, la máxima concentración de biomasa (3,3 g dm⁻³) se alcanzó a las 189,5 h, quedando sin fermentar 4,6 g dm⁻³ de concentración de *ART* y siendo 5,9 el *pH* (Expto. F-S1a). En cambio, cuando se fermentó D-xilosa en estas condiciones (Expto. F-S3), sólo se alcanzó una concentración máxima de biomasa en torno a 2,6 g dm⁻³ al final del experimento (177,0 h), quedando aún en el medio una concentración final de *ART* de 3,5 g dm⁻³ y sin embargo el *pH* era inferior al inicial (concretamente 3,8). Estos datos, indican, que desde el punto de vista de formación de bioproductos, *H. polymorpha* es más eficiente cuando utiliza D-xilosa frente a D-arabinosa o L-arabinosa, pues consume más sustrato y forma menos concentración de biomasa.

4.2.1.2 Consumo de sustrato

El consumo de sustrato ha sido estudiado a través de la determinación de dos parámetros: rendimiento global en biomasa ($Y_{x/ART}^G$) y velocidad específica de consumo de sustrato (q_{ART}).

El rendimiento instantáneo en biomasa, $Y_{x/ART}$, se puede definir como el cociente entre la biomasa neta producida y el sustrato neto consumido en un instante dado del cultivo, Ec. 4.17.

$$Y_{x/ART} = \frac{d(x-x_0)}{d(ART_0-ART)} \quad [4.17]$$

Si el rendimiento permanece constante a lo largo del experimento, una representación de los valores de $(x-x_0)$ a distintos tiempos frente a (ART_0-ART) debería conducir a una recta de pendiente $Y_{x/ART}$ y de ordenada en el origen nula. Aunque no fuese nula, el rendimiento obtenido mediante la pendiente correspondería a todo el experimento y por tanto, para distinguirlo del instantáneo, se podría denominar rendimiento medio ó global, $Y_{x/ART}^G$, Fig. 4.4.

Cuando el sustrato fue D-arabinosa se alcanzaron valores medios de $Y_{x/ART}^G$ próximos a 0,16 g g⁻¹ (Tabla 4.11). Este rendimiento aumentó ligeramente en la fermentación de L-arabinosa, 0,19 g g⁻¹. No obstante, en el caso de D-xilosa sólo se obtuvo un rendimiento global en biomasa en torno a 0,11 g g⁻¹. En esta investigación se ha operado utilizando matraces Erlenmeyer de 50 cm³ y un agitador orbital con velocidad de agitación de 100 rpm.

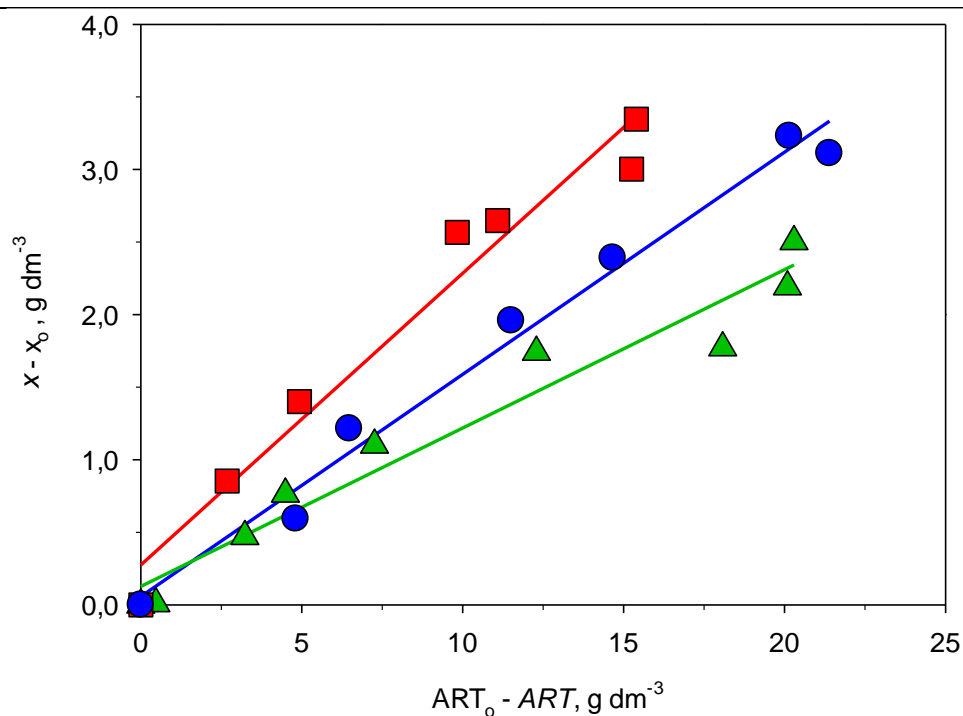


Figura 4.4 Determinación de los rendimientos globales en biomasa ($Y_{X/ART}^G$) según la Ec. 4.17 en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (F-S1a, F-S2a y F-S3), en condiciones de microaeración, a 40°C y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm^{-3} de D-ARA₀ (●), L-ARA₀ (■) ó D-XIL₀ (▲).

Tabla 4.11
FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
INFLUENCIA NATURALEZA DEL SUSTRATO
Rendimientos globales en biomasa ($Y_{X/ART}^G$)
 $T = 40^{\circ}C$, $pH_0 = 4,5$ y condiciones de microaeración

Sustrato	Expto.	$Y_{X/ART}^G$ $g\ g^{-1}$	r^2	VM	σ
D-arabinosa	F-S1a	0,153	0,983	0,161	0,008
	F-S1b	0,168	0,947		
L-arabinosa	F-S2a	0,201	0,964	0,193	0,009
	F-S2b	0,184	0,955		
D-xilosa	F-S3	0,109	0,953	0,109	

En condiciones de microaeración (agitación solo por el vórtice), $pH_0 = 3,5$ y 30°C, Camacho *et al.* (1989) obtuvieron un rendimiento global en biomasa menor, 0,09 $g\ g^{-1}$, partiendo de una concentración inicial de D-glucosa de 25 $g\ dm^{-3}$ como fuente de carbono y

energía para su fermentación con *P. tannophilus* en un estudio sobre el efecto del pH inicial, temperatura y nivel de aeración en el bioproceso.

En estudios previos del Grupo de Investigación Bioprocesos (Sánchez *et al.*, 1998), se fermentó D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C, $pH_0 = 4,5$ y en condiciones microaeróbicas conseguidas sólo a partir de vórtice de agitación. Partiendo de una concentración inicial de sustrato de 25 g dm^{-3} se obtuvo un valor de $Y_{x/ART}^G$ de $0,15 \text{ g g}^{-1}$. Cuando se incrementó el pH_0 a $6,5$, se observó un ligero aumento en $Y_{x/ART}^G$. En este caso se operó con un biorreactor discontinuo, tipo mezcla perfecta, con un volumen de 500 cm^3 y una agitación de 500 rpm .

En este sentido, Feliu *et al.* (1990) usando la misma levadura y D-xilosa como sustrato obtuvieron un rendimiento global en biomasa de $0,61 \text{ g g}^{-1}$ en un cultivo continuo a 41°C , $4,8$ de pH , y 750 rpm de agitación. La concentración de sustrato a lo largo del bioproceso se mantuvo en torno a 9 g dm^{-3} y una velocidad de dilución de $0,13 \text{ h}^{-1}$.

Sánchez *et al.* (2008), en la fermentación de D-xilosa con *C. tropicalis* a 30°C , en condiciones de microaeración (sólo vórtice de agitación) y $pH = 5,0$, partiendo de una concentración inicial de sustrato de 25 g dm^{-3} , obtuvieron un rendimiento global en biomasa próximo a $0,11 \text{ g g}^{-1}$. Aquella investigación se llevó a cabo utilizando biorreactores discontinuo, tipo tanque agitado, sin aeración adicional y a una temperatura inferior a la utilizada para esta serie experimental (40°C).

Para determinar la velocidad específica de consumo de sustrato (q_{ART}) se ha aplicado inicialmente el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos. La velocidad específica de consumo de sustrato se define según Ec. 4.18,

$$q_{ART} = \frac{1}{x} \frac{d(ART_0 - ART)}{dt} = - \frac{1}{x} \frac{dART}{dt} \quad [4.18]$$

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, $d(ART_0 - ART)/dt$) a cada tiempo y posteriormente dividir por la concentración de biomasa, x . La dificultad de este método diferencial reside en la evaluación de esta derivada. Se podría aplicar un método gráfico pero, cuando el número de puntos experimentales no es elevado, el trazado de la curva ($ART_0 - ART$) vs tiempo de operación es difícil y la precisión en la evaluación de la pendiente es pequeña. Por ello, se ha optado por realizar un ajuste empírico de los datos experimentales a una ecuación que indique la

variación de la concentración de sustrato con el tiempo, para posteriormente calcular analíticamente la derivada.

En numerosas fermentaciones discontinuas se observa un comportamiento característico en cuanto al consumo de sustrato que es no coincidente con lo observado en esta investigación. La concentración de sustrato disminuye muy lentamente en las primeras horas del cultivo para, a continuación, descender bruscamente hasta que se encuentra muy agotado, momento en que se vuelve a observar un consumo lento. Este comportamiento determina que normalmente sea difícil ajustar todo el intervalo de tiempo mediante ecuaciones simples (como exponencial, potencial ó parabólica), con lo que sólo se consigue la reproducción en intervalos de tiempo reducidos.

Para aplicar el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos y evaluar la velocidad específica de consumo de sustrato, q_{ART}^D , se han ensayado expresiones más complejas como Ec. 4.19,

$$ART = ART_0 \alpha^{-t^\beta} \quad [4.19]$$

que cumpliría con la condición de que para $t \rightarrow 0$, $ART = ART_0$. Esta ecuación es la que permite obtener una mejor reproducibilidad de los datos de sustrato en mayores intervalos de tiempo en los resultados obtenidos con *H. polymorpha*.

Para determinar los parámetros α y β , se debe linealizar la ecuación 4.19, resultando la Ec. 4.20,

$$\ln\left(\ln \frac{ART_0}{ART}\right) = \beta \ln t + \ln(\ln \alpha) \quad [4.20]$$

con lo que mediante ajustes por mínimos cuadrados de los valores del primer miembro frente a los del logaritmo neperiano del tiempo (Tablas B.1 a B.6 del Anexo B.1), se pueden obtener los parámetros α y β en cada uno de los experimentos, Fig. 4.5.

Tras evaluar estos parámetros, a partir de Ec. 4.19 se puede determinar analíticamente la derivada $-d(ART)/dt$, y por tanto, sustituyendo en la ecuación 4.18, obtener la velocidad específica de consumo de sustrato, q_{ART}^D , en función del tiempo, Ec. 4.21

$$q_{ART}^D = \frac{ART_0 \beta (\ln \alpha) (t^{\beta-1}) \alpha^{-t^\beta}}{x} \quad [4.21]$$

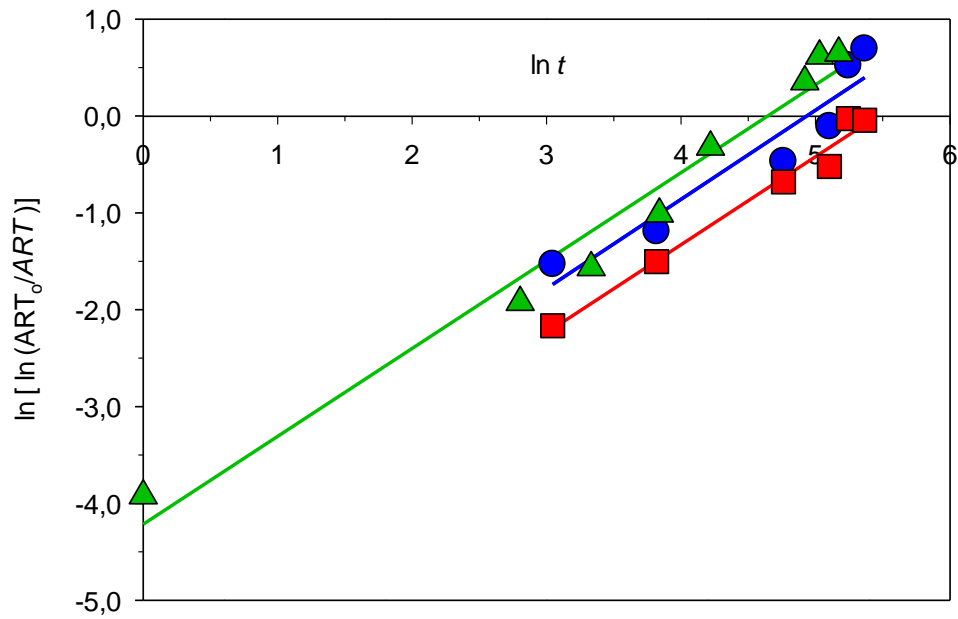


Figura 4.5 Ajuste a la Ec. 4.20 para la determinación de la velocidad específica de consumo de sustrato (q_{ART}^D) de los resultados en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (F-S1a, F-S2a y F-S3), en condiciones de microaeración, a 40°C y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm^{-3} de D-ARA₀ (●), L-ARA₀ (■) ó D-XIL₀ (▲).

En la Fig. 4.6 se observa cómo el consumo de sustrato, en estos experimentos, es rápido desde el inicio del cultivo, y después disminuye lentamente (Tablas B.1 a B.6 del Anexo B.1). Se aprecian pues sólo dos etapas de consumo de sustrato, aunque ésta no es la tendencia general cuando la concentración de inóculo es baja. El comportamiento observado en estos experimentos, en relación al consumo rápido del sustrato desde $t = 0$ h, se puede justificar considerando que se ha partido de una alta concentración de inóculo, y ello conduce a que no sea apreciable la parte horizontal inicial de la clásica curva de consumo de sustrato. Una vez obtenidos los parámetros α y β , se puede comprobar la bondad del ajuste recalculando los valores de ART mediante la ecuación Ec. 4.19. Se observa que para los experimentos anteriores la reproducción es satisfactoria en todo el intervalo de tiempo, Fig. 4.6 (línea continua).

En esta serie experimental, si se compara el consumo de sustrato por parte *H. polymorpha* modificando la fuente de carbono y energía, se observa que la levadura consume D-xilosa con más rapidez que cuando se trata de D ó L-arabinosa; en este sentido, la concentración de D-arabinosa disminuye con mayor velocidad que L-arabinosa, Fig. 4.6. Es decir, partiendo de una concentración inicial en D-xilosa de 25 g dm^{-3} , en condiciones de

microaeración, $\text{pH}_0 = 4,5$ y 40°C , y transcurridas 176,5 h la concentración de D-xilosa en el medio era del orden de $3,5 \text{ g dm}^{-3}$ (Expto. F-S3). En las mismas condiciones y utilizando D-arabinosa como sustrato, la concentración de este azúcar era próximo a $3,4 \text{ g dm}^{-3}$ tras 214 h (Expto. F-S1a); en otros experimentos la concentración residual de D-arabinosa al final del cultivo fue más elevada. Cuando la fuente de carbono y energía se modificó por L-arabinosa la concentración de esta pentosa fue $9,5 \text{ g dm}^{-3}$ tras 215 h (Expto. F-S2a) y $12,2 \text{ g dm}^{-3}$ después de 405,5 h (Expto. F-S2b).

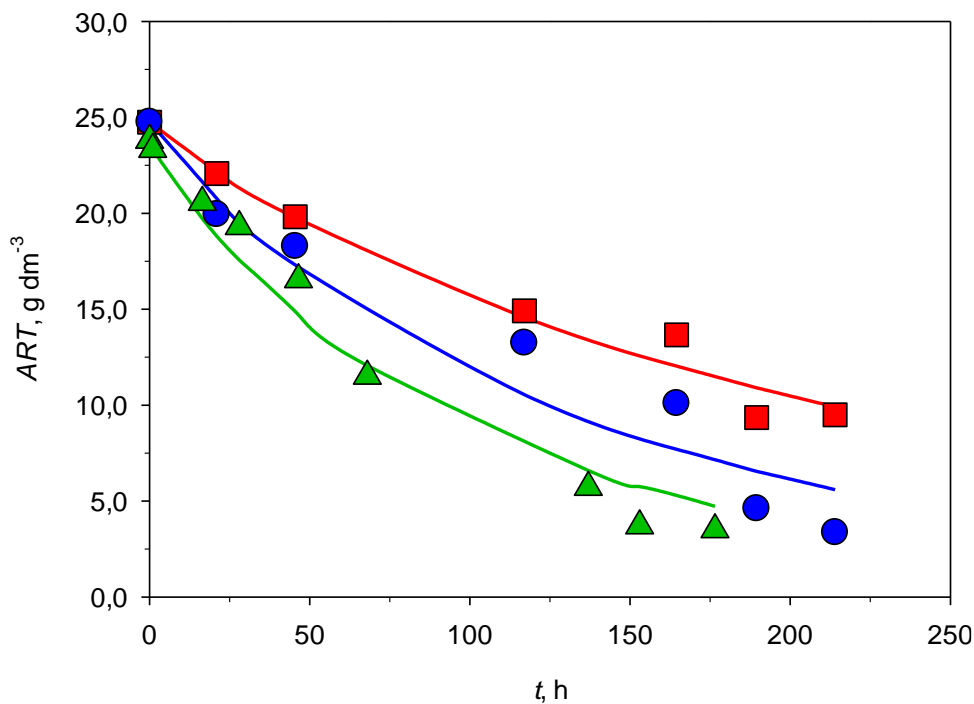


Figura 4.6 Consumo de sustrato en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (F-S1a, F-S2a y F-S3), en condiciones de microaeración, a 40°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, con 25 g dm^{-3} de D-ARA₀ (●), L-ARA₀ (■) ó D-XIL₀ (▲). La línea continua reproduce la Ec. 4.19 de los mismos cultivos

En esta serie se observa que, para cualquiera de los sustratos utilizados, $q_{\text{ART}}^{\text{D}}$ disminuye en el transcurso del cultivo, Tabla 4.12. Esta disminución dentro de la fase lineal fue observada de igual forma por Bravo *et al.* (1995) en una investigación sobre fermentación de D-xilosa con *P. tannophilus* para la producción etanólica.

Tabla 4.12
FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
INFLUENCIA NATURALEZA DEL SUSTRATO

Velocidades específicas de consumo de sustrato (q_{ART}^D y q_{ART})
 $T = 40^\circ\text{C}$, $\text{pH}_0 = 4,5$ y condiciones de microaeración

Sustrato	Expto.	Fase	t, h	q_{ART}^D g g ⁻¹ h ⁻¹	q_{ART} g g ⁻¹ h ⁻¹
D-arabinosa	F-S1a	LIN*	50,0	0,104	0,077
		LIN	150,0	0,022	0,035
	F-S1b	EXP**	10,0	1,048	0,567
		LIN	50,0	0,130	0,091
		LIN	150,0	0,027	0,036
L-arabinosa	F-S2a	LIN	50,0	0,059	0,046
		LIN	150,0	0,018	0,024
	F-S2b	EXP	10,0	0,887	0,569
		LIN	50,0	0,073	0,078
		EST***	166,5	0,021	—
D-xilosa	F-S3	EXP	2,0	1,508	1,602
		LIN	10,0	0,530	0,518
		LIN	50,0	0,095	0,159
		EST	153,0	0,021	—

(*) Fase lineal; (**) Fase exponencial; (***) Fase estacionaria.

Esta velocidad específica de consumo de sustrato es ligeramente superior en el caso de D-arabinosa con respecto a L-arabinosa; en efecto, a partir de D-arabinosa se alcanzó un valor de q_{ART}^D igual a $0,13 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a las 50 h de fermentación (Expto. F-S1b), y utilizando L-arabinosa se determinó una q_{ART}^D de $0,059 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ tras el mismo tiempo de bioproceso (Expto. F-S2a). En este sentido, utilizando D-xilosa como pentosa, se observan valores de q_{ART}^D próximos a los determinados con D y L-arabinosa como sustratos, Fig. 4.7.

Los valores obtenidos de q_{ART}^D (Tabla 4.12) son inferiores a los conseguidos en investigaciones anteriores. Sánchez *et al.* (1998), fermentaron D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C , $\text{pH}_0 = 4,5$. Los valores de q_{ART}^D disminuyeron durante el transcurso del cultivo una vez que la fase de crecimiento exponencial hubo terminado ($0,11$ y $0,087 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ tras 75 y 100 h respectivamente). En este sentido, Bravo *et al.*, (1995), partiendo de una concentración inicial en D-xilosa de 25 g dm^{-3} , 4 g dm^{-3} de extracto de levadura, 30°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, obtuvieron unos valores de q_{ART}^D de $0,29$ y $0,18 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ tras 50 y 75 h de bioproceso. Por

otro lado, Sánchez *et al.* (2004), en la fermentación de 25 g dm^{-3} de D-xilosa con *P. tannophilus*, $\text{pH} = 4,5$, y temperaturas en el rango de $10 - 40^\circ\text{C}$, obtuvieron un valor de $q_{\text{ART}}^{\text{D}}$ de $0,42$ y $0,11 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ después de 50 y 100 h a 10°C ; a 37°C y tras las mismas horas de bioproceso, esta velocidad específica disminuyó ($0,13$ y $0,085 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente). De igual forma, Sánchez *et al.* (1997), en la fermentación de D-xilosa con *C. shehatae* a 30°C , obtuvieron para $q_{\text{ART}}^{\text{D}}$ unos valores más elevados al inicio del cultivo, disminuyendo durante el transcurso del experimento; en efecto, con un $\text{pH}_0 = 4,5$ se determinó un valor para la velocidad específica de consumo de sustrato de $2 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $0,8 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ tras 20 y 40 h de bioproceso, respectivamente. Estas investigaciones previas se realizaron con biorreactores discontinuos, tipo mezcla perfecta, con un volumen de cultivo de 500 cm^3 y 500 rpm , mientras que en este estudio se ha operado utilizando matraces Erlenmeyer de 50 cm^3 y un agitador orbital con velocidad de 100 rpm .

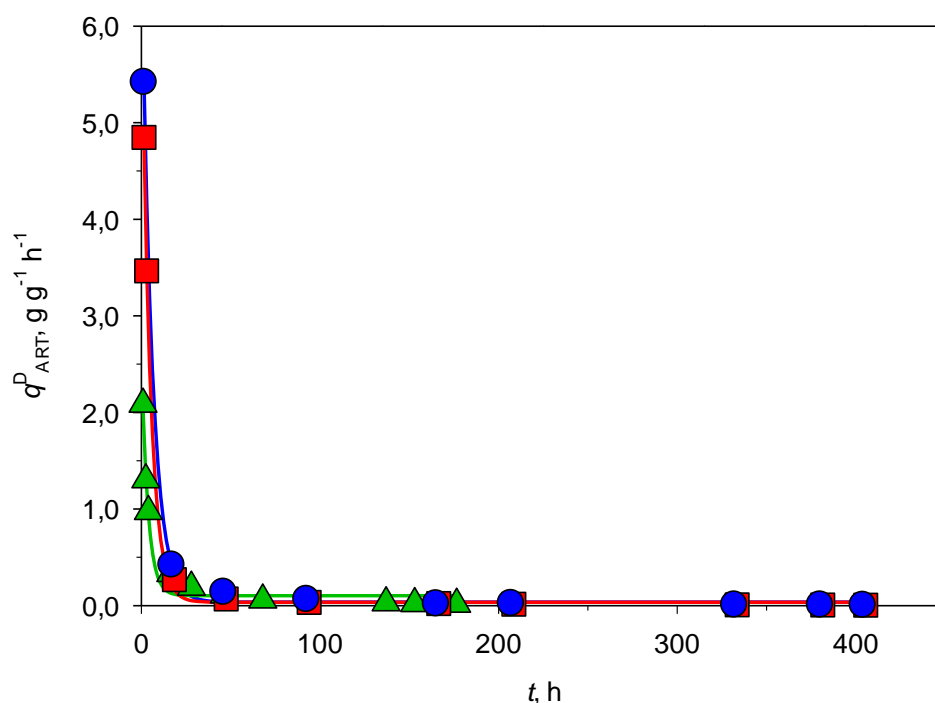


Figura 4.7 Velocidades específicas de consumo de sustrato ($q_{\text{ART}}^{\text{D}}$) en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (F-S1b, F-S2b y F-S3), en condiciones de microaeración, a 40°C y $4,5$ de pH_0 , con 25 g dm^{-3} de D-ARA₀ (●), L-ARA₀ (■) ó D-XIL₀ (▲).

Cuando el rendimiento en biomasa permanece constante en el transcurso del experimento y además se admite que no existe mantenimiento celular o que éste es despreciable, es decir, $Y_{\text{x}/\text{ART}} = Y_{\text{x}/\text{ART}}^{\text{G}}$, la velocidad específica de consumo de sustrato

(q_{ART}) puede ser calculado utilizando el método integral de tratamiento de datos cinéticos. A partir de las ecuaciones, 4.17 y 4.18, y de la definición de velocidad específica de crecimiento [$\mu = (1/x) dx/dt$], se puede deducir Ec. 4.22,

$$q_{ART} = \frac{\mu}{Y_{x/ART}^G} \quad [4.22]$$

donde q_{ART} sería un valor de la velocidad específica de consumo de sustrato determinada por el método integral de tratamiento de datos cinéticos.

Con los valores de μ_m y P_b determinados previamente, y conocidos los rendimientos globales en biomasa $Y_{x/ART}^G$ se calcula la velocidad específica de consumo de sustrato, q_{ART} . Durante la fase exponencial $\mu = \mu_m$, mientras que en la fase lineal, según Ec. 4.16 se cumplirá que:

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{P_b}{x} \quad [4.23]$$

ecuación que permite el cálculo del valor de μ en la fase lineal y con ello q_{ART} para los tiempos comprendidos dentro de este intervalo.

Se observa una aceptable concordancia entre los valores de las velocidades específicas de consumo de sustrato evaluados por los métodos diferencial (q_{ART}^D) e integral (q_{ART}), fundamentalmente en la fase de desaceleración del crecimiento, Tabla 4.12. En este sentido, se debe de considerar que los parámetros determinados en el periodo de comportamiento lineal de la biomasa están más apoyados por valores experimentales.

4.2.1.3 Formación de bioproductos

Los bioproductos mayoritarios formados durante la fermentación de D-arabinosa y L-arabinosa con *H. polymorpha* ha sido arabitol, y en el caso de D-xilosa, xilitol. La máxima concentración determinada en etanol no supera los 0,12 g dm⁻³ en condiciones de microaeración, 40°C y 4,5 de pH₀ (Tabla B.6 y Figura B.6 del Anexo B.1), no considerándose un bioproducto de formación mayoritaria. De igual forma, no se han detectado concentraciones elevadas de ácido acético durante la fermentación, siendo 0,02 g dm⁻³ el valor más elevado alcanzado en esta serie, en la fermentación de D-arabinosa (Tabla B.2 y Figura B.2 del Anexo B.1). La formación de bioproductos ha sido estudiada a

través de la determinación de los siguientes parámetros: rendimientos instantáneos en arabitol ($Y_{Ar/ART}$), y en xilitol ($Y_{Xi/ART}$), y velocidades específicas de formación de arabitol (q_{Ar}) y xilitol (q_{Xi}).

➤ Velocidad específica de formación de arabitol

Al igual que en la velocidad específica de consumo de sustrato (q_{ART}), para determinar esta velocidad se ha aplicado inicialmente el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos (q_{Ar}^D). Según Aiba *et al.* (1973), la velocidad específica de formación de bioproducto, se puede expresar según una ecuación similar a la 4.24, que ha sido concretada para el caso de arabitol,

$$q_{Ar} = \frac{1}{x} \frac{dAr}{dt} \quad [4.24]$$

donde Ar representa la concentración de arabitol a lo largo del experimento. En este caso, la dificultad reside en la evaluación de la velocidad de producción de arabitol por unidad de volumen, es decir, dAr/dt . Se ha optado por efectuar un sencillo ajuste empírico de los datos Ar vs t de cada experimento que posteriormente permita la determinación analítica de la derivada. Tras ensayar diferentes ecuaciones empíricas para dicho ajuste, se observa que los datos referidos a las concentraciones de arabitol y tiempo de cultivo se ajustan de manera bastante satisfactoria a una ecuación lineal. En definitiva, dAr/dt se obtendría de manera sencilla como la pendiente resultante de representar Ar versus t (Fig. 4.8), pudiéndose obtener finalmente la velocidad específica de producción de arabitol por el método diferencial (q_{Ar}^D), Tabla 4.13.

La velocidad de producción de arabitol por unidad de volumen obtenida durante la fermentación de D-arabinosa, dAr/dt , fue la misma que la determinada cuando se substituyó la fuente de carbono y energía por L-arabinosa en las mismas condiciones de operación, $0,005 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, Fig. 4.8. No obstante, cuando el sustrato fue D-arabinosa, se alcanzaron concentraciones en arabitol superiores a las conseguidas durante la fermentación de L-arabinosa; se determinó una concentración máxima de arabitol de $1,96 \text{ g dm}^{-3}$ tras 190 h de fermentación de D-arabinosa con *H. polymorpha*, (Tabla B.1 del Anexo B.1) mientras que la concentración máxima cuando se substituyó la pentosa por L-arabinosa fue $0,644 \text{ g dm}^{-3}$ tras 117 h (Tabla B.4 del Anexo B.1). Cabe destacar también el hecho de que la producción de

arabitol es más tardío en el caso de D-arabinosa, Fig. 4.8; con L-arabinosa como sustrato, la producción de arabitol dio comienzo en torno a las 20 h (Tabla B.4 del Anexo B.1) mientras que cuando el sustrato fue D-arabinosa, la existencia de arabitol se detecta a partir de las 45 ó 150 h (Tabla B.1 ó B.2 del Anexo B.1). Esta observación podría indicar que la producción de arabitol a partir de D-arabinosa no está asociada al crecimiento durante la fase exponencial.

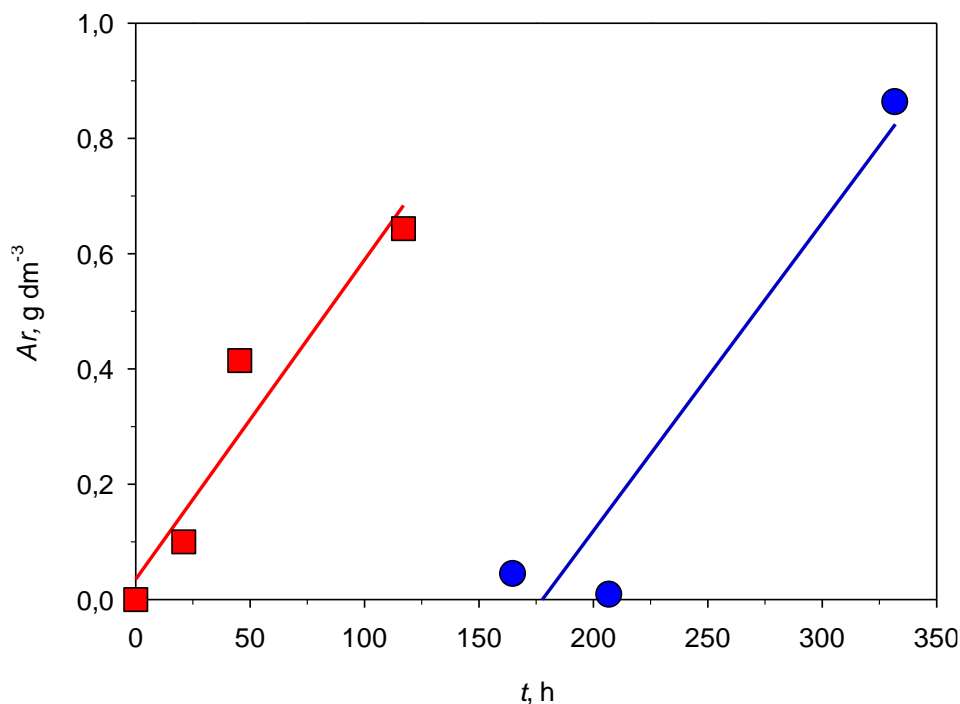


Figura 4.8 Ajuste de la concentración de arabitol frente al tiempo. Cálculo de la velocidad específica de formación de arabitol (q_{Ar}^D) en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (F-S1b y F-S2a), en condiciones de microaeración, a 40°C y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (●) ó L-ARA₀ (■).

En esta serie se observa cómo, para ambos sustratos (D y L-arabinosa) la velocidad específica de producción de arabitol (q_{Ar}^D) disminuye a lo largo del tiempo de cultivo, Tabla 4.13. Cuando la pentosa fue D-arabinosa, se determinó un valor para q_{Ar}^D de 0,007 g g⁻¹ h⁻¹, transcurridas 50 h de fermentación (Expto. F-S1a). Considerando L-arabinosa como sustrato y tras el mismo tiempo de bioproceso, la mínima velocidad específica de producción de arabitol obtenida fue inferior, 0,004 g g⁻¹ h⁻¹ (Expto. F-S2a), siendo la máxima calculada del orden de 0,006 g g⁻¹ h⁻¹ (Expto. F-S2b), Tabla 4.13.

4. Resultados y discusión

Los valores determinados de q_{Ar}^D a 40°C y $pH_0 = 4,5$ fueron inferiores a los obtenidos por Sánchez *et al.* (1998) en la fermentación de D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C y $pH_0 = 4,5$, obteniendo xilitol como bioproducto principal; en efecto, se registró una velocidad específica de producción de xilitol (q_{Xl}^D) del orden de 0,061 g g⁻¹ h⁻¹ una vez transcurridas 80 h de cultivo.

Tabla 4.13
FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
INFLUENCIA NATURALEZA DEL SUSTRATO
Velocidades específicas de formación de arabitol (q_{Ar}^D y q_{Ar})
 $T = 40^\circ\text{C}$, $pH_0 = 4,5$ y condiciones de microaeración

Sustrato	Expto.	Fase	t, h	q_{Ar}^D 10 g g ⁻¹ h ⁻¹	q_{Ar} 10 g g ⁻¹ h ⁻¹
D-arabinosa	F-S1a	LIN	50,0	0,065	0,063
		LIN	150,0	0,030	0,029
		LIN	189,5	0,031	0,030
	F-S1b	LIN	165,0	0,037	0,030
		LIN	200,0	0,039	0,032
		LIN	332,0	0,022	0,018
	F-S1c	LIN	68,0	0,016	0,014
		LIN	150,0	0,006	0,006
		LIN	176,5	0,006	—
L-arabinosa	F-S2a	LIN	21,0	0,059	0,038
		LIN	50,0	0,037	0,024
		LIN	117,0	0,021	0,014
	F-S2b	EXP	10,0	0,327	0,392
		LIN	50,0	0,061	0,054
		LIN	94,0	0,039	0,034

Por otra parte, la productividad instantánea en arabitol se puede definir según Ec. 4.25.

$$Y_{Ar/x} = \frac{dAr}{d(x - x_0)} \quad [4.25]$$

Si este parámetro permanece constante durante la fermentación, y en experimentos donde no exista concentración en arabitol a tiempo cero, una representación de Ar frente a $(x - x_0)$ daría lugar a una línea recta cuya pendiente se determinaría $Y_{Ar/x}$, Fig. 4.9. Esta pendiente constante correspondería a la productividad global en arabitol, $Y_{Ar/x}^G$.

Considerando constante la productividad instantánea en arabitol e igual a $Y_{Ar/x}^G$, a partir de la definición de velocidad específica de crecimiento (Aiba *et al.*, 1973), de las ecuaciones 4.24 y 4.25, y admitiendo la ausencia de mantenimiento celular, la velocidad específica de producción de arabitol puede expresarse según Ec. 4.26,

$$q_{Ar} = Y_{Ar/x}^G \mu \quad [4.26]$$

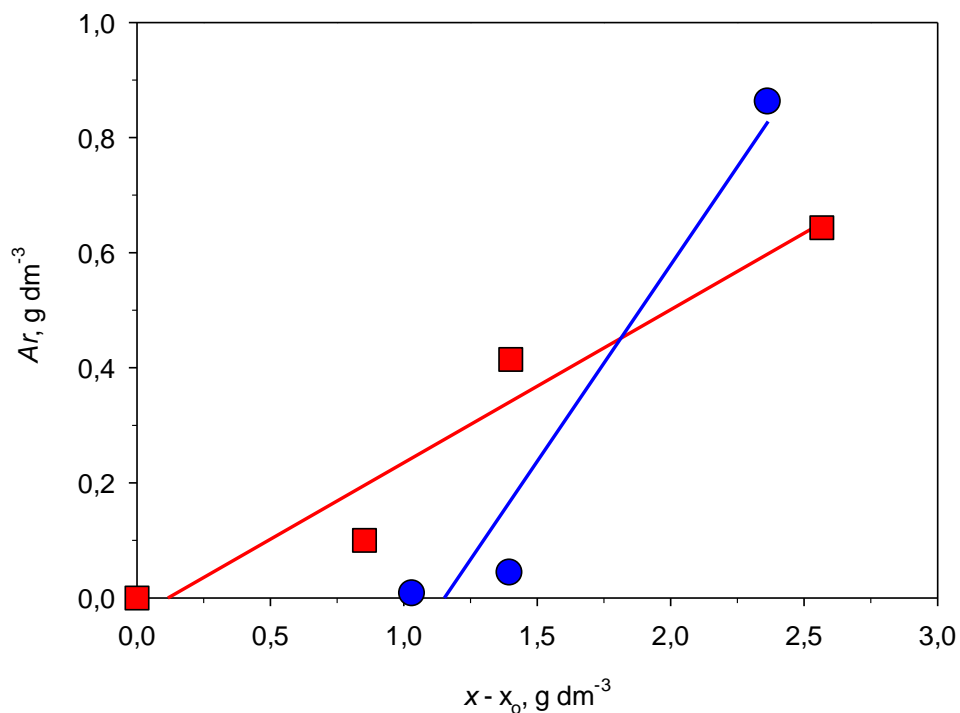


Figura 4.9 Determinación de la productividad global en arabitol ($Y_{Ar/x}^G$) según la Ec. 4.25 en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (F-S1b y F-S2a), en condiciones de microaeración, a 40°C y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (■) ó L-ARA₀ (●)

La productividad global en arabitol ($Y_{Ar/x}^G$) es superior si se compara D-arabinosa con L-arabinosa como sustrato en la fermentación con *H. polymorpha* a 40°C y 4,5 de pH_0 (Fig. 4.9). En general, también se observa cómo la producción de arabitol no está asociada al crecimiento de biomasa durante las primeras horas de cultivo cuando la pentosa es D-arabinosa.

Se observa una aceptable concordancia entre los valores de las velocidades específicas de producción de arabitol evaluados por los métodos diferencial (q_{Ar}^D) e integral (q_{Ar}), Tabla 4.13. En algunos experimentos, q_{Ar} no se pudo calcular en la fase exponencial bien porque $Y_{Ar/x}^G$ no estaba dentro de dicha fase ó bien aún estando, no existían valores experimentales suficientes que apoyaran dicha etapa con el fin de poder calcular la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m).

➤ Velocidad específica de formación de xilitol

El método diferencial de tratamiento de datos cinéticos ha sido aplicado para determinar la velocidad específica de formación de xilitol, q_{Xi} , Ec. 4.27.

$$q_{Xi} = \frac{1}{x} \frac{dXi}{dt} \quad [4.27]$$

donde Xi representa la concentración de xilitol a lo largo del experimento. Al igual que en el caso de arabitol, la dificultad reside en la evaluación de la velocidad de producción de xilitol por unidad de volumen, es decir, dXi/dt . Por las mismas consideraciones realizadas anteriormente, se ha optado por efectuar un sencillo ajuste empírico de los datos Xi vs t de cada experimento que posteriormente permita la determinación analítica de la derivada. Tras ensayar diferentes ecuaciones empíricas para dicho ajuste, se observa que los datos referidos a las concentraciones de xilitol y tiempo de cultivo se ajustan de manera bastante satisfactoria a una ecuación lineal. En definitiva, dXi/dt se obtendría de manera sencilla como la pendiente resultante de representar Xi versus t (Fig. 4.10), pudiéndose obtener finalmente la velocidad específica de producción de xilitol por el método diferencial (q_{Xi}^D), Tabla 4.14.

Cuando la fuente de carbono y energía es D-xilosa, al igual que en el caso de D y L-arabinosa, la velocidad específica de producción de xilitol (q_{Xi}^D) disminuye a lo largo del tiempo de cultivo, Tabla 4.14. Si se comparan estos resultados con los obtenidos cuando se utiliza D ó L-arabinosa como sustrato (Tabla 4.13), se observa cómo se obtuvieron valores de q_{Xi}^D superiores a los determinados para q_{Ar}^D transcurridos el mismo tiempo de cultivo. En este sentido, en la fermentación de D-xilosa con *H. polymorpha* a 40°C y 4,5 de pH, se

determinó un valor para $q_{X_i}^D$ de 0,013 y 0,008 g g⁻¹ h⁻¹ tras 50 y 153 h de bioproceso (Expto. F-S3), Tabla 4.14.

El valor determinado para la velocidad específica de producción de xilitol a $t = 50$ h (Tabla 4.14) es muy similar al obtenido por Sánchez *et al.* (2004) en la fermentación de D-xilosa con *P. tannophilus*, $pH = 4,5$ y $37^\circ C$, tras el mismo tiempo de cultivo, 0,012 g g⁻¹ h⁻¹. No obstante, estas velocidades son inferiores si se comparan con las determinadas en la fermentación de D-xilosa con *H. polymorpha* a $30^\circ C$ y $pH_o = 4,5$ (Sánchez *et al.*, 1998); en efecto, en la dicha investigación se obtuvieron valores de $q_{X_i}^D$ de 0,14 y 0,061 g g⁻¹ h⁻¹ tras 30 y 80 h de cultivo, respectivamente. Estas investigaciones previas se realizaron con biorreactores discontinuos, tipo mezcla perfecta, 500 cm³ y 500 rpm (microaeración por vórtice), mientras que en este estudio se ha operado utilizando matraces Erlenmeyer de 50 cm³ y un agitador orbital con velocidad de 100 rpm.

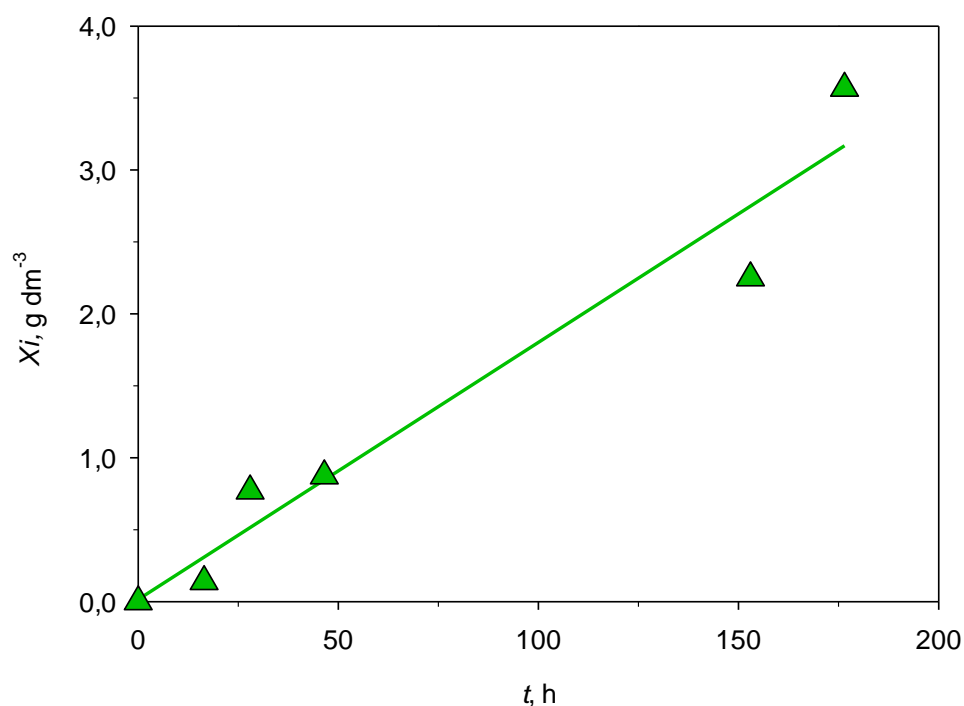


Figura 4.10 Ajuste de la concentración de xilitol frente al tiempo. Cálculo de la velocidad específica de formación de xilitol ($q_{X_i}^D$) en el experimento de fermentación con *H. polymorpha* (F-S3), en condiciones de microaeración, a $40^\circ C$ y $pH_o = 4,5$, con $25\ g\ dm^{-3}$ de D-XIL_o (▲).

Tabla 4.14
 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
 INFLUENCIA NATURALEZA DEL SUSTRATO
 Velocidades específicas de formación de xilitol (q_{Xi}^D y q_{Xi})
 $T = 40^\circ\text{C}$, $\text{pH}_0 = 4,5$ y condiciones de microaeración

Sustrato	Expto.	Fase	t, h	q_{Xi}^D g g ⁻¹ h ⁻¹	q_{Xi} g g ⁻¹ h ⁻¹
D-xilosa	F-S3	LIN	10,0	0,042	0,077
		LIN	16,5	0,029	0,054
		LIN	28,0	0,020	0,037
		LIN	50,0	0,013	0,024
		EST	153,0	0,008	—
		EST	176,5	0,007	—

Al igual que en el caso del arabitol, en experimentos donde no exista concentración en xilitol a tiempo cero la productividad instantánea en xilitol se define según Ec. 4.28.

$$Y_{Xi/x} = \frac{dXi}{d(x-x_0)} \quad [4.28]$$

Si este parámetro permanece constante durante la fermentación, una representación de Xi frente a $(x-x_0)$ daría lugar a una línea recta cuya pendiente sería $Y_{Xi/x}$ y de ordenada en el origen nula, Fig. 4.11. En este caso, esta pendiente constante correspondería a la productividad global en xilitol, $Y_{Xi/x}^G$. Considerando constante la productividad instantánea en xilitol e igual a $Y_{Xi/x}^G$, a partir de la definición de velocidad específica de crecimiento [$\mu = (1/x) dx/dt$], (Aiba *et al.*, 1973), así como de las Ec. 4.24 y 4.28, y admitiendo ausencia de mantenimiento celular, la velocidad específica de producción de xilitol puede expresarse según Ec. 4.29,

$$q_{Xi} = Y_{Xi/x}^G \mu \quad [4.29]$$

Se observa una aceptable concordancia entre los valores de las velocidades específicas de producción de xilitol evaluados por los métodos diferencial (q_{Xi}^D) e integral (q_{Xi}), Tabla 4.14.

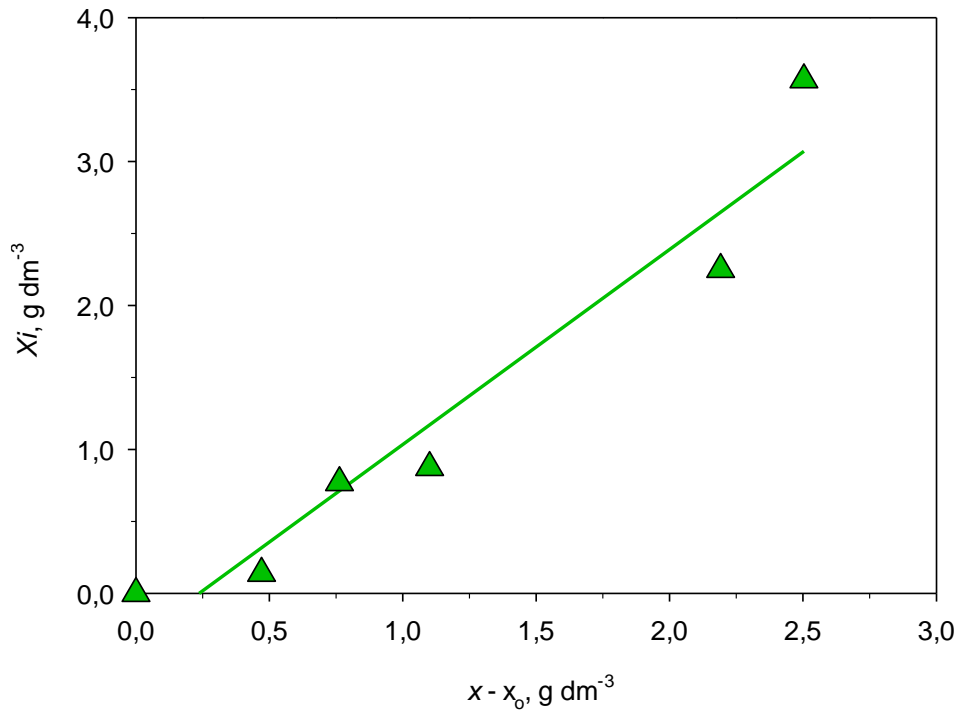


Figura 4.11 Determinación de la productividad global en xilitol ($Y_{X_i/x}^G$) según la Ec. 4.28 en el experimento de fermentación con *H. polymorpha* (F-S3), en condiciones de microaeración, a 40°C y $\text{pH}_0 = 4,5$ de, con 25 g dm^{-3} de D-XIL₀ (▲).

➤ Rendimiento instantáneo en arabitol ($Y_{Ar/ART}$)

Al igual que el rendimiento en biomasa ($Y_{x/ART}$), el rendimiento instantáneo en arabitol, $Y_{Ar/ART}$, se puede definir como el cociente entre el arabitol neto producido y el sustrato neto consumido en un instante dado del cultivo, Ec. 4.30.

$$Y_{Ar/ART} = \frac{d(Ar - Ar_0)}{d(ART_0 - ART)} \quad [4.30]$$

Si el rendimiento permanece constante a lo largo del experimento, una representación de los valores de $(Ar - Ar_0)$ a distintos tiempos frente a $(ART_0 - ART)$ debería conducir a una recta de pendiente $Y_{Ar/ART}$ y de ordenada en el origen nula. Aunque no fuese nula, el rendimiento obtenido mediante la pendiente correspondería a todo el experimento y por tanto, para distinguirlo del instantáneo, se podría denominar rendimiento medio ó global en

arabitol, $Y_{Ar/ART}^G$, Fig. 4.12. Lógicamente, no se considera la concentración inicial de arabitol puesto que a $t = 0$ h, $Ar_0 \rightarrow 0$.

Se ha observado que la formación de arabitol a partir de L-arabinosa se inicia a tiempos próximos al comienzo del cultivo, mientras que cuando el sustrato es D-arabinosa la formación de arabitol está desplazado con respecto a $t = 0$ h, Fig. 4.12.

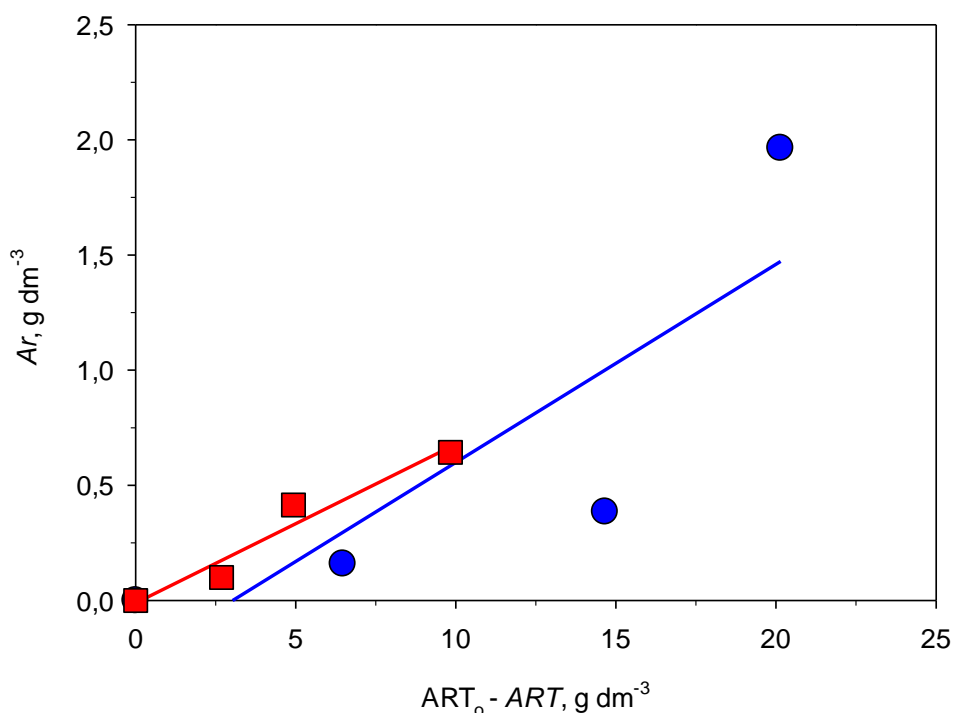


Figura 4.12 Determinación de los rendimientos globales en arabitol ($Y_{Ar/ART}^G$) según la Ec. 4.30 en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (F-S1a y F-S2a), en condiciones de microaeración, a 40°C y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (●) ó L-ARA₀ (■).

Cabe destacar que no se observa diferencia en los valores determinados en el parámetro $Y_{Ar/ART}^G$ para D y L-arabinosa usada como sustrato, Tabla 4.15. En efecto, cuando se utilizó de D-arabinosa, el máximo rendimiento global en arabitol determinado, 0,086 g g⁻¹, fue ligeramente superior al obtenido en caso de ser L-arabinosa la fuente de carbono y energía, 0,069 g g⁻¹. Para los experimentos F-S1b y F-S2b (Tabla B.1 y B.4, Anexo B.1, respectivamente) no se pudieron determinar los rendimientos globales en arabitol por no existir valores experimentales suficientes referidos a azúcares reductores totales en la fase

de linealidad de arabitol que apoyaran dicha etapa con el fin de poder calcular $Y_{Ar/ART}^G$. Es por ello que se determinó el rendimiento instantáneo en arabitol ($Y_{Ar/ART}$) en los tiempos de cultivo incluidos en esta etapa de producción lineal de arabitol.

Tabla 4.15
FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
INFLUENCIA NATURALEZA DEL SUSTRATO
Rendimientos globales en arabitol y xilitol ($Y_{Ar/ART}^G$, $Y_{Xi/ART}^G$)
 $T = 40^\circ\text{C}$, $\text{pH}_0 = 4,5$ y condiciones de microaeración

Sustrato	Expto.	t, h	$Y_{Ar/ART}^G$ g g ⁻¹	$Y_{Xi/ART}^G$ g g ⁻¹
D-arabinosa	F-S1a		0,086	
	F-S1b	332,0	0,069*	
L-arabinosa	F-S2a		0,069	
	F-S2b	94,0	0,074*	
D-xilosa	F-S3			0,149

(*) Rendimiento instantáneo en arabitol ($Y_{Ar/ART}$).

El rendimiento global en arabitol determinado cuando L-arabinosa fue la fuente de carbono y energía son similares a los determinados por Escalante *et al.* (1990b), 0,064 g g⁻¹, en la fermentación de 30 g dm⁻³ de D-glucosa con *H. polymorpha* a 45°C y $\text{pH} = 4,8$; este grupo de investigación utiliza fermentadores de 2 dm³ de capacidad con una velocidad de agitación de 1.000 rpm e introduciendo aire esterilizado (1,0 v/v/min), y no explica el mecanismo de formación de arabitol partiendo de una hexosa como es D-glucosa.

➤ Rendimiento instantáneo en xilitol ($Y_{Xi/ART}$)

De igual forma, el rendimiento instantáneo en xilitol, $Y_{Xi/ART}$, partiendo de D-xilosa, se define según la Ec. 4.31,

$$Y_{Xi/ART} = \frac{d(Xi - Xi_0)}{d(ART_0 - ART)} \quad [4.31]$$

Si este parámetro permanece constante durante la fermentación, una representación de $(X_i - X_{i_0})$ frente a $(ART_0 - ART)$ daría lugar a una línea recta cuya pendiente sería $Y_{X_i/ART}$ y de ordenada en el origen nula. En este caso, este rendimiento constante correspondería al rendimiento global en xilitol $Y_{X_i/ART}^G$. Se puede realizar la representación de X_i frente a $(ART_0 - ART)$ si se considera la concentración inicial en xilitol es nula, ya que a $t = 0$ h $X_{i_0} \rightarrow 0$, Figura 4.13.

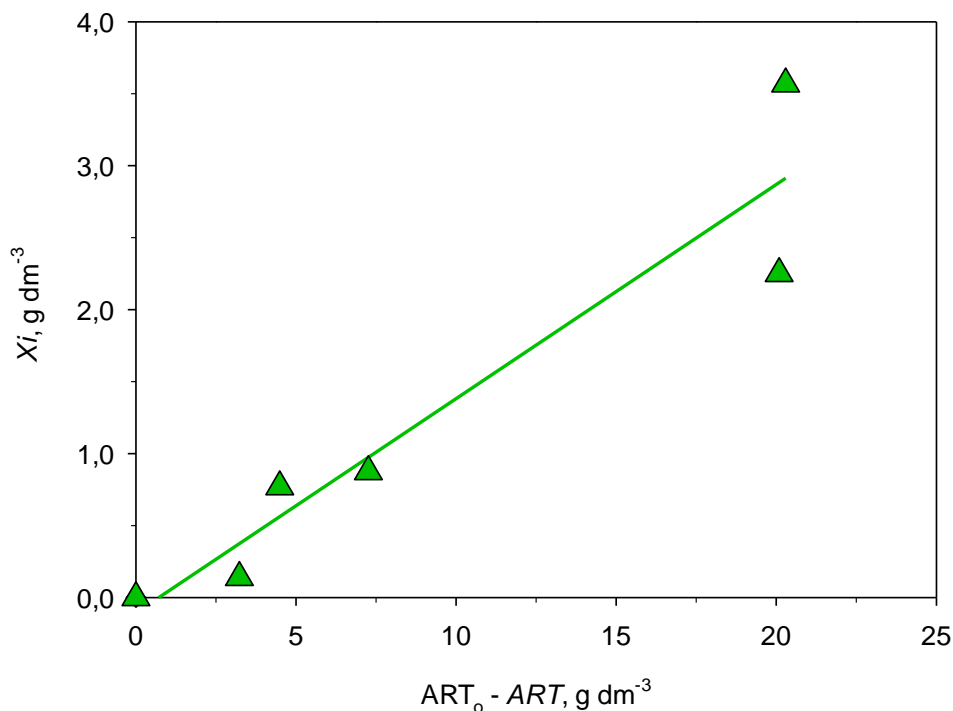


Figura 4.13 Determinación del rendimiento global en xilitol ($Y_{X_i/ART}^G$) según la Ec. 4.31 en el experimento de fermentación con *H. polymorpha* (F-S3), en condiciones de microaeración, a 40°C y $pH_0 = 4,5$, con $25\ g\ dm^{-3}$ de *D-XIL_0* (\blacktriangle).

Al igual que con la generación de arabitol, se ha observado que la formación de xilitol a partir de D-xilosa se inicia a tiempos próximos al comienzo del cultivo, Fig. 4.13.

El rendimiento global obtenido en xilitol, $0,149\ g\ g^{-1}$, es dos veces superior al determinado para arabitol ($Y_{Ar/ART}^G$) cuando la fuente de carbono y energía fue L-arabinosa, Tabla 4.15.

Por otro lado, los valores obtenidos para $Y_{X/ART}^G$ son muy superiores a los determinados por Sánchez *et al.* (1997), en la fermentación de D-xilosa con *C. shehatae* a 30°C y $pH_0 = 4,5$, en biorreactores discontinuos, tipo mezcla perfecta, a 500 rpm (0,078 g g⁻¹). No obstante, si se comparan con el estudio realizado por García (2007) y Sánchez *et al.* (2008) durante la fermentación de azúcares sintéticos con *C. tropicalis* (utilizando una temperatura de 30°C, $pH_0 = 5,0$, una agitación de 500 rpm y condiciones de microaeración) observan que, partiendo de D-xilosa como sustrato, se alcanzan rendimientos globales en xilitol muy superiores a los obtenidos en la actual investigación, 0,25 g g⁻¹.

De igual forma, el rendimiento global en xilitol obtenido en este estudio fue próximo al conseguido durante la fermentación con *C. shehatae*, 0,15 g g⁻¹, partiendo de una concentración inicial en D-xilosa de 50 g dm⁻³, y manteniendo unas condiciones de operación de 36°C y $pH = 4,0$, una velocidad de agitación de 300 rpm y 200 cm³ min⁻¹ de velocidad de aeración (du Preez *et al.*, 1986); en dicha investigación, manteniendo las mismas condiciones de operación y sustituyendo la levadura por *P. stipitis*, el rendimiento disminuyó considerablemente a un valor próximo a 0,05 g g⁻¹. Hay que destacar el hecho de que, por tratarse de levaduras mesófilas, la temperatura máxima alcanzada fue 36°C; *H. polymorpha*, por ser termófila, puede alcanzar una temperatura de trabajo superior a 40°C.

Los valores determinados de $Y_{X/ART}^G$ son también muy similares a los calculados en la fermentación con *P. tannophilus*, 0,14 g g⁻¹, partiendo de 25 g dm⁻³ de D-xilosa, $pH = 4,5$, y 15°C, Sánchez *et al.* (2004). Esta investigación se realizó con biorreactores discontinuos, tipo mezcla perfecta, con un volumen de cultivo de 500 cm³ y 500 rpm, mientras que en este estudio se ha operado utilizando matraces Erlenmeyer de 50 cm³ y un agitador orbital con velocidad de 100 rpm.

Sin embargo, muy superiores fueron los rendimientos globales en xilitol obtenidos por el mismo grupo de investigación, 0,62 g g⁻¹, durante la fermentación de 25 g dm⁻³ de concentración inicial de D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C, $pH_0 = 4,5$ y en condiciones microaeróbicas conseguidas sólo a partir del vórtice de agitación en un biorreactor discontinuo, tipo tanque agitado (Sánchez *et al.*, 1998).

4.2.2 Efecto del nivel de aeración

En estas series experimentales se llevó a cabo la fermentación con *H. polymorpha* de D-arabinosa y D-xilosa, en cada caso, partiendo de una concentración inicial de sustrato de 25

g dm⁻³. Fijado el *pH* a 4,5 y 30°C de temperatura, se modificaron las condiciones de aeración con el fin de estudiar el efecto de esta variable en el bioproceso. En definitiva, la fermentación se llevó a cabo en condiciones microaeróbicas, conseguidas sólo a partir del vórtice de agitación, y en otros casos anaeróbicas, es decir, impidiéndose la entrada de aire por cierre del Erlenmeyer mediante un tapón de rosca. Esta influencia fue analizada parcialmente en estudios previos del grupo de investigación (Sánchez *et al.*, 1998).

Los resultados experimentales obtenidos en cuanto a evolución del *pH*, generación de biomasa, consumo de sustrato, y formación de bioproductos durante el transcurso del proceso de fermentación se han indicado en las Tablas B.7 a B.12, y se han representado en las Figuras B.7 a B.12, Anexo B.2, los mismos parámetros excepto el *pH* y la concentración de etanol.

4.2.2.1 Formación de biomasa

Al igual que en la serie anterior, con el fin de evaluar la formación en biomasa usando *H. polymorpha* se emplearon los parámetros característicos del crecimiento celular: velocidad específica máxima de crecimiento y la productividad volumétrica en biomasa.

En esta serie no se ha podido evaluar la velocidad específica máxima de crecimiento debido a que durante la fase exponencial no se pudo caracterizar de forma exhaustiva (Tablas B7 a B12, Anexo B.2).

Tras representar x vs t , Fig. 4.14, con el fin de establecer la fase de desaceleración en cada uno de los experimentos, se han determinado los valores de la productividad volumétrica en biomasa mediante ajuste por mínimos cuadrados de los datos de concentración de biomasa y tiempo de proceso (Tablas B.7 a B.12, Anexo B.2) a la Ec. 4.16, Tabla 4.16. Es necesario indicar que los cálculos de P_b se han realizado con pocos valores experimentales, lo que podría explicar en los experimentos usando como sustrato D-7 arabinosa en condiciones de microaeración, la falta de reproducibilidad.

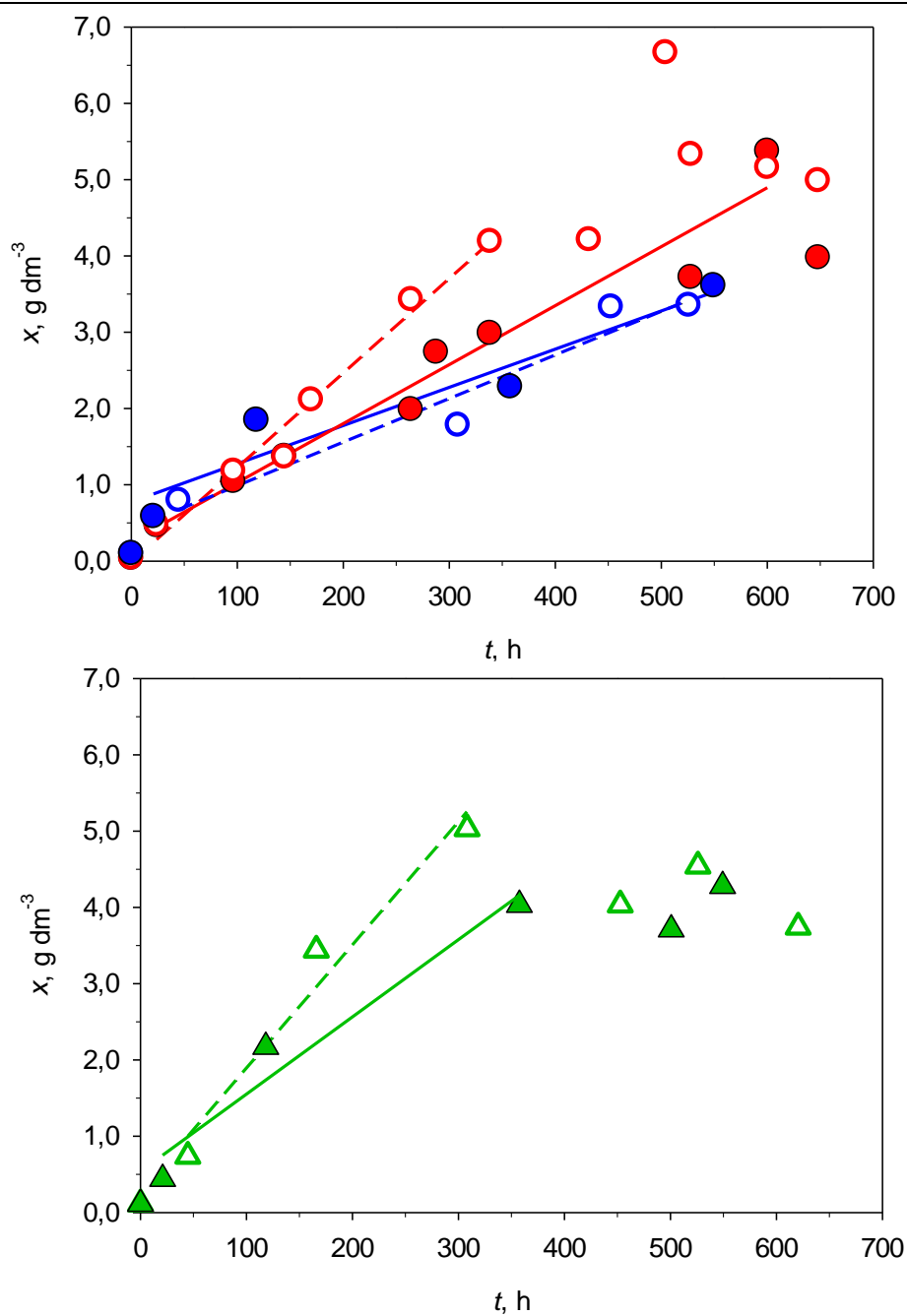


Figura 4.14 Determinación de la productividad volumétrica en biomasa (P_b), según la ecuación 4.16, en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1-Ma \circ , FS1-Mb \circ , FS1-Aa \bullet , FS1-Ab \bullet , FS3-M \triangle y FS3-A \triangle), a 30°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, con 25 g dm^{-3} de D-ARA₀ (círculo) ó D-XIL₀ (triángulo), en condiciones de microaeración (símbolos huecos) ó anaeróbicas (símbolos rellenos).

Tabla 4.16
 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
 EFECTO DEL NIVEL DE AERACIÓN
 Productividad volumétrica de biomasa (P_b)
 $T = 30^\circ\text{C}$ y $\text{pH}_0 = 4,5$

Sustrato	Condiciones de operación	Expto.	P_b $\text{g dm}^{-3} \text{h}^{-1}$	r^2	VM $\text{g dm}^{-3} \text{h}^{-1}$	σ
D-arabinosa	Microaeración	FS1-Ma	0,006	0,940	0,009	0,003
		FS1-Mb	0,012	0,977		
	Anaeróbicas	FS1-Aa	0,005	0,913	0,007	0,002
		FS1-Ab	0,008	0,956		
D-xilosa	Microaeración	FS3-M	0,016	0,963	0,016	
	Anaeróbicas	FS3-A	0,010	0,953	0,010	

El máximo valor de productividad en biomasa obtenido en esta serie, próximo a $0,02 \text{ g dm}^{-3} \text{h}^{-1}$, fue utilizando D-xilosa como sustrato en condiciones anaeróbicas, Tabla 4.16.

Si se comparan los valores de P_b en función de las condiciones de aeración durante el bioproceso, Tabla 4.16, se observa que en anaerobiosis se obtienen unas productividades en biomasa inferiores a las determinadas en situación de microaeración, independientemente de la pentosa utilizada (D-arabinosa ó D-xilosa). En efecto, en la fermentación de D-arabinosa con *H. polymorpha*, 30°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, se alcanzaron una productividad volumétrica en biomasa media de $0,009$ y $0,007 \text{ g dm}^{-3} \text{h}^{-1}$ en condiciones de de microaeración y anaeróbicas, respectivamente. Cuando la fuente de carbono y energía se modificó por D-xilosa, manteniendo las mismas condiciones de operación, se consiguieron valores de P_b de $0,016 \text{ g dm}^{-3} \text{h}^{-1}$ en condiciones de microaeróbicas y $0,010 \text{ g dm}^{-3} \text{h}^{-1}$ en un medio anaerobio. De igual forma, cabe destacar que estos valores de productividad en biomasa son superiores en el caso de utilizar D-xilosa como fuente de carbono frente a D-arabinosa, aspecto que ya se puso de manifiesto durante la evaluación de los resultados alcanzados para P_b en el estudio de la influencia de la naturaleza del sustrato en el bioproceso, Tabla 4.10.

Estos valores de P_b obtenidos utilizando D-xilosa como sustrato son muy próximos a los determinados por Sánchez *et al.* (1997) en la fermentación de D-xilosa con *C. shehatae* en biorreactores discontinuos de 500 cm^3 , tipo mezcla perfecta. El bioproceso se llevó a cabo a 30°C , $\text{pH} = 4,5$ y condiciones de microaeración por vórtice (500 rpm), obteniendo una productividad volumétrica en biomasa de $0,024 \text{ g dm}^{-3} \text{h}^{-1}$. Al modificar las condiciones de

aeración, es decir, aumentar la velocidad de suministro de aire, el valor de P_b no siguió una tendencia definida.

Al igual que en la serie anterior sobre la naturaleza del sustrato, la fase de comportamiento lineal de la biomasa es característica de procesos controlados por etapas de naturaleza física; en este caso, el control cinético del bioproceso reside en la transferencia de oxígeno en el medio líquido y fue puesta de manifiesto por otros autores usando diferentes levaduras (Detroy *et al.*, 1982; Jeffries, 1982; Sánchez *et al.*, 2002a).

En algunos experimentos realizados en esta serie se ha observado un considerable aumento del valor del pH inicial (4,5). Es el caso del Expto. FS1-Mb (Tabla B.8, Anexo B.2); tras 114,5 h de fermentación con D-arabinosa en condiciones microaeróbicas, el pH de cultivo se elevó hasta 6,0, manteniéndose en torno a dicho valor hasta el final del bioproceso. En condiciones anaeróbicas y con la misma fuente de carbono, Expto. FS1-Aa (Tabla B.9, Anexo B.2), el pH alcanzó un valor máximo de 7,5 tras 169,8 h de cultivo, momento en el que comienza a descender para mantenerse en torno a 6,0 hasta el final del proceso de fermentación. De igual forma, ocurrió con D-xilosa en condiciones de microaeración, FS3-M (Tabla B.11, Anexo B.2), al aumentar el pH hasta 6,4 tras 452,8 h de cultivo, no variando significativamente hasta finalizar el bioproceso; en condiciones anaeróbicas, FS3-A (Tabla B.12, Anexo B.2), el pH se elevó hasta 6,5 tras 357,5 h, manteniéndose en torno a dicho valor hasta el final. En definitiva, se detecta un aumento del pH más acusado en condiciones anaeróbicas frente a una situación de microaeración.

La máxima concentración de biomasa que se obtuvo en esta serie, 30°C y 4,5 de pH inicial, fue 6,7 g dm⁻³ con D-arabinosa como sustrato y en condiciones de microaeración (Expto. FS1-Mb, Tabla B.8 del Anexo B.2) tras 504 h de cultivo, existiendo una concentración de ART de 1,8 g dm⁻³ y siendo el pH = 6,0.

4.2.2.2 Consumo de sustrato

El consumo de sustrato ha sido estudiado a través de la determinación del rendimiento global en biomasa y velocidad específica de consumo de sustrato.

A partir de la definición de $Y_{x/ART}^G$, Ec. 4.17, se procedió a la representación de los valores de $(x-x_0)$ a distintos tiempos frente a (ART_0-ART) , Fig. 4.15.

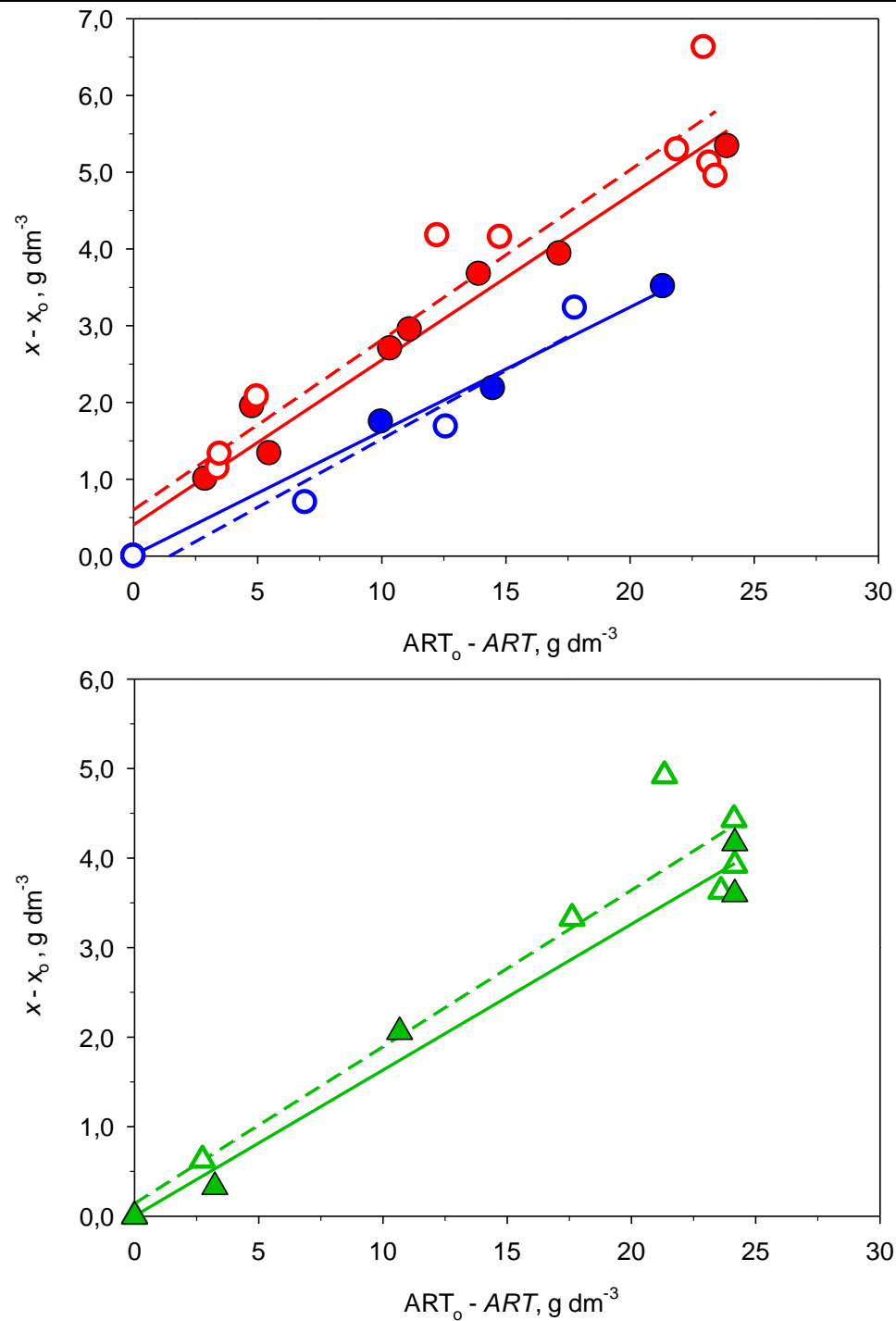


Figura 4.15 Determinación de los rendimientos globales en biomasa ($Y_{X/ART}^G$), según la Ec. 4.17, en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1-Ma \circ , FS1-Mb \bullet , FS1-Aa \circ , FS1-Ab \bullet , FS3-M \triangle y FS3-A \triangle), a 30°C y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm^{-3} de D-ARA $_0$ (círculo) ó D-XIL $_0$ (triángulo), en condiciones de microaeración (símbolos huecos) ó anaeróbicas (símbolos rellenos).

Se observa que en medio anaeróbico se obtuvieron unos valores de $Y_{X/ART}^G$ ligeramente inferiores a los determinados en condiciones de microaeración. Cuando se utilizó D-arabinosa como sustrato durante la fermentación anaeróbica, se alcanzaron valores medios de $Y_{X/ART}^G$ próximos a $0,19 \text{ g g}^{-1}$ (Tabla 4.17); en condiciones de microaeración, el rendimiento global medio fue un poco superior, $0,20 \text{ g g}^{-1}$. Igualmente, las condiciones de aeración influyen en este parámetro cuando la pentosa fue D-xilosa; en efecto, los rendimientos globales medios obtenidos en medio anaeróbico y en condiciones de microaeración fueron próximos a $0,16$ y $0,18 \text{ g g}^{-1}$, respectivamente, valores que difieren ligeramente entre sí. En esta investigación se ha operado utilizando matraces Erlenmeyer de 50 cm^3 y un agitador orbital con velocidad de agitación de 100 rpm .

Tabla 4.17
FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
EFECTO DEL NIVEL DE AERACIÓN

Rendimientos globales en biomasa ($Y_{X/ART}^G$)

$T = 30^\circ\text{C}$ y $\text{pH}_0 = 4,5$

Sustrato	Condiciones de operación	Expto.	$Y_{X/ART}^G$ g g^{-1}	r^2	VM g g^{-1}	σ
D-arabinosa	Microaeración	FS1-Ma	0,178	0,943	0,200	0,022
		FS1-Mb	0,221	0,922		
	Anaeróbicas	FS1-Aa	0,161	0,993	0,188	0,027
		FS1-Ab	0,215	0,970		
D-xilosa	Microaeración	FS3-M	0,175	0,920	0,175	
	Anaeróbicas	FS3-A	0,163	0,978	0,163	

En la fermentación de 25 g dm^{-3} de D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C , con un pH inicial superior al establecido en esta serie (5,5), y en condiciones microaeróbicas conseguidas sólo a partir de vórtice de agitación (Sánchez *et al.*, 1998), se obtuvo un valor de $Y_{X/ART}^G$ inferior al alcanzado en esta serie, $0,12 \text{ g g}^{-1}$. En aquel caso, al modificar únicamente las condiciones de aeración, esto es, incorporando aeración externa al cultivo, se observó un incremento en el rendimiento global en biomasa y que al aumentar la velocidad de aeración a $30,0 \text{ v/v/min}$ se alcanzaba un valor de $0,28 \text{ g g}^{-1}$. En aquella investigación se operó con un biorreactor discontinuo, tipo tanque agitado, con un volumen de 500 cm^3 y una agitación de 500 rpm .

Para determinar la velocidad específica de consumo de sustrato (q_{ART}) se ha aplicado inicialmente el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos. Para ello, la ecuación

que permite obtener una mejor reproducibilidad de los datos de sustrato en mayores intervalos de tiempo en los resultados obtenidos con *H. polymorpha* fue de nuevo la Ec. 4.19. Tras linealizar esta ecuación, Ec. 4.20, y mediante ajustes por mínimos cuadrados de los valores del $\ln[\ln(\text{ART}_0/\text{ART})]$ frente al $\ln t$ (Tablas B.7 a B.12 del Anexo B.2), se obtuvieron los parámetros α y β en cada uno de los experimentos, Fig. 4.16.

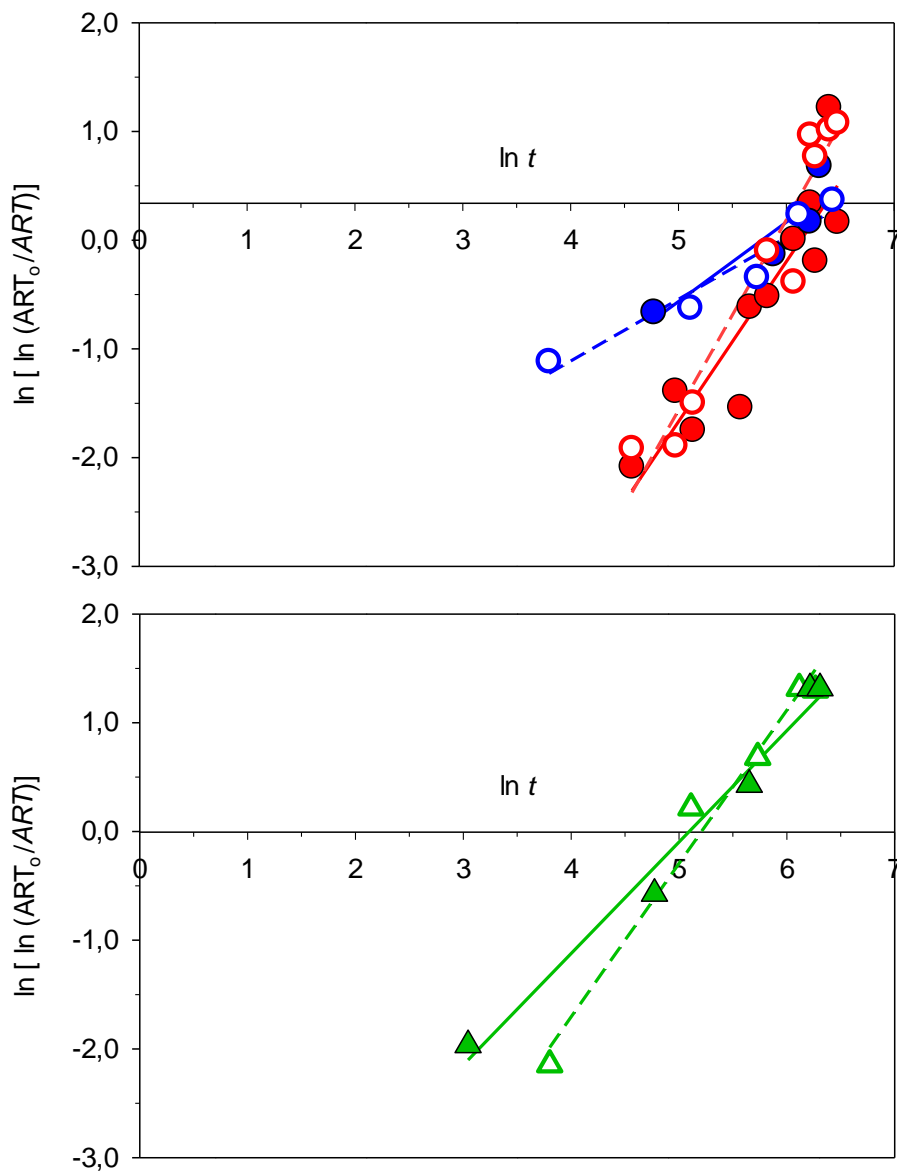


Figura 4.16 Ajuste a la Ec. 4.20 para la determinación de la velocidad específica de consumo de sustrato ($q_{\text{ART}}^{\text{D}}$) de los resultados en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1-Ma \circ , FS1-Mb \circ , FS1-Aa \bullet , FS1-Ab \bullet , FS3-M \triangle y FS3-A \triangle), a 30°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (círculo) ó D-XIL₀ (triángulo), en condiciones de microaeración (símbolos huecos) ó anaeróbicas (símbolos rellenos).

En la Fig. 4.17 se observa cómo, en esta serie experimental, la disminución de la concentración de sustrato en el medio fue más rápida desde el inicio del cultivo para después disminuir lentamente (Tablas B7 a B12, Anexo B.2). De nuevo, al igual que en la serie anterior, se observa sólo dos etapas de consumo de sustrato, aunque ésta no es la tendencia general cuando la concentración de inóculo es pequeña. Este comportamiento, en relación al consumo rápido de los azúcares desde $t = 0$ h, se justifica considerando que se ha utilizado una alta concentración de inóculo, y ello conduce a que no se aprecie la parte horizontal inicial de la curva de consumo de sustrato. Una vez obtenidos los parámetros α y β , se puede comprobar la bondad del ajuste recalculando los valores de ART mediante la ecuación Ec. 4.19. Se observa que para los experimentos anteriores la reproducción es satisfactoria en todo el intervalo de tiempo, Fig. 4.17 (línea continua para condiciones microaeróbicas y discontinua en condiciones anaerobias).

Las condiciones de aeración es un parámetro que influye en la velocidad de consumo del sustrato, Fig. 4.17. En este sentido, se observa claramente que las condiciones de microaeración favorecen el consumo más rápido de azúcares. En efecto, partiendo de una concentración inicial en D-arabinosa de 25 g dm^{-3} , en condiciones de microaeración, $\text{pH}_0 = 4,5$ y 30°C , y transcurridas 528 h, la concentración de D-arabinosa era del orden de $2,8 \text{ g dm}^{-3}$ (Expto. FS1-Mb, Anexo B.2). En medio anaerobio, manteniendo las mismas condiciones de operación, la concentración de este azúcar fue próxima a $10,8 \text{ g dm}^{-3}$ tras 528 h (Expto. FS1-Ab, Anexo B.2).

Cuando se modificó la fuente de carbono y energía por D-xilosa, el consumo de sustrato fue más rápido si se compara con D-arabinosa. En condiciones de microaeración, $\text{pH}_0 = 4,5$ y 30°C , la concentración de D-xilosa en el medio fue del orden de $0,6 \text{ g dm}^{-3}$ transcurridas 452,8 h (Expto. FS3-M, Anexo B.2). Sin embargo, en medio anaerobio, en las mismas condiciones de temperatura y pH, la concentración de azúcares reductores totales fue de $0,6 \text{ g dm}^{-3}$ para un tiempo de 500,8 h (Expto. FS3-A), Fig. 4.17.

A partir de los parámetros α y β y la Ec. 4.21, se determinó la velocidad específica de consumo de sustrato en función del tiempo (q_{ART}^D), Tabla 4.18.

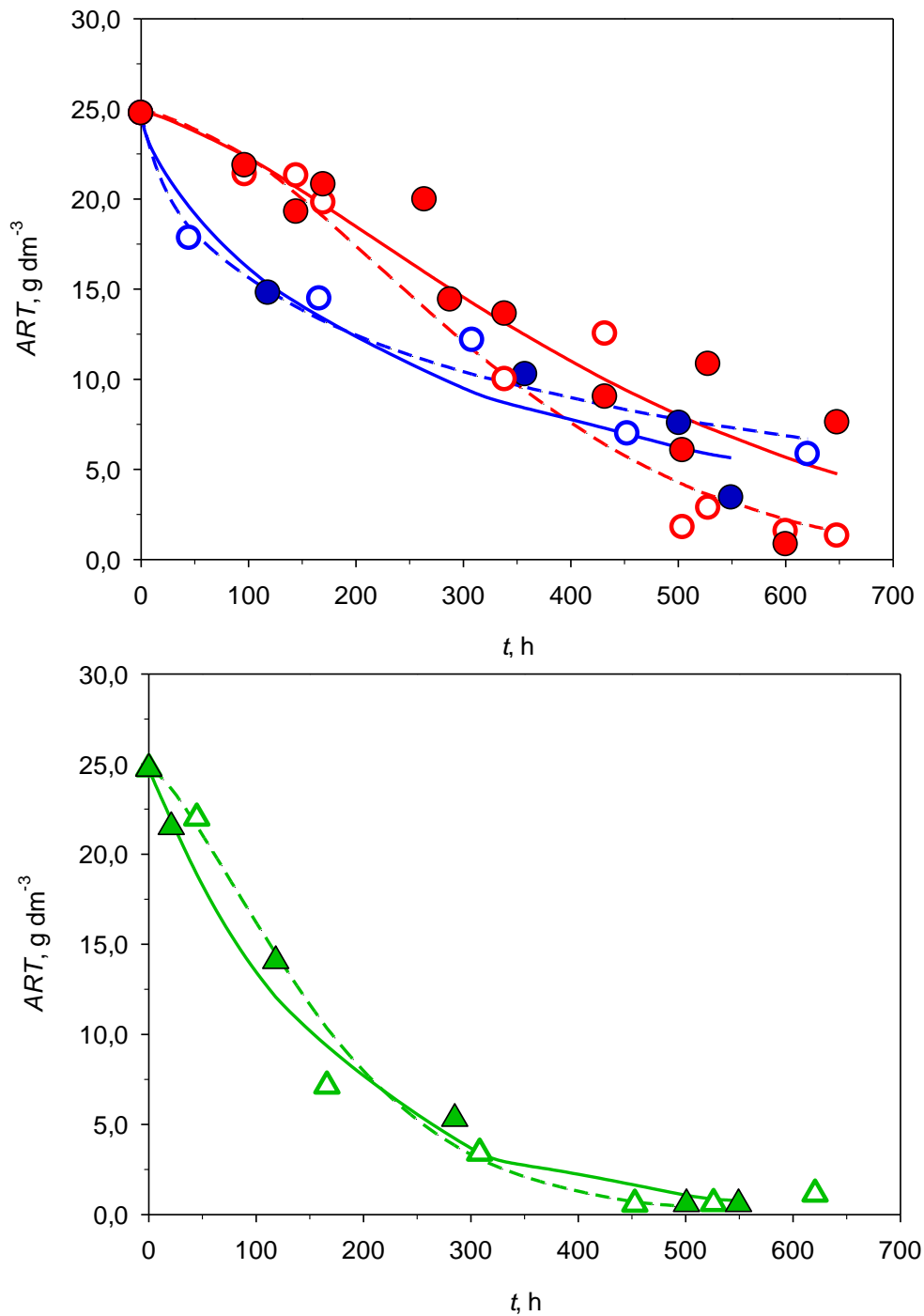


Figura 4.17 Consumo de sustrato en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1-Ma \circ , FS1-Mb \bullet , FS1-Aa \circ , FS1-Ab \bullet , FS3-M \triangle y FS3-A \triangle), a 30°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (círculo) ó D-XIL₀ (triángulo), en condiciones de microaeración (símbolos huecos) ó anaeróbicas (símbolos rellenos). La línea continua reproduce la Ec. 4.19 de los cultivos en condiciones microaeróbicas y la discontinua en anaeróbicas.

Tabla 4.18
 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
 EFECTO DEL NIVEL DE AERACIÓN
 Velocidades específicas de consumo de sustrato (q_{ART}^D y q_{ART})
 $T = 30^\circ\text{C}$ y $\text{pH}_0 = 4,5$

Sustrato	Condiciones de operación	Expto.	Fase	t, h	q_{ART}^D g g ⁻¹ h ⁻¹	q_{ART} g g ⁻¹ h ⁻¹
D-arabinosa	Microaeración	FS1-Ma	LIN	50,0	0,092	0,046
			LIN	150,0	0,024	0,025
		FS1-Mb	LIN	200,0	0,016	0,021
			LIN	50,0	0,043	0,092
			LIN	150,0	0,027	0,030
			LIN	200,0	0,022	0,023
	Anaeróbicas	FS1-Aa	LIN	50,0	0,070	0,030
			LIN	150,0	0,026	0,020
		FS1-Ab	LIN	200,0	0,018	0,018
			LIN	50,0	0,041	0,057
			LIN	150,0	0,026	0,026
			LIN	200,0	0,021	0,020
D-xilosa	Microaeración	FS3-M	LIN	50,0	0,088	0,085
			LIN	150,0	0,031	0,034
			LIN	200,0	0,018	0,026
	Anaeróbicas	FS3-A	LIN	50,0	0,107	0,059
			LIN	150,0	0,030	0,030
			LIN	200,0	0,018	0,024

Tanto en condiciones anaeróbicas como de microaeración, para cualquiera de los sustratos utilizados, se observa un descenso del valor de q_{ART}^D en el transcurso del cultivo, Tabla 4.18. Cuando la pentosa usada fue D-arabinosa, esta velocidad específica de consumo de sustrato fue ligeramente superior cuando el bioproceso fue llevado a cabo en condiciones de microaeración. En la fermentación de D-arabinosa con *H. polymorpha*, 30°C , $\text{pH}_0 = 4,5$, y en condiciones microaeróbicas se alcanzó un valor de q_{ART}^D igual a $0,092 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ tras 50 h de fermentación (Expto. FS1-Ma); en medio anaeróbico, manteniendo las demás condiciones de operación, se determinó una velocidad específica de consumo de sustrato de $0,041 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ tras el mismo tiempo de bioproceso (Expto. FS1-Ab). En general, cuando se utilizó D-xilosa como sustrato se observó un comportamiento similar, aunque las diferencias no fueron tan significativas. No obstante, cabe destacar que, independientemente de las condiciones de aeración o fuente de carbono y energía, los

valores de q_{ART}^D tienden a aproximarse a medida que avanza el tiempo de cultivo, Fig. 4.18, comportamiento fácilmente justificable si se considera que estamos en la fase final de consumo de sustrato.

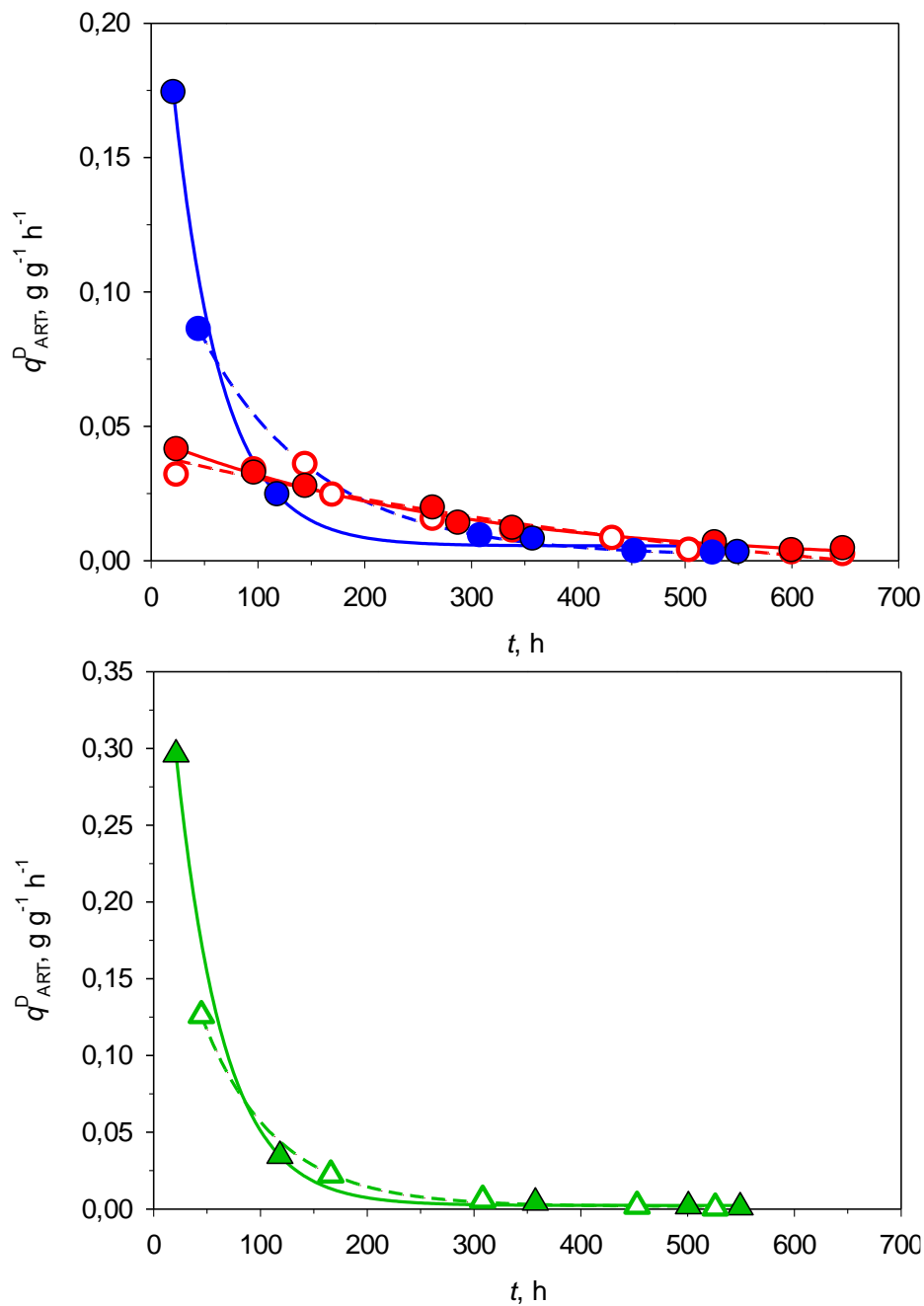


Figura 4.18 Velocidades específicas de consumo de sustrato (q_{ART}^D) en experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1-Ma \circ , FS1-Mb \bullet , FS1-Aa \circ , FS1-Ab \bullet , FS3-M \triangle y FS3-A \triangle), a 30°C y $pH_0 = 4,5$, con 25 $g\ dm^{-3}$ de D-ARA₀ (círculo) ó D-XIL₀ (triángulo), en condiciones de microaeración (símbolos huecos) ó anaeróbicas (símbolos rellenos).

Estos valores de q_{ART}^D (Tabla 4.18) son inferiores a los obtenidos en investigaciones anteriores realizadas por este Grupo de Investigación utilizando biorreactores discontinuos, tipo mezcla perfecta, con un volumen de cultivo de 500 cm³ y 500 rpm. Concretamente, durante la fermentación de D-xilosa con *C. shehatae* a 30°C, pH₀ = 4,5 y condiciones microaeróbicas se determinó un valor para la velocidad específica de consumo de sustrato de 0,8 g g⁻¹ h⁻¹ tras 40 h de bioproceso (Sánchez *et al.*, 1997). Por otra parte, en la fermentación de D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C y pH₀ = 5,5, modificando la velocidad de suministro de aire en el bioproceso y tras 100 h de cultivo, los valores determinados para q_{ART}^D fueron de 0,07 g g⁻¹ h⁻¹ en condiciones de microaeración y 0,02, 0,05 y 0,04 g g⁻¹ h⁻¹ cuando la velocidad de suministro de aire en el cultivo fue de 7,5, 15,0, y 30,0 v/v/min, respectivamente (Sánchez *et al.*, 1998).

Cuando el rendimiento en biomasa permanece constante en el transcurso del experimento y además se admite que no existe mantenimiento celular, es decir, $Y_{X/ART} = Y_{X/ART}^G$, la velocidad específica de consumo de sustrato (q_{ART}) puede ser calculado utilizando el método integral de tratamiento de datos cinéticos según la Ec. 4.22. En esta serie, en todos los casos, la velocidad de consumo de sustrato se ha determinado en la zona de comportamiento lineal de la biomasa con el tiempo. En general, se observa una aceptable concordancia entre los valores de las velocidades específicas de consumo de sustrato evaluados por los métodos diferencial (q_{ART}^D) e integral (q_{ART}), Tabla 4.18.

4.2.2.3 Formación de bioproductos

Al igual que en el estudio de la naturaleza del sustrato, en esta serie experimental los bioproductos mayoritarios han sido arabitol, cuando el sustrato fue D-arabinosa, y xilitol, para el caso de D-xilosa. A 30°C y 4,5 de pH₀, la máxima concentración determinada en etanol no supera los 0,03 g dm⁻³ utilizando D-arabinosa como sustrato y condiciones anaerobias, y 0,25 g dm⁻³ cuando la pentosa es D-xilosa y condiciones de microaeración (Tablas B.10 y B.11, Anexo B.2). El etanol no se considera, por consiguiente, un bioproducto de formación mayoritaria. Por otro lado, la máxima concentración alcanzada de ácido acético fue del orden de 0,5 g dm⁻³ (Tablas B.7 y B.9, Anexo B.2).

La formación de bioproductos ha sido estudiada a través de la determinación de los rendimientos instantáneos en arabitol y xilitol, y a través de las velocidades específicas de formación de arabitol y xilitol.

➤ Velocidad específica de formación de arabitol

Para el cálculo de la velocidad específica de formación de arabitol se aplicó el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos (q_{Ar}^D) a los valores experimentales de concentración de arabitol en el medio (Tablas B7 a B12, Anexo B.2). Tras representar Ar versus t (Fig. 4.19), se obtiene la velocidad de producción de arabitol por unidad de volumen, dAr/dt . Esta productividad volumétrica en arabitol obtenida durante la fermentación microaeróbica de D-arabinosa con *H. polymorpha* a 30°C y $pH_0 = 4,5$ (Exptos. FS1-Ma y FS1-Mb), fue 0,001 g dm⁻³ h⁻¹. Manteniendo las mismas condiciones de temperatura y pH , pero en condiciones anaerobias, dAr/dt aumentó ligeramente, alcanzándose un valor de 0,012 y 0,004 g dm⁻³ h⁻¹ en los Exptos. FS1-Aa y FS1-Ab, respectivamente. En definitiva, se puede considerar que las condiciones anaerobias favorecen la formación de arabitol frente a las microaeróbicas. Cabe destacar que se alcanzó una concentración máxima en arabitol de 1,35 g dm⁻³ tras 118,3 h en la fermentación de D-arabinosa con *H. polymorpha* a 30°C, $pH_0 = 4,5$ y en condiciones anaerobias (Tabla B.9, Anexo B.2), mientras que la concentración máxima de arabitol en condiciones de microaeración fue 0,25 g dm⁻³ tras 432 h (Tabla B.8, Anexo B.2). Por otra parte, la producción de arabitol es más tardía en condiciones microaeróbicas, Fig. 4.19, dando comienzo en torno a las 170 h en uno de los experimentos (Tabla B.8, Anexo B.2), mientras que en medio anaeróbico esta producción se inicia al comienzo del cultivo (Tabla B.9 y B.10, Anexo B.2). Esto podría indicar que la producción de arabitol en condiciones microaeróbicas no está asociada al crecimiento durante la fase exponencial.

La velocidad específica de producción de arabitol (q_{Ar}^D) se determina a partir de la productividad volumétrica en arabitol mediante el método diferencial según la Ec. 4.24 (Tabla 4.19). Se observa que q_{Ar}^D disminuye a lo largo del tiempo de cultivo independientemente de las condiciones de aeración establecidas, Tabla 4.19. Transcurridas 50 h de fermentación de D-arabinosa con *H. polymorpha*, 30°C, $pH_0 = 4,5$ y condiciones microaeróbicas, se determinó un valor para q_{Ar}^D en torno a 0,002 g g⁻¹ h⁻¹ (Expto. FS1-Ma); transcurrido el mismo tiempo pero en medio anaerobio, la velocidad específica de producción de arabitol fue superior (Exptos. FS1-Aa y FS1-Ab). En general, los valores obtenidos de q_{Ar}^D a lo largo del tiempo son inferiores en condiciones microaeróbicas, Fig. 4.20, hecho que se puede justificar considerando que parte del sustrato se invierte en una mayor formación de biomasa en condiciones microaeróbicas.

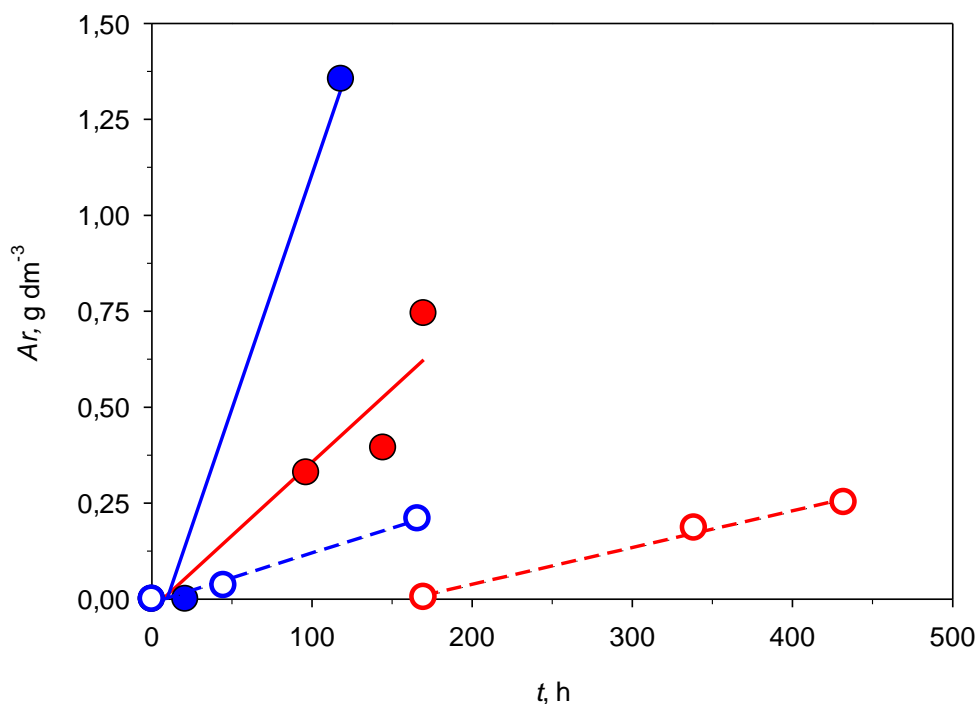


Figura 4.19 Ajuste de la concentración de arabitol frente al tiempo. Cálculo de la velocidad específica de formación de arabitol (q_{Ar}^D) en los experimentos de fermentación con *Hansenula polymorpha* (FS1-Ma \bullet , FS1-Mb \bullet , FS1-Aa \circ y FS1-Ab \bullet), a 30°C y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (círculo), en condiciones de microaeración (símbolos huecos) ó anaeróbicas (símbolos rellenos).

Tabla 4.19
FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
EFECTO DEL NIVEL DE AERACIÓN
Velocidades específicas de formación de arabitol (q_{Ar}^D y q_{Ar})
 $T = 30^\circ\text{C}$ y $pH_0 = 4,5$

Sustrato	Condiciones de operación	Expto.	Fase	t, h	q_{Ar}^D 10 g g ⁻¹ h ⁻¹	q_{Ar} 10 g g ⁻¹ h ⁻¹
D-arabinosa	Microaeración	FS1-Ma	LIN	50,0	0,019	0,013
			LIN	150,0	0,010	0,007
		FS1-Mb	LIN	169,8	0,005	0,006
			LIN	200,0	0,004	0,005
	Anaeróbica	FS1-Aa	LIN	50,0	0,119	0,041
			LIN	118,3	0,066	0,023
		FS1-Ab	LIN	50,0	0,058	0,050
			LIN	150,0	0,026	0,023

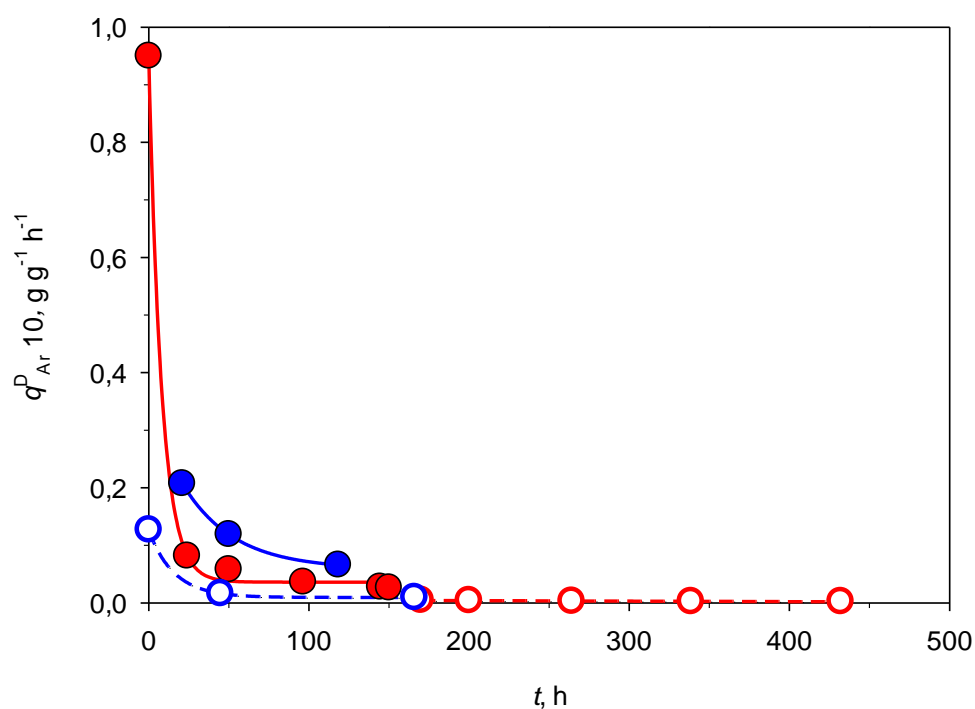


Figura 4.20 Velocidad específica de formación de arabitol (q_{Ar}^D) en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1-Ma \circ , FS1-Mb \bullet , FS1-Aa \bullet y FS1-Ab \bullet), a 30°C y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (círculo), en condiciones de microaeración (símbolos huecos) ó anaeróbicas (símbolos rellenos).

La productividad global en arabitol ($\gamma_{Ar/x}^G$) se determinó según Ec. 4.25, es decir, recurriendo a la pendiente de la línea recta obtenida en la representación de Ar vs $(x-x_0)$, Fig. 4.21. En la fermentación de D-arabinosa con *H. polymorpha* a 30°C y 4,5 de pH_0 , la productividad global en arabitol alcanzada en medio anaerobio (Expto. FS1-Aa), 0,84 g g⁻¹, fue superior si se compara con la determinada en condiciones de microaeración, 0,16 g g⁻¹ (Expto. FS1-Ma), Fig. 4.21.

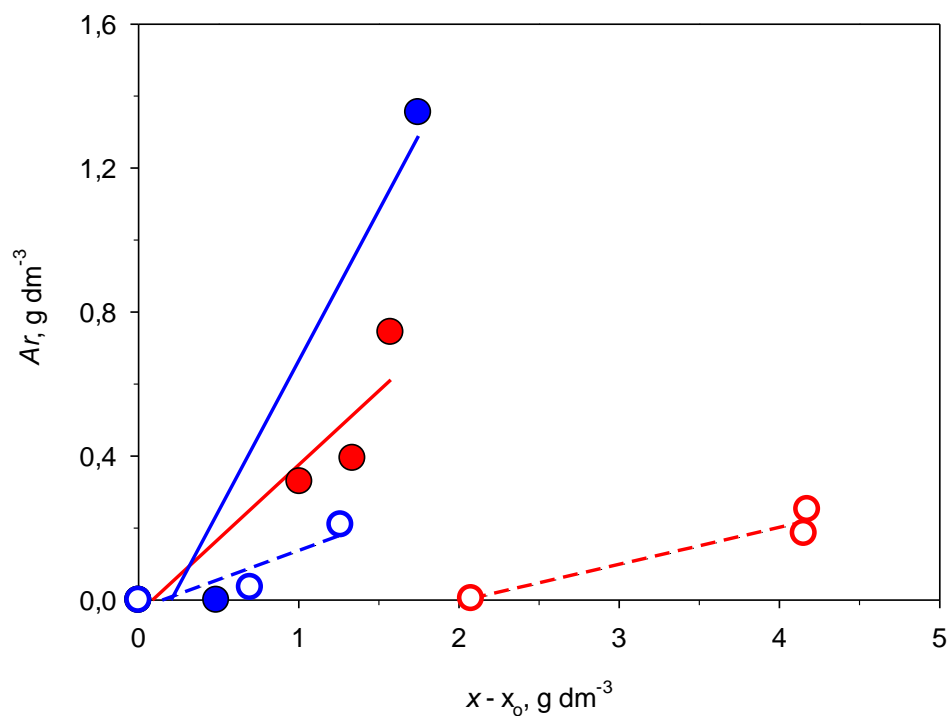


Figura 4.21 Determinación de la productividad global en arabitol ($Y_{Ar/x}^G$) según la Ec. 4.25 en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1-Ma ●, FS1-Mb ●, FS1-Aa ○ y FS1-Ab ●), a 30°C y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (círculo), en condiciones de microaeración (símbolos huecos) ó anaeróbicas (símbolos rellenos).

A partir de $Y_{Ar/x}^G$, y haciendo uso de la definición de velocidad específica de crecimiento (Aiba *et al.*, 1973), se calculó la velocidad específica de producción de arabitol mediante el método integral según Ec. 4.26. Se observa una aceptable concordancia entre los valores de las velocidades específicas de producción de arabitol evaluados por los métodos diferencial (q_{Ar}^D) e integral (q_{Ar}), Tabla 4.19. En este caso, q_{Ar} no se puede calcular en la fase exponencial porque no existen valores experimentales suficientes que permitan el cálculo de la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m).

➤ Velocidad específica de formación de xilitol

Para el cálculo de esta velocidad se aplicó inicialmente el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos a los valores experimentales de concentración de xilitol en el medio (Tablas B7 a B12, Anexo B.2). A partir de la determinación analítica de dX_i/dt tras la representación de los datos X_i vs t de cada experimento, Fig. 4.22, se calculó la velocidad específica de producción de xilitol por el método diferencial, Tabla 4.20, según la Ec. 4.27.

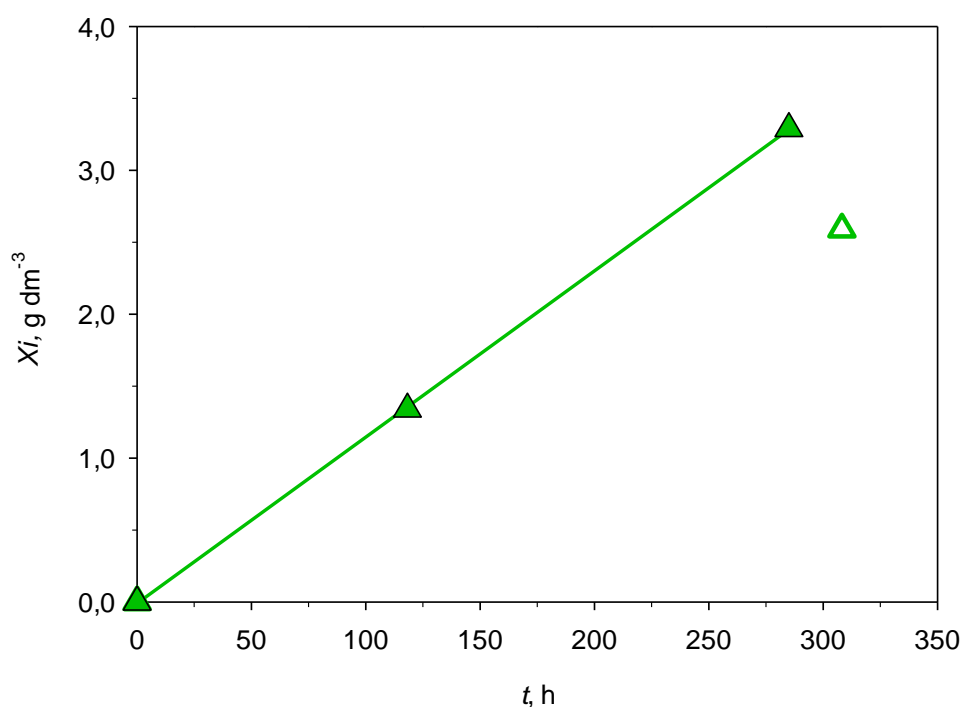


Figura 4.22 Ajuste de la concentración de xilitol frente al tiempo. Cálculo de la velocidad específica de formación de xilitol ($q_{X_i}^D$) en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS3-M △ y FS3-A ▲), a 30°C y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm⁻³ de D-XIL₀ (triángulo), en condiciones de microaeración (símbolos huecos) ó anaeróbicas (símbolos rellenos).

La productividad volumétrica en xilitol obtenida durante la fermentación anaerobia de D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C y $pH_0 = 4,5$ (Expto. FS3-A), 0,012 g dm⁻³ h⁻¹, fue ligeramente superior a la obtenida modificando las condiciones a microaeróbicas, 0,008 g dm⁻³ h⁻¹ (Expto. FS3-M). Del mismo modo que con el arabitol, se puede considerar que las condiciones anaerobias favorecen la formación de xilitol frente a las microaeróbicas. En

efecto, la concentración máxima alcanzada de xilitol en la fermentación de D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C, $pH_0 = 4,5$ y en condiciones anaerobias fue 3,29 g dm⁻³ tras 285,0 h (Tabla B.12, Anexo B.2), mientras que en medio microaeróbico fue 2,59 g dm⁻³ tras 308,3 h (Tabla B.11, Anexo B.2).

Tabla 4.20
FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
EFECTO DEL NIVEL DE AERACIÓN
Velocidades específicas de formación de xilitol (q_{xi}^D y q_{xi})
 $T = 30^\circ\text{C}$ y $pH_0 = 4,5$

Sustrato	Condiciones de operación	Expto.	Fase	t, h	q_{xi}^D 10 g g ⁻¹ h ⁻¹	q_{xi} 10 g g ⁻¹ h ⁻¹
D-xilosa	Microaeración	FS3-M	LIN	44,8	0,114	0,114
			LIN	50,0	0,078	0,078
			LIN	150,0	0,031	0,031
			LIN	200,0	0,024	0,024
	Anaeróbica	FS3-A	LIN	21,0	0,263	0,220
			LIN	50,0	0,111	0,093
			LIN	150,0	0,057	0,047
			LIN	200,0	0,045	0,038

De forma similar a lo observado con el arabitol, la velocidad específica de producción de xilitol disminuye a medida que aumenta el tiempo de cultivo, Tabla 4.20. Transcurridas las mismas horas de bioproceso, en medio anaerobio se obtienen valores de q_{xi}^D superiores a los determinados en condiciones de microaeración, Fig. 4.23, tendencia similar a la determinada en la formación de arabitol. En efecto, en la fermentación anaerobia de D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C y 4,5 de pH_0 , se determinó un valor para q_{xi}^D de 0,011 y 0,006 g g⁻¹ h⁻¹ transcurridas 50 y 150 h de bioproceso (Expto. FS3-A); tras el mismo tiempo de cultivo pero en condiciones de microaeración, se obtuvieron valores para q_{xi}^D inferiores, 0,008 y 0,003 g g⁻¹ h⁻¹ (Expto. FS3-M).

En general, se han obtenido unos valores para la velocidad específica de producción de xilitol muy próximos a los determinados por Sánchez *et al.* (2008) durante la fermentación de 25 g dm⁻³ de D-xilosa con *C. tropicalis* a 30°C, $pH = 5,0$, en biorreactor discontinuo tipo mezcla perfecta y condiciones de microaeración generada sólo por vórtice de agitación (500 rpm). En efecto, en estas condiciones se alcanzaron unos valores para q_{xi}^D en torno a 0,013, 0,009 y 0,006 g g⁻¹ h⁻¹ tras 50, 100 y 200 h de cultivo, respectivamente.

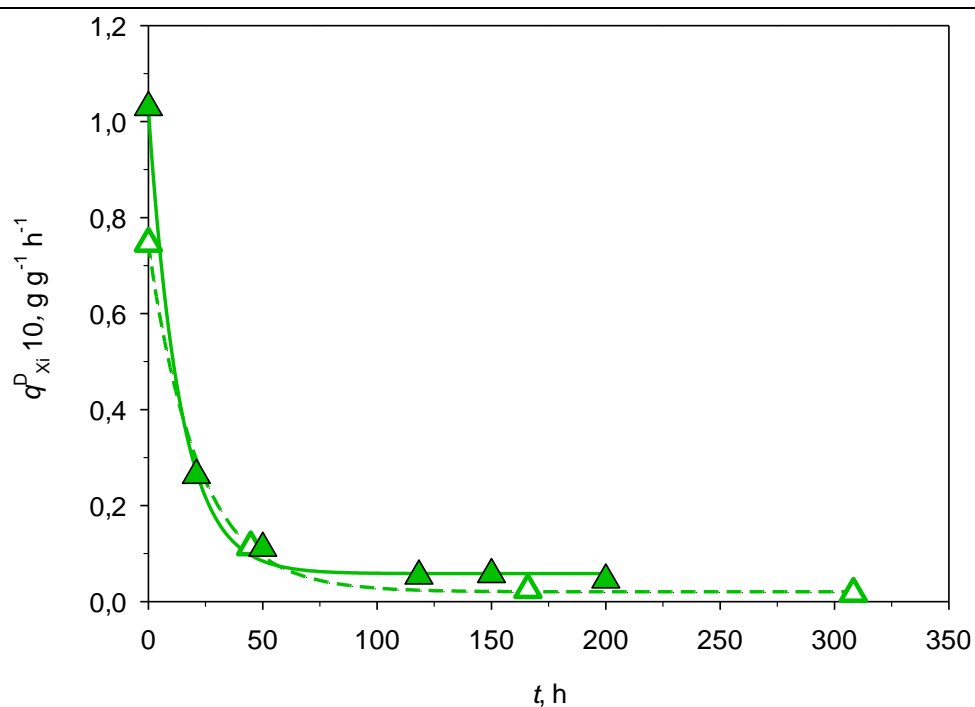


Figura 4.23 Velocidad específica de formación de xilitol (q_{Xi}^D) en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS3-M \triangle y FS3-A \blacktriangle), a 30°C y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm^{-3} de D-XIL_o (triángulo), en condiciones de microaeración (símbolos huecos) ó anaeróbicas (símbolos rellenos).

Según Ec. 4.28, la productividad global en xilitol ($Y_{Xi/x}^G$) se determina como la pendiente de la línea recta obtenida en la representación de Xi frente a $(x-x_0)$, Fig. 4.24. Una vez calculado $Y_{Xi/x}^G$, y teniendo en cuenta la definición de velocidad específica de crecimiento [$\mu = (1/x) dx/dt$], se determinó la velocidad específica de producción de xilitol por el método integral, Ec. 4.29.

En este caso, en comparación con el arabitol, se observa una mejor concordancia entre los valores de las velocidades específicas de producción de xilitol evaluados por los métodos diferencial (q_{Xi}^D) e integral (q_{Xi}), Tabla 4.20, aunque los cálculos están basados en pocos puntos experimentales, fundamentalmente cuando se opera en condiciones de microaeración.

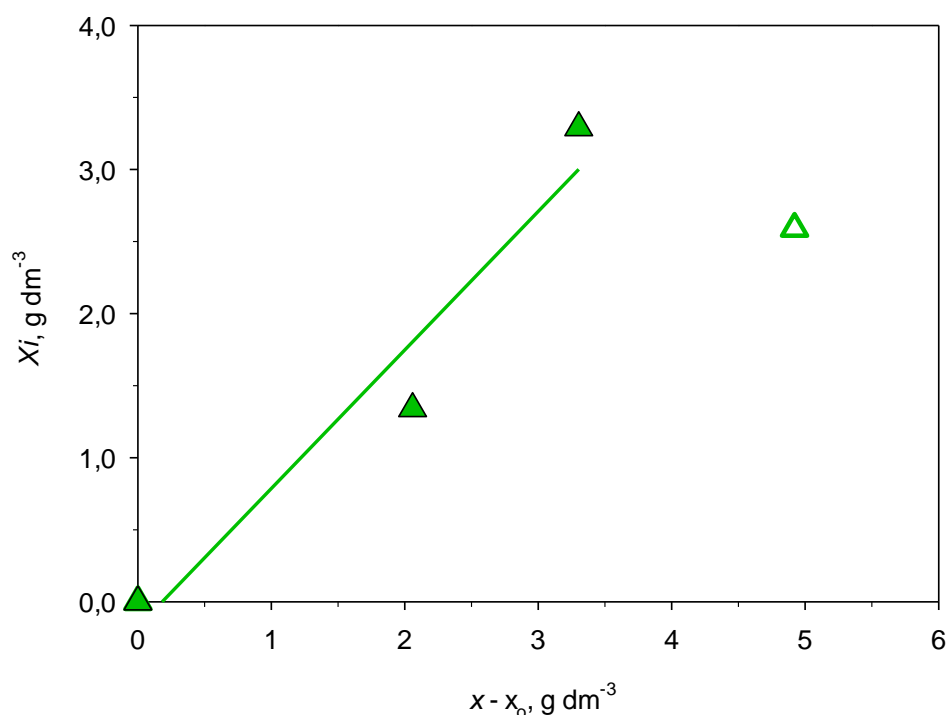


Figura 4.24 Determinación de la productividad en xilitol según la Ec. 4.28 en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS3-M \triangle y FS3-A \blacktriangle), a 30°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, con 25 g dm⁻³ de D-XIL₀ (triángulo), en condiciones de microaeración (símbolos huecos) ó anaeróbicas (símbolos rellenos).

➤ Rendimiento en arabitol

Considerando constante $Y_{Ar/ART}$ a lo largo del experimento, se representó los valores de Ar a distintos tiempos frente a $(ART_0 - ART)$, Fig. 4.25, obteniendo una recta cuya pendiente corresponde a $Y_{Ar/ART}^G$, según la Ec. 4.30, siendo la concentración inicial en arabitol nula, ya que a $t = 0$ h $Ar_0 \rightarrow 0$.

Se observa una notable diferencia en el rendimiento global en arabitol según el nivel de aeración establecido en el medio, Fig. 4.25; en medio anaerobio se alcanzaron valores de $Y_{Ar/ART}^G$ superiores a los determinados en microaeración, Tabla 4.21. En efecto, cuando se utilizó D-arabinosa durante la fermentación con *H. polymorpha* a 30°C, $\text{pH}_0 = 4,5$ y en condiciones de microaeración (Exptos. FS1-Ma y FS1-Mb), se alcanzó un rendimiento global en arabitol en torno a 0,02 g g⁻¹, valor considerablemente inferior al determinado en medio anaerobio (Expto. FS1-Ab), 0,10 g g⁻¹, Tabla 4.21.

En relación con estos resultados cabe destacar el trabajo de Fonseca *et al.* (2007) usando dos levaduras diferentes. Estos autores obtuvieron un rendimiento en arabitol durante la fermentación de L-arabinosa con *Candida arabinofermentans* y *P. guilliermondii* a 30°C y $pH = 5,5$, de 0,01 y 0,47 $g\ g^{-1}$, respectivamente, rendimientos que son muy inferiores y superiores a los obtenidos en nuestra fermentación de D-arabinosa con *H. polymorpha* (*Pichia augusta*). Este grupo de investigación utilizó fermentadores de 1 dm^3 operando con 500 cm^3 de medio de cultivo, sometidos a una velocidad de agitación de 200 rpm.

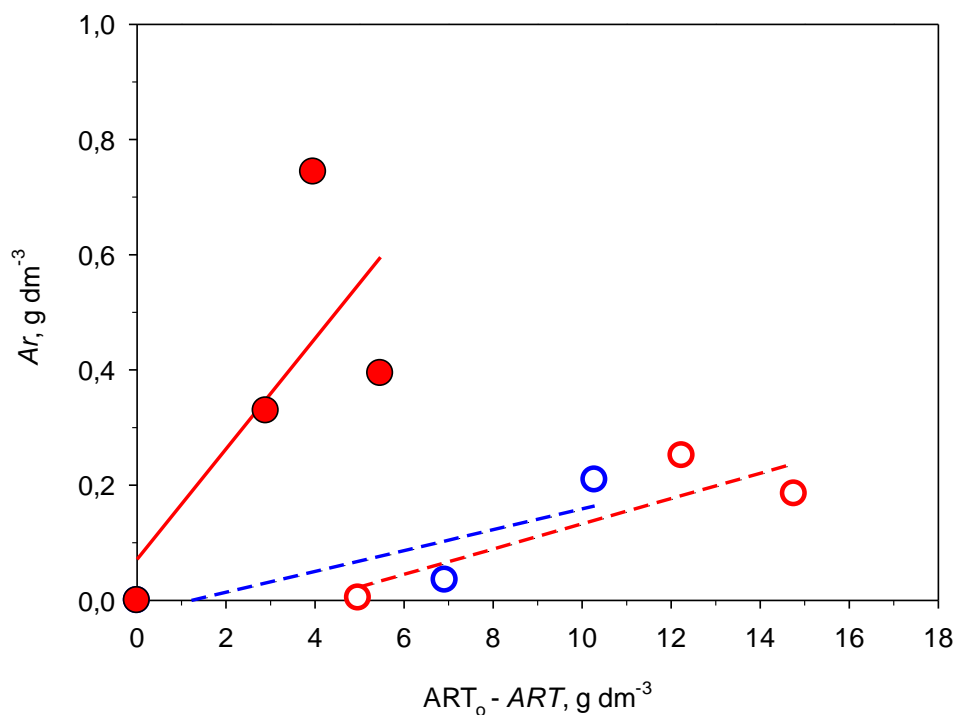


Figura 4.25 Determinación de los rendimientos globales en arabitol ($Y_{Ar/ART}^G$) según la Ec. 4.30 en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1-Ma \circ , FS1-Mb \circ y FS1-Ab \bullet), a 30°C y $pH_0 = 4,5$, con 25 $g\ dm^{-3}$ de D-ARA₀ (círculo), en condiciones de microaeración (símbolos huecos) ó anaeróbicas (símbolos rellenos).

Tabla 4.21
 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
 EFECTO DEL NIVEL DE AERACIÓN
 Rendimientos globales en arabitol y xilitol ($Y_{Ar/ART}^G$, $Y_{Xi/ART}^G$)
 $T = 30^\circ\text{C}$ y $\text{pH}_0 = 4,5$

Sustrato	Condiciones de operación	Expto.	t, h	$Y_{Ar/ART}^G$ g g ⁻¹	$Y_{Xi/ART}^G$ g g ⁻¹
D-arabinosa	Microaeración	FS1-Ma		0,018	
		FS1-Mb		0,022	
	Anaeróbica	FS1-Aa	118,3	0,136*	
		FS1-Ab		0,096	
D-xilosa	Microaeración	FS3-M	308,3		0,122*
	Anaeróbica	FS3-A			0,168

(*) Rendimientos instantáneos ($Y_{Ar/ART}$, $Y_{Xi/ART}$).

➤ Rendimiento en xilitol

De igual forma, el rendimiento global en xilitol, $Y_{Xi/ART}^G$, partiendo de D-xilosa y en condiciones anaerobias, se determinó a partir de la pendiente obtenida tras representar Xi frente a $(ART_0 - ART)$, Fig. 4.26, según Ec. 4.31, considerando la concentración inicial en xilitol nula, ya que a $t = 0$ h $Xi_0 \rightarrow 0$. En condiciones microaeróbicas sólo se ha podido calcular el rendimiento instantáneo en xilitol por no existir valores experimentales suficientes referidos a azúcares reductores totales en la fase de linealidad de xilitol que apoyaran dicha etapa con el fin de poder calcular $Y_{Xi/ART}^G$.

Se observa que, en condiciones anaerobias, la formación de xilitol a partir de D-xilosa se inicia a tiempos próximos al comienzo del cultivo, Fig. 4.26, y este rendimiento, $0,17 \text{ g g}^{-1}$, es ligeramente superior al obtenido en condiciones de microaeración, Tabla 4.21.

Estos valores de rendimiento en xilitol son inferiores a los obtenidos por Sánchez *et al.* (1998), $0,62 \text{ g g}^{-1}$, en la fermentación de 25 g dm^{-3} de concentración inicial de D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C , $\text{pH}_0 = 4,5$ y en condiciones microaeróbicas conseguidas sólo a partir del vórtice de agitación en un biorreactor discontinuo, tipo mezcla perfecta. En investigaciones anteriores realizadas por este Grupo de Investigación usando el mismo tipo de biorreactor discontinuo, se llevó a cabo la fermentación de D-xilosa con *C. shehatae* a 30°C , $\text{pH}_0 = 4,5$ y 500 rpm (Sánchez *et al.*, 1997). Sin embargo, en este caso, el rendimiento global en xilitol, $0,078 \text{ g g}^{-1}$, fue inferior al conseguido en esta serie experimental, Tabla 4.21.

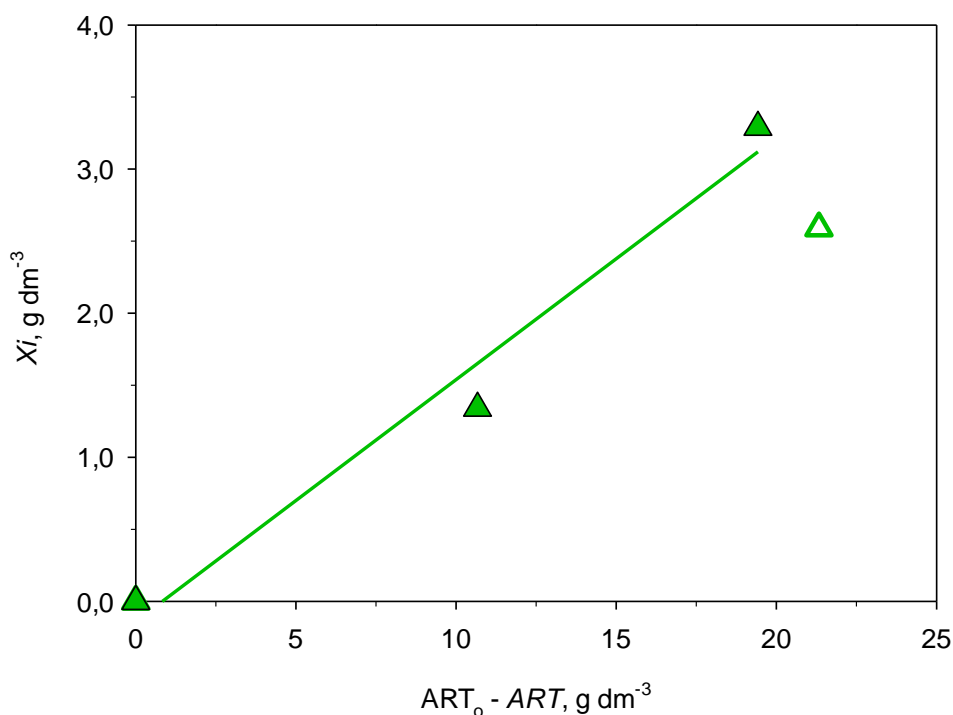


Figura 4.26 Determinación del rendimiento en xilitol según la Ec. 4.31 en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS3-M \triangle y FS3-A \blacktriangle), a 30°C y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm⁻³ de D-XIL₀ (triángulo), en condiciones de microaeración (símbolos huecos) ó anaeróbicas (símbolos rellenos).

4.2.3 Influencia del pH_0 del medio de cultivo

En relación con el pH de cultivo, para cada una de las pentosas utilizadas como sustrato, D-arabinosa y L-arabinosa, se llevó a cabo una serie experimental de fermentaciones con *H. polymorpha* a 35, 40 y 45°C, en condiciones de microaeración (entrada de aire sólo por el vórtice de agitación), modificando el pH inicial del medio de cultivo (3,5, 4,5 y 5,5) para cada una de las temperaturas. La concentración inicial de pentosa en el medio de Lindegren *et al.* (1958) fue 25 g dm⁻³ en todos los casos.

Los resultados experimentales obtenidos en cuanto a evolución del pH , generación de biomasa, consumo de sustrato, y formación de bioproductos durante el transcurso del proceso de fermentación se han indicado en las Tablas B.13 a B.28 (Anexo B.3), y se han representado en las Figuras B.13 a B.28 (Anexo B.3) los mismos parámetros excepto el pH y la concentración de etanol; debido a que el sustrato es D ó L-arabinosa se representa la concentración de arabitol que debe ser el bioproducto de mayor concentración.

Los procesos de fermentación llevados a cabo con D-arabinosa, $\text{pH}_0 = 4,5$ y 40°C , en condiciones de microaeración, ya fueron expuestos en el Anexo B.1 en el estudio de la influencia de la naturaleza del sustrato (Exptos. F-S1a, F-S1b y F-S1c, Tablas B.1 a B.3). De igual forma sucede con L-arabinosa como sustrato, bajo las mismas condiciones (Exptos. F-S2a y F-S2b, Tablas B.4 y B.5).

4.2.3.1 Formación de biomasa

Para evaluar la formación en biomasa durante la fermentación con *H. polymorpha* se utilizaron los parámetros característicos del crecimiento celular: velocidad específica máxima de crecimiento y productividad volumétrica en biomasa. En algunos experimentos de esta serie no se ha podido evaluar μ_m durante la fase exponencial ya que no se pudo caracterizar ésta de forma exhaustiva (Exptos. FS1T3-pH2, FS2T3-pH2, FS1T5-pH2, FS2T5-pH2, F-S1a y F-S2a).

A partir de las curvas de crecimiento, Fig. 4.27, se establece claramente el período de crecimiento exponencial, y se determinan los valores de la velocidad específica máxima de crecimiento mediante ajuste por mínimos cuadrados a la Ec. 4.15 de los datos del logaritmo neperiano de la concentración adimensional de biomasa y tiempo, Tabla 4.22.

En esta serie experimental la existencia de la fase 'lag' ó de latencia, previa a la fase de crecimiento exponencial, es un hecho destacable en un número considerable de experimentos. En efecto, en las curvas de crecimiento de los experimentos de fermentación de D-arabinosa con *H. polymorpha* en condiciones de microaeración, a 35°C , $\text{pH}_0 = 3,5$ y $5,5$ (Exptos. FS1T3-pH1 y FS1T3-pH3), se obtuvo una fase de adaptación de $3,5$ y $3,0$ h, respectivamente. Cuando la fuente de carbono y energía fue L-arabinosa, en condiciones de microaeración, a 35°C y modificando el pH_0 ($3,5$, $4,5$ y $5,5$), este periodo fue de $3,5$, $1,5$ y $2,0$ h, respectivamente (Exptos. FS2T3-pH1, F-S2a y FS2T3-pH3). La fase 'lag' más corta, 1 h, se detectó durante la fermentación microaeróbica de L-arabinosa con *H. polymorpha* a 40°C y $\text{pH}_0 = 4,5$. En general, se detecta una fase de adaptación de mayor duración cuando el sustrato es D-arabinosa, a pesar de que el inóculo de partida estuvo utilizando la misma pentosa en medio solido con agar, durante 48 h previas al inicio del experimento.

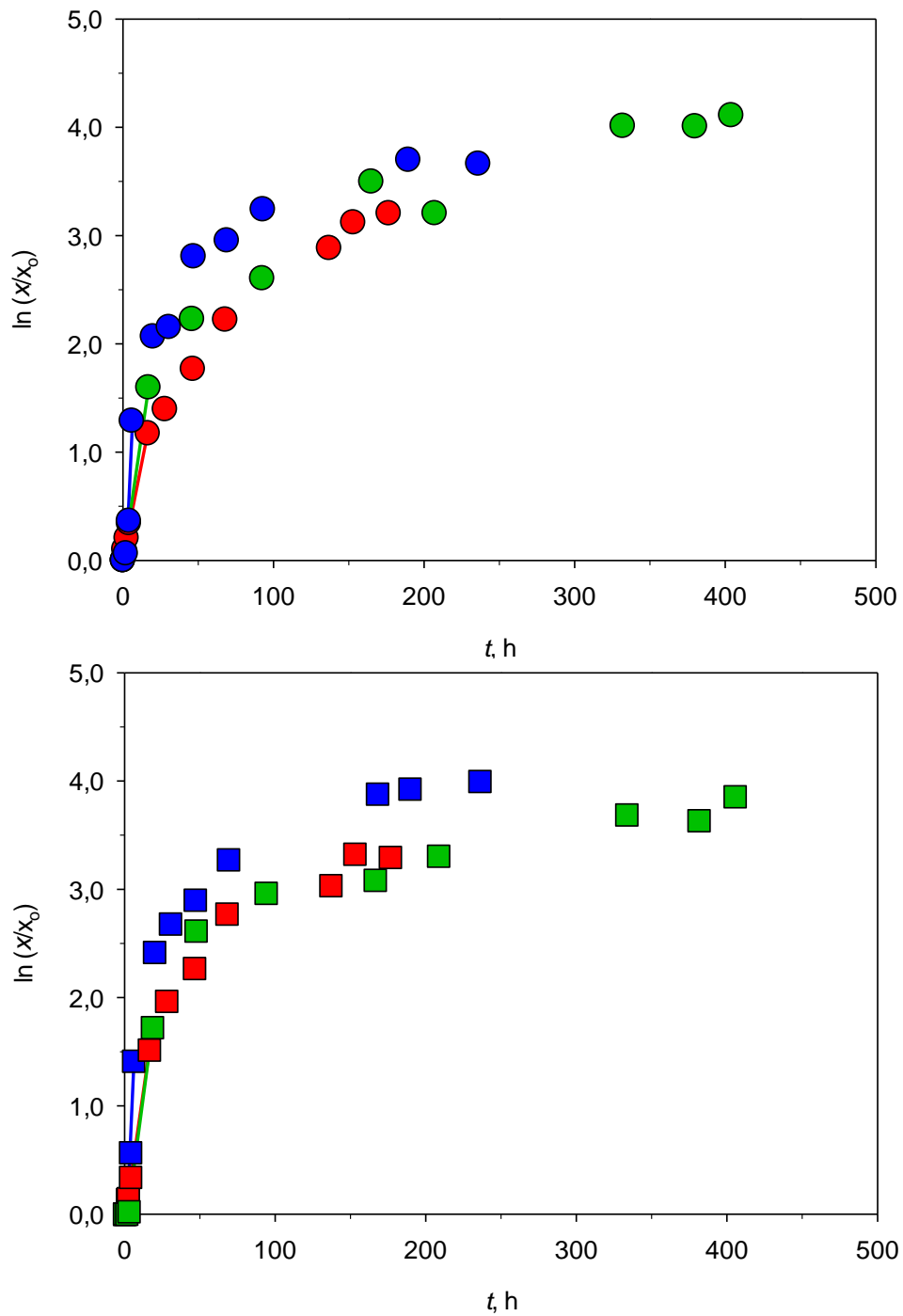


Figura 4.27 Curvas de crecimiento. Determinación de velocidades específicas máximas de crecimiento según la Ec. 4.15 en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1T4-pH1, F-S1b, FS1T4-pH3, FS2T4-pH1, FS2b y FS2T4-pH3), a 40°C y en condiciones de microaeración, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (círculo) y L-ARA₀ (cuadrado), y modificando el pH₀ de 3,5 (símbolo rojo), 4,5 (símbolo verde) a 5,5 (símbolo azul).

Tabla 4.22
 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
 INFLUENCIA DEL pH₀ DEL MEDIO DE CULTIVO
 Velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) y productividad volumétrica de biomasa (P_b)
 Condiciones de microaeración

Sustrato	T °C	pH ₀	Expto.	μ_m h ⁻¹	r ²	P_b g dm ⁻³ h ⁻¹	r ²
D-arabinosa	35	3,5	FS1T3-pH1	0,118	0,998	0,006	0,983
		4,5	FS1T3-pH2	—		0,012	0,955
		5,5	FS1T3-pH3	0,148	0,999	0,008	0,960
	40	3,5	FS1T4-pH1	0,070	0,998	0,020	0,991
			F-S1a	—			
			F-S1b	0,085*		0,013*	
		5,5	F-S1c	—			
			FS1T4-pH3	0,306	0,921	0,011	0,972
			FS1T5-pH1	0,118	0,991	0,013	0,988
	45	4,5	FS1T5-pH2	—		0,006	0,968
		5,5	FS1T5-pH3	0,218	0,915	0,012	0,980
		35	3,5	FS2T3-pH1	0,123	0,997	0,011
FS2T3-pH2	—				0,016	0,982	
FS2T3-pH3	0,119			0,994	0,006	0,997	
40	3,5		FS2T4-pH1	0,097	0,999	0,031	0,976
			F-S2a	—			
			F-S2b	0,105*		0,011*	
45	5,5	FS2T4-pH3	0,320	0,966	0,014	0,992	
		FS2T5-pH1	0,150	0,996	0,021	0,989	
		FS2T5-pH2	—		0,011	0,975	
45	5,5	FS2T5-pH3	0,230	0,931	0,015	0,980	

(*) Valores medios calculados anteriormente e indicados en la Tabla 4.10.

En las fermentaciones microaeróbicas de ambas pentosas con *H. polymorpha* a 40°C y pH₀ = 5,5 (Exptos. FS1T4-pH3 y FS2T4-pH3) se aprecian los períodos de crecimiento exponencial más cortos, 4 h (Fig. 4.27). No obstante, utilizando L-arabinosa como fuente de carbono y energía, en condiciones de microaeración, a 35°C y pH₀ = 5,5 (Expto. FS2T3-pH3), se alcanzó la máxima duración de esta fase exponencial, 24,8 h. En general, pH y temperaturas extremas conducen a una mayor duración de la fase exponencial.

El máximo valor alcanzado de μ_m en esta serie, 0,32 h⁻¹, corresponde a la fermentación microaeróbica de L-arabinosa con *H. polymorpha* a 40°C y pH₀ = 5,5 (Expto. FS2T4-pH3), Tabla 4.22. Por el contrario, en esta serie experimental se observa que la velocidad

específica máxima adquiere un valor mínimo, $0,07 \text{ h}^{-1}$, utilizando D-arabinosa como sustrato a 40°C y $\text{pH}_0 = 3,5$ (Expto. F-S1T4-pH1).

Se observa que, fijada la temperatura, el valor de la velocidad específica máxima aumenta a medida que se incrementa el pH_0 del medio. En efecto, durante la fermentación microaeróbica de D-arabinosa con *H. polymorpha* a 40°C , y modificando las condiciones del pH_0 de 3,5, 4,5 a 5,5, se alcanzó un valor de μ_m del orden de 0,07, 0,09 y $0,31 \text{ h}^{-1}$, respectivamente, Tabla 4.22. Utilizando L-arabinosa como sustrato y manteniendo las mismas condiciones de operación, se alcanzaron valores de μ_m ligeramente superiores para cada uno de estos pH_0 ($0,10$, $0,11$ y $0,32 \text{ h}^{-1}$, respectivamente), Tabla 4.22. Este último aspecto ya se puso de manifiesto durante la evaluación de los resultados alcanzados para la velocidad específica máxima de crecimiento de biomasa en el estudio de la influencia de la naturaleza del sustrato en el bioproceso, Tabla 4.10. Este hecho puede indicar que *H. polymorpha* metaboliza de forma más eficaz L-arabinosa.

En la revisión bibliográfica previa, realizada al inicio de esta Tesis Doctoral, no se ha encontrado referencias de trabajos centrados en la fermentación de D o L-arabinosa con *H. polymorpha* que determinen velocidades específicas máximas de crecimiento. Sin embargo, si existe referencias sobre D-xilosa y otras levaduras no tradicionales. En general, los valores alcanzados de velocidad específica máxima de crecimiento en esta serie, Tabla 4.22, son inferiores a los obtenidos en trabajos previos a esta investigación, donde el pH_0 también fue modificado a temperatura constante. En efecto, en la fermentación de D-xilosa pura con *H. polymorpha* a 30°C , se alcanzó un valor de la μ_m en torno a $0,38$, $0,43$ y $0,41 \text{ h}^{-1}$, tras modificar el pH_0 de 3,5, 4,5 a 5,5, respectivamente (Sánchez *et al.*, 1998). De igual forma, en la fermentación de D-xilosa con *C. shehatae* a 30°C , y modificando el pH_0 de 3,5, 4,0 a 4,5, se alcanzaron valores de μ_m superiores ($0,28$, $0,30$ y $0,33 \text{ h}^{-1}$) a las obtenidas en esta serie experimental (Sánchez *et al.*, 1997). En ambos casos se operó con un biorreactor discontinuo, tipo mezcla perfecta, y condiciones de aeración por vórtice (500 rpm). Estas diferencias en los valores de μ_m se pueden justificar considerando las distintas configuraciones del biorreactor que permiten en la investigación previa un mayor nivel de aeración y concentración de oxígeno disuelto; en este trabajo se ha operado usando matraces Erlenmeyer de 50 cm^3 (tapados con algodón) y un agitador orbital a 100 rpm . Lógicamente, estas condiciones conducen a un nivel de aeración más pequeño, que puede dar lugar a un nivel de O_2 disuelto tan bajo que constituya un factor limitante del crecimiento.

En la fermentación de D-glucosa con *H. polymorpha*, a 45°C y modificando el pH_0 , en el intervalo 3,5 a 5,5, se alcanzaron valores más elevados para la velocidad específica máxima

de crecimiento (Escalante *et al.*, 1990a). En dicha investigación se operó utilizando matraces Erlenmeyer agitados (100 rpm), conteniendo 100 cm³ de medio de cultivo de *H. polymorpha* con 1% (p/V) de hexosa. Como consecuencia, el máximo valor alcanzado para μ_m , en torno a 0,55 h⁻¹, se obtuvo a un pH₀ cercano a 4,5.

Tras representar x vs t , Fig. 4.28, para establecer la fase de desaceleración en cada uno de los experimentos, se han determinado los valores de P_b por ajuste por mínimos cuadrados de los datos de concentración de biomasa frente a tiempo de proceso a la Ec. 4.16, Tabla 4.22.

Los valores obtenidos de P_b no muestran ninguna tendencia definida con respecto al aumento del pH₀ del medio de cultivo, Tabla 4.22. Parcialmente, este hecho podría justificarse considerando que en la fermentación con *H. polymorpha* se han utilizado matraces Erlenmeyer de 50 cm³ ubicados de forma aleatoria dentro de un agitador orbital (100 rpm). En efecto, fijada una temperatura constante dentro del agitador y variando el pH₀ del cultivo, posiciones no similares de los matraces Erlenmeyer dentro del agitador, podrían generar ligeras variaciones de las condiciones de operación (T y aeración) y por tanto, evoluciones diferentes en lo que se refiere a formación de biomasa. El máximo valor de productividad en biomasa obtenido en esta serie, próximo a 0,03 g dm⁻³ h⁻¹, fue durante la fermentación microaeróbica de L-arabinosa con *H. polymorpha* a 40°C y pH₀ = 3,5 (Expto. FS2T4-pH1). Por otro lado, y de forma general, al igual que sucede con la velocidad específica máxima de crecimiento, los valores de P_b fueron ligeramente superiores utilizando L-arabinosa como fuente de carbono y energía frente a D-arabinosa.

En el estudio de la fermentación de D-xilosa con *C. shehatae* a 30°C, utilizando biorreactores discontinuos de 500 cm³, tipo mezcla perfecta, con microaeración por vórtice (500 rpm), y modificando las condiciones del pH₀ en el intervalo 2,5 a 6,5, se obtuvieron en general unos valores para la productividad volumétrica de biomasa ligeramente superiores a los alcanzados en esta serie experimental (Sánchez *et al.*, 1997). Efectivamente, cuando el bioproceso se llevó a cabo con un pH₀ entre 2,5 y 4,5, la productividad de biomasa obtenida fue del orden de 0,02 g dm⁻³ h⁻¹; al aumentar el pH₀ (entre 4,5 y 6,5), también se obtuvieron valores para P_b ligeramente superiores, 0,04 g dm⁻³ h⁻¹.

Sánchez *et al.* (2008) estudió la fermentación de 25 g dm⁻³ de D-xilosa con *C. tropicalis* a 30°C, $pH = 5,0$ y condiciones de microaeración (solo vórtice de agitación), obteniendo un valor para la productividad en biomasa, 0,0043 g dm⁻³ h⁻¹, inferior a la conseguida en esta serie experimental.

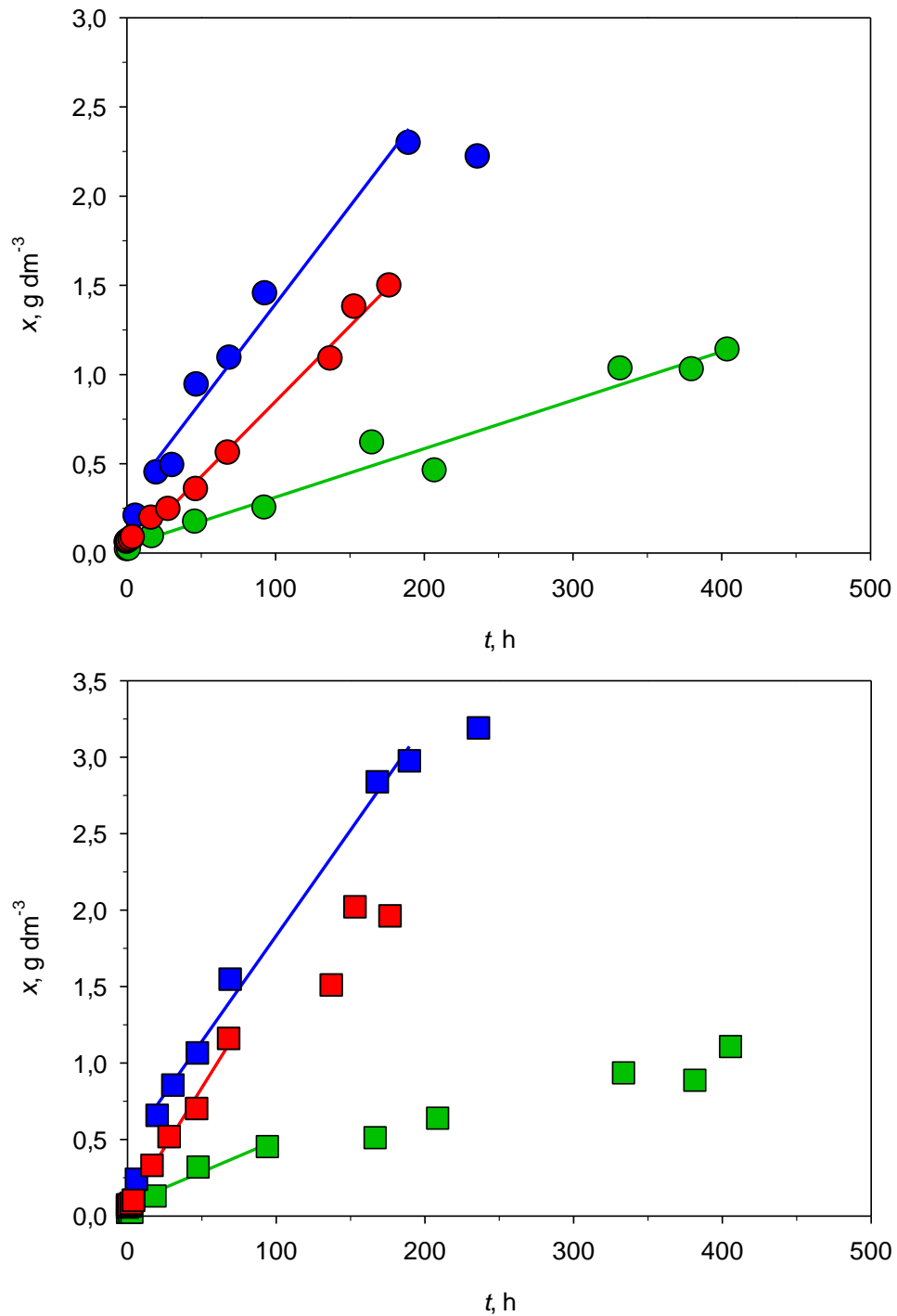


Figura 4.28 Determinación de la productividad volumétrica en biomasa (P_b), según la Ec. 4.16, en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1T4-pH1, F-S1b, FS1T4-pH3, FS2T4-pH1, FS2b y FS2T4-pH3), a 40°C y en condiciones de microaeración, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (círculo) y L-ARA₀ (cuadrado), y modificando el pH₀ de 3,5 (símbolo rojo), 4,5 (verde) a 5,5 (azul).

Con respecto a la evolución del pH , en algunos experimentos se observa un considerable aumento del valor inicial de éste. En este sentido, en la fermentación microaeróbica de L-arabinosa con *H. polymorpha* a 35°C y $pH_0 = 5,5$, tras 66,3 h de bioproceso el pH alcanzó un valor máximo de 7,6 (Expto. FS2T3-pH3, Tabla B.18 del Anexo B.3). De igual forma ocurre en la fermentación utilizando el mismo sustrato, a 40°C y un $pH_0 = 3,5$ (Expto. FS1T4-pH1); tras 176,5 h de cultivo el pH aumentó hasta 4,5. Por otro lado, cabe destacar el hecho de que, en general, en cada una de las temperaturas estudiadas y para cada uno de los pH_0 establecidos (3,5, 4,5 y 5,5), este aumento es más acusado cuando la fuente de carbono y energía en la fermentación fue L-arabinosa. Por ejemplo, en la fermentación microaeróbica de D-arabinosa con *H. polymorpha* a $pH_0 = 3,5$ y 35°C, el pH alcanza un valor máximo del orden de 4,4 tras 148 h de bioproceso (Expto. FS1T3-pH1). Utilizando L-arabinosa como sustrato y manteniendo las mismas condiciones de operación, el pH aumentó hasta un valor de 5,5 transcurridas 216 h de cultivo (Expto. FS2T3-pH1).

En esta serie experimental, la máxima concentración de biomasa, 4,04 g dm⁻³, se alcanzó transcurridas 153 h de cultivo de la fermentación de L-arabinosa con *H. polymorpha* a 40°C, en condiciones microaeróbicas y $pH_0 = 3,5$ (Expto. FS2T4-pH1), existiendo en el medio una concentración final de ART en torno a 6,69 g dm⁻³ y siendo 4,8 el pH .

4.2.3.2 Consumo de sustrato

El consumo de azúcares ha sido estudiado a través de la determinación de $Y_{x/ART}^G$ y q_{ART} . Tras representar los valores de $(x-x_0)$ vs (ART_0-ART) , Fig. 4.29, se procedió a la determinación del rendimiento global en biomasa según Ec. 4.17, Tabla 4.23.

En general, a temperatura constante, se observa que el rendimiento global en biomasa, independientemente del sustrato utilizado (D ó L-arabinosa), disminuye ligeramente con el aumento del pH del medio. En efecto, durante la fermentación microaeróbica de D-arabinosa con *H. polymorpha* a 35°C, se alcanzaron valores de $Y_{x/ART}^G$ próximos a 0,29, 0,18 y 0,16 g g⁻¹ tras modificar el pH_0 de 3,5, 4,5 y 5,5, respectivamente (Fig. 4.29). Modificando la fuente de carbono y energía por L-arabinosa y manteniendo la temperatura de operación (35°C), el rendimiento global en biomasa fue del orden de 0,45, 0,30 y 0,10 g g⁻¹ frente a una variación del pH_0 desde 3,5, 4,5 a 5,5, respectivamente (Fig. 4.29).

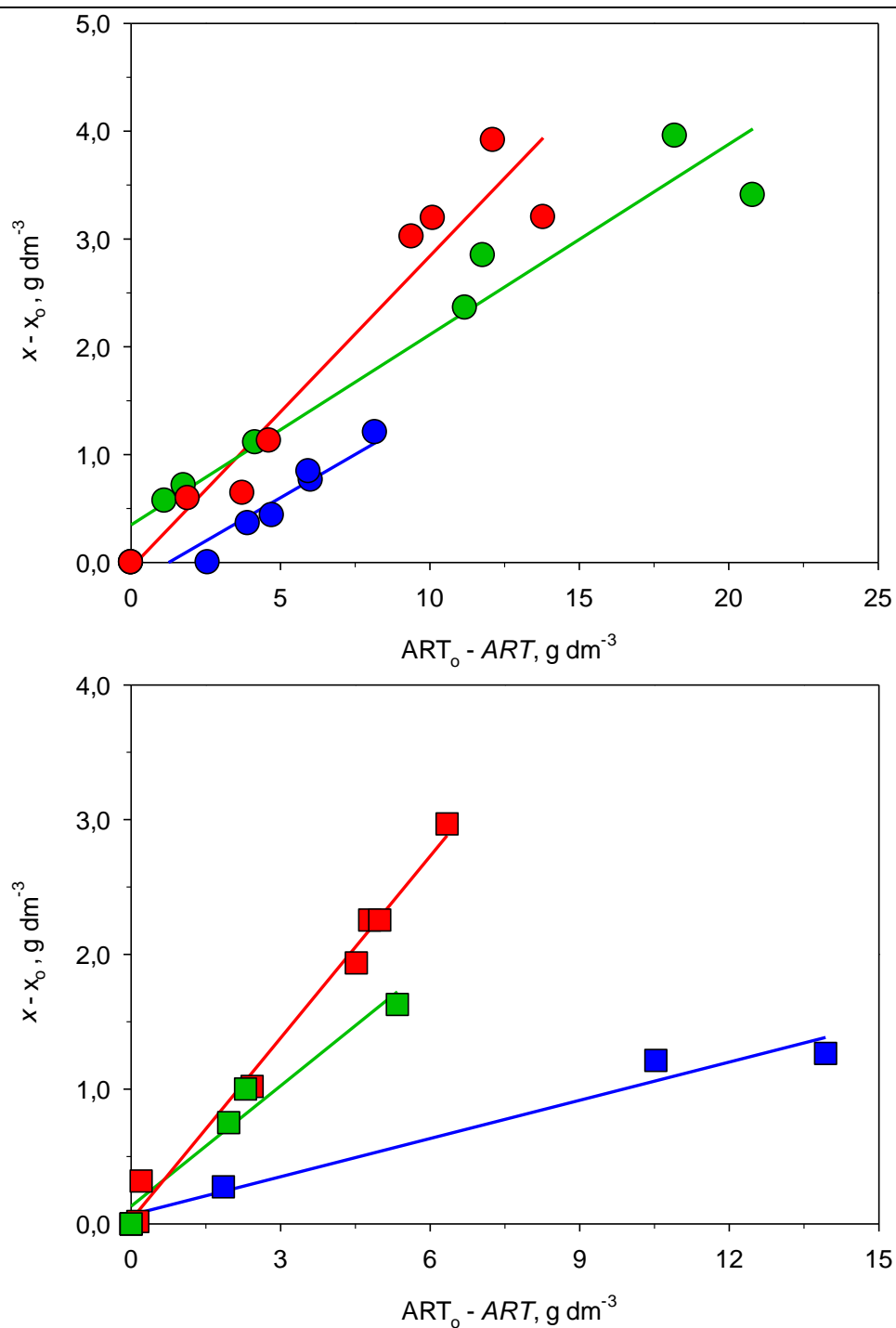


Figura 4.29 Determinación de los rendimientos globales en biomasa ($Y_{x/ART}^G$), según la Ec. 4.17, en la fermentación con *H. polymorpha* (FS1T3-pH1, FS1T3-pH2, FS1T3-pH3, FS2T3-pH1, FS2T3-pH2 y FS2T3-pH3), a 35°C y en condiciones de microaeración, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (círculo) y L-ARA₀ (cuadrado), y modificando el pH₀ de 3,5 (símbolo rojo), 4,5 (verde) a 5,5 (azul).

De igual forma, para cada pH inicial fijo, y utilizando D ó L-arabinosa como sustrato, en general, $Y_{X/ART}^G$ disminuye con el incremento de la temperatura de operación. En efecto, cuando se utilizó D-arabinosa como sustrato durante la fermentación microaeróbica con *H. polymorpha*, $pH_0 = 4,5$ y a las temperaturas de 35, 40 y 45°C, $Y_{X/ART}^G$ fue próximo a 0,18, 0,16 y 0,12 g g⁻¹, respectivamente, Tabla 4.23. De forma similar ocurre utilizando L-arabinosa como sustrato; cuando $pH_0 = 4,5$, el rendimiento global en biomasa disminuye ligeramente (de 0,30 a 0,19 g g⁻¹) conforme aumenta la temperatura desde 35, 40 a 45°C.

Tabla 4.23
FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
INFLUENCIA DEL pH_0 DEL MEDIO DE CULTIVO
Rendimientos globales en biomasa ($Y_{X/ART}^G$)
Condiciones de microaeración

Sustrato	T °C	pH ₀	Expto.	$Y_{X/ART}^G$ g g ⁻¹	r ²	
D-arabinosa	35	3,5	FS1T3-pH1	0,289	0,928	
		4,5	FS1T3-pH2	0,177	0,944	
		5,5	FS1T3-pH3	0,160	0,900	
	40	3,5	FS1T4-pH1	0,183	0,992	
			F-S1a F-S1b	0,161*		
		5,5	FS1T4-pH3	0,152	0,976	
			45	3,5	FS1T5-pH1	0,217
		4,5		FS1T5-pH2	0,116	0,931
		5,5	FS1T5-pH3	0,120	0,957	
	L-arabinosa	35	3,5	FS2T3-pH1	0,450	0,991
			4,5	FS2T3-pH2	0,298	0,954
			5,5	FS2T3-pH3	0,095	0,966
40		3,5	FS2T4-pH1	0,224	0,976	
			F-S2a F-S2b	0,193*		
		5,5	FS2T4-pH3	0,206	0,991	
			45	3,5	FS2T5-pH1	0,167
		4,5		FS2T5-pH2	0,192	0,939
		5,5	FS2T5-pH3	0,199	0,996	

(*) Valores medios calculados anteriormente e indicados en la Tabla 4.11.

En general, se alcanzaron valores de $Y_{X/ART}^G$ superiores cuando se utilizó L-arabinosa como fuente de carbono y energía, en las mismas condiciones de T y pH, tal y como se indicó en el sección de naturaleza de sustrato (Apartado 4.2.1).

En un estudio previo sobre la fermentación de 25 g dm^{-3} de D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C , modificando el pH_0 (3,5, 4,5 y 5,5), y en condiciones microaeróbicas conseguidas sólo a partir de vórtice de agitación (Sánchez *et al.*, 1998), se obtuvo en general un valor de $Y_{X/ART}^G$ inferior al alcanzado en esta serie (0,16, 0,15 y 0,12 g g^{-1} , respectivamente), si bien es cierto que la temperatura de fermentación en aquel experimento fue inferior a las empleadas en esta serie experimental. Al aumentar las condiciones de pH se observó una ligera disminución en el rendimiento global de biomasa. En aquella investigación se operó con un biorreactor discontinuo, tipo tanque agitado, con un volumen de 500 cm^3 y una agitación de 500 rpm.

También en otro trabajo anterior sobre la influencia de la variación de la concentración inicial de sustrato y extracto de levadura, durante la fermentación de D-xilosa con *P. tannophilus*, para la producción de etanol a 30°C y $\text{pH}_0 = 4,5$ (Bravo *et al.*, 1995), partiendo de una concentración inicial de azúcar de 25 g dm^{-3} y 4 g dm^{-3} de extracto de levadura, se alcanzó un valor del rendimiento global en biomasa, $0,094 \text{ g g}^{-1}$, inferior al obtenido en esta serie, si bien es verdad que la temperatura en la que se llevó a cabo el bioproceso (30°C) fue también inferior a todas las establecidas en esta serie experimental (35, 40 y 45°C). En aquella investigación se operó con un biorreactor discontinuo, tipo tanque agitado, con un volumen útil de 2 dm^3 y una agitación de 500 rpm.

De igual forma, en la fermentación de 25 g dm^{-3} de D-xilosa con *C. shehatae* a 30°C , y modificando el pH_0 de 3,5, 4,5 a 4,5, se alcanzaron valores de $Y_{X/ART}^G$ (0,042, 0,036 y 0,052 g g^{-1}) inferiores a las obtenidas en esta serie experimental (Sánchez *et al.*, 1997). En este caso se operó con un biorreactor discontinuo, tipo mezcla perfecta, y condiciones de aeración (500 rpm).

Sánchez *et al.* (2004), en la fermentación de 25 g dm^{-3} de D-xilosa con *P. tannophilus*, $\text{pH} = 4,5$, y 35°C , obtuvieron un valor del rendimiento global en biomasa más próximo a los alcanzados en este estudio, $0,13 \text{ g g}^{-1}$.

La comparación con estos trabajos previos muestra como *H. polymorpha* invierte más sustrato (D o L-arabinosa) en formación de biomasa que *P. tannophilus*, *C. shehatae*, y ella misma, cuando estas levaduras usan como fuente de carbono y energía D-xilosa.

Con el fin de determinar la velocidad específica de consumo de sustrato, se ha aplicado inicialmente el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos. Para ello, la ecuación que ofrece una mejor reproducibilidad de los datos de sustrato en mayores intervalos de tiempo en los resultados obtenidos con *H. polymorpha* fue de nuevo la Ec. 4.19. Tras linealizar esta ecuación, Ec. 4.20, y mediante ajustes por mínimos cuadrados de los valores del $\ln[\ln(ART_0/ART)]$ frente a $\ln t$, se obtuvieron los parámetros α y β en cada uno de los experimentos, Fig. 4.30.

En esta serie experimental (Tablas B13 a B.28, Anexo B.3 y Tablas B.1 a B.5, Anexo B.1), se observa cómo el descenso de la concentración de sustrato en el medio fue más rápida desde el inicio del cultivo para después disminuir lentamente, Fig. 4.31. De nuevo se observan sólo dos etapas de consumo de sustrato, aunque ésta no es la tendencia general cuando la concentración de inóculo es pequeña. Este comportamiento, en relación al consumo rápido de los azúcares desde $t = 0$ h, se justifica considerando que se ha usado una alta concentración de inóculo, y ello conduce a que no se aprecie la parte horizontal inicial de la curva de consumo de sustrato. Una vez obtenidos los parámetros α y β , se puede comprobar la bondad del ajuste recalculando los valores de ART mediante la ecuación Ec. 4.19. Se observa que para los experimentos anteriores la reproducción es satisfactoria en todo el intervalo de tiempo, Fig. 4.31 (línea continua).

A partir de la Ec. 4.21, y con los parámetros α y β , se determinó la velocidad específica de consumo de sustrato en función del tiempo (q_{ART}^D), Tablas 4.24 y 4.25.

Independientemente de la fuente de carbono y energía utilizada (D ó L-arabinosa), en cada una de las condiciones de pH_0 estudiadas, se observa un descenso del valor de q_{ART}^D en el transcurso del cultivo, Tablas 4.24 y 4.25.

El valor de pH_0 del medio de cultivo influye en la velocidad de consumo del sustrato. En este sentido, cuando la pentosa usada fue D-arabinosa, fijada una temperatura de 35°C, en general se observó un ligero descenso de q_{ART}^D al incrementar el valor del pH_0 transcurrido el mismo tiempo de cultivo. Efectivamente, durante la serie de fermentaciones microaeróbicas de 25 g dm⁻³ de D-arabinosa con *H. polymorpha* a 35°C y aumentando el pH_0 del medio (3,5, 4,5 y 5,5), el valor de q_{ART}^D disminuye tras 50 h de cultivo (0,088, 0,057 y 0,046 g g⁻¹ h⁻¹, respectivamente), Tabla 4.24. Sin embargo, a 45°C cuando se modifica el pH_0 de cultivo no se observa esa tendencia.

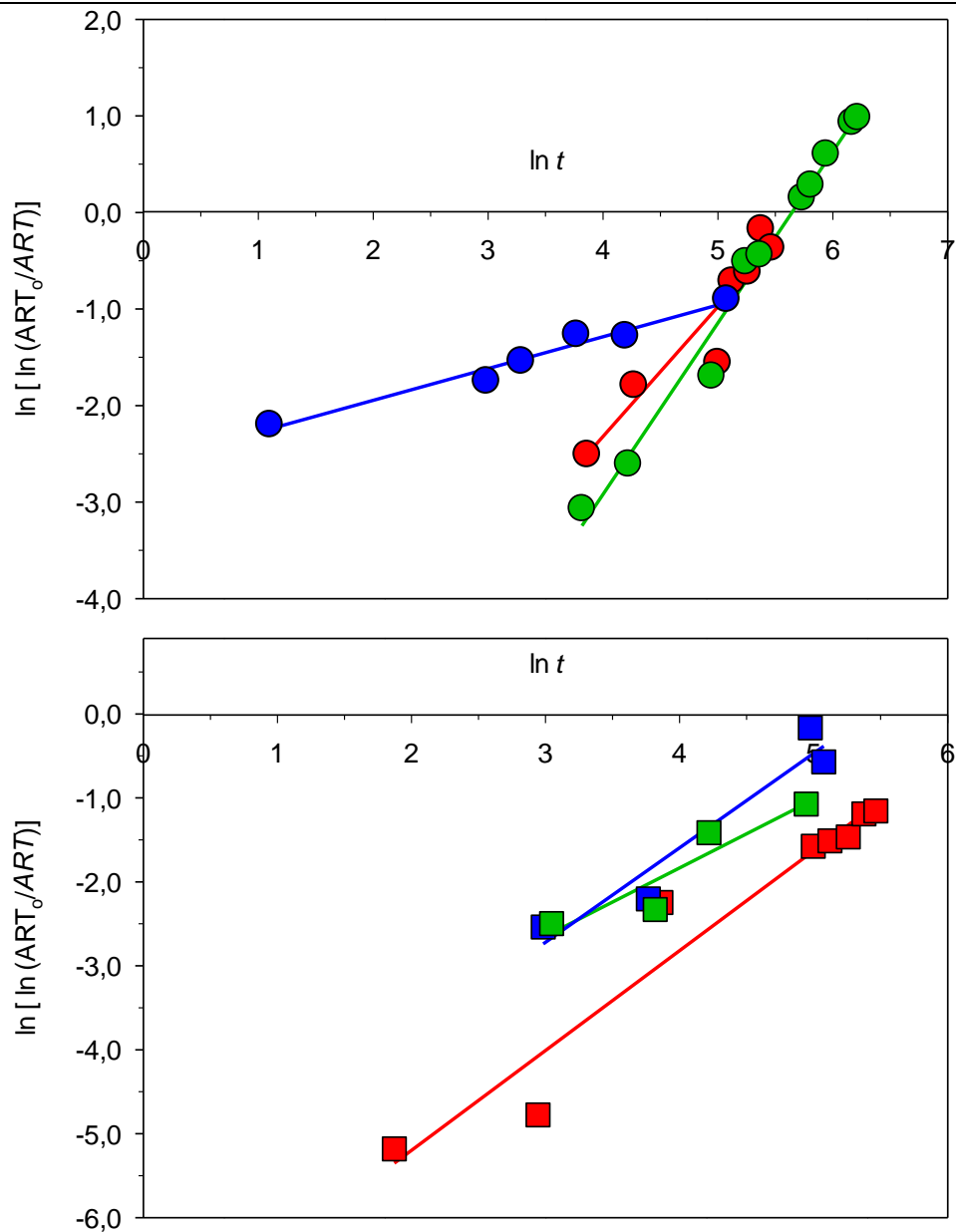


Figura 4.30 Ajuste a la Ec. 4.20 para la determinación de la velocidad específica de consumo de sustrato (q_{ART}^D) de los resultados en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1T3-pH1, FS1T3-pH2, FS1T3-pH3, FS2T3-pH1, FS2T3-pH2 y FS2T3-pH3), a 35°C y en condiciones de microaeración, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (círculo) y L-ARA₀ (cuadrado), y modificando el pH₀ de 3,5 (símbolo rojo), 4,5 (verde) a 5,5 (azul).

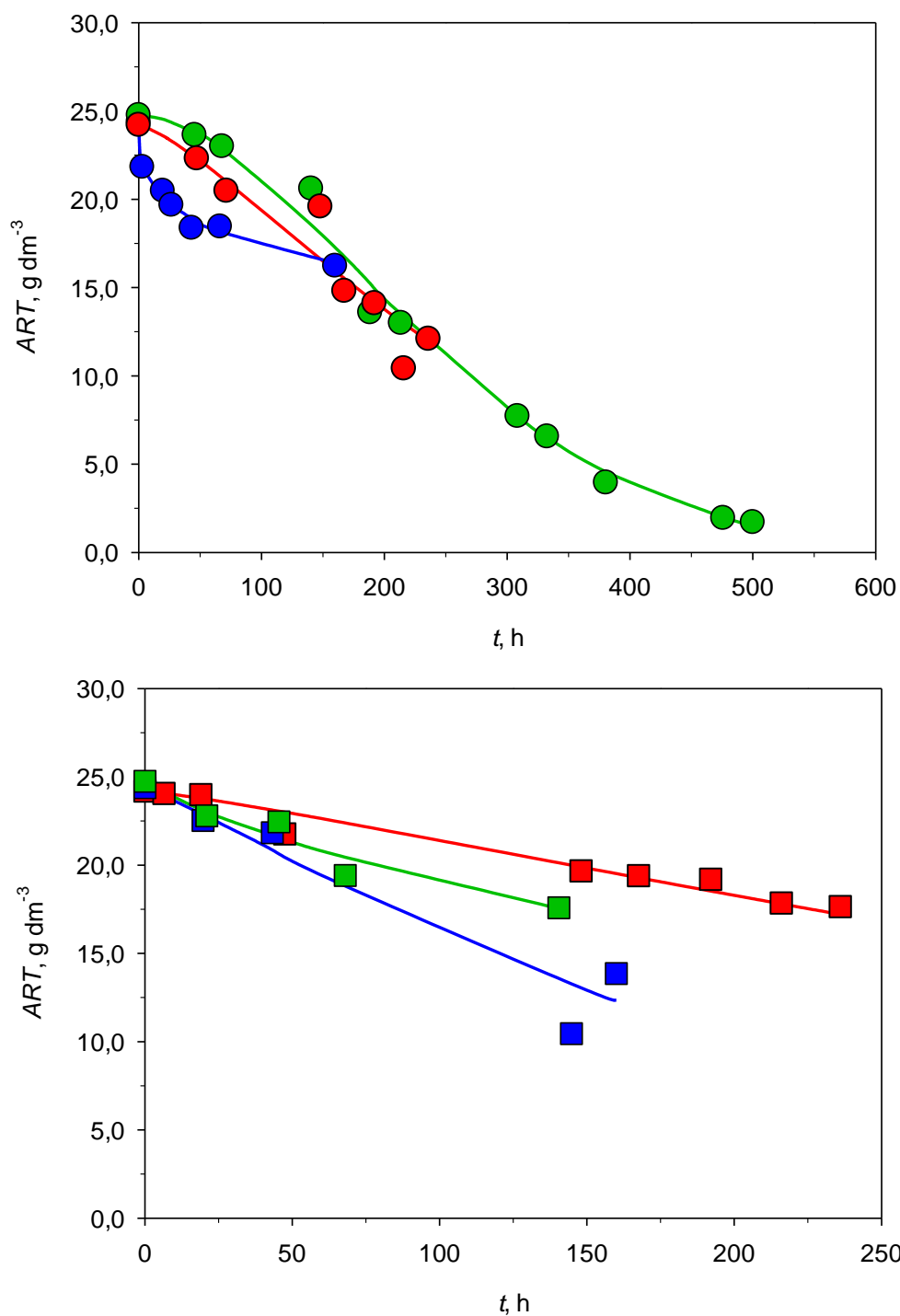


Figura 4.31 Consumo de sustrato en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1T3-pH1, FS1T3-pH2, FS1T3-pH3, FS2T3-pH1, FS2T3-pH2 y FS2T3-pH3), a 35°C y en condiciones de microaeración, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (círculo) y L-ARA₀ (cuadrado), y modificando el pH₀ de 3,5 (símbolo rojo), 4,5 (verde) a 5,5 (azul). La línea continua reproduce la Ec. 4.19 de los mismos cultivos.

Tabla 4.24
 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*. INFLUENCIA DEL pH₀ DEL MEDIO

Velocidades específicas de consumo de D-arabinosa (q_{ART}^D Y q_{ART})

Condiciones de microaeración y D-ARA₀ = 25 g dm⁻³

T °C	pH ₀	Expto.	Fase	t , h	q_{ART}^D g g ⁻¹ h ⁻¹	q_{ART} g g ⁻¹ h ⁻¹
35	3,5	FS1T3-pH1	LIN	50,0	0,088	0,036
			LIN	100,0	0,064	0,024
			EST	192,0	0,016	—
	4,5	FS1T3-pH2	LIN	50,0	0,057	0,099
			LIN	100,0	0,046	0,053
			EST	380,5	0,010	—
	5,5	FS1T3-pH3	EXP	10,0	1,164	0,925
			LIN	50,0	0,046	0,071
			EST	160,0	0,011	—
40	3,5	FS1T4-pH1	LIN	50,0	0,114	0,108
			LIN	100,0	0,059	0,054
			LIN	150,0	0,031	0,036
	4,5	F-S1a	LIN	50,0	0,104*	0,077*
			LIN	150,0	0,022*	0,035*
		F-S1b	EXP	10,0	1,048*	0,567*
	LIN		50,0	0,130*	0,091*	
	5,5	FS1T4-pH3	LIN	150,0	0,027*	0,036*
			LIN	50,0	0,084	0,085
			LIN	100,0	0,036	0,052
			LIN	150,0	0,020	0,037
			EST	236,0	0,013	—
EST			236,0	0,013	—	
45	3,5	FS1T5-pH1	LIN	31,5	0,090	0,100
			LIN	50,0	0,052	0,075
			LIN	100,0	0,019	0,041
			EST	140,5	0,013	—
	4,5	FS1T5-pH2	LIN	50,0	0,139	0,128
			LIN	100,0	0,107	0,074
			LIN	150,0	0,077	0,052
			EST	216,0	0,034	—
	5,5	FS1T5-pH3	LIN	10,0	0,310	0,285
			LIN	50,0	0,119	0,120
			LIN	100,0	0,055	0,070
			LIN	150,0	0,030	0,049
EST	235,5	0,020	—			

(*) Valores calculados anteriormente e indicados en la Tabla 4.12.

Por el contrario, utilizando L-arabinosa como sustrato y fijada la temperatura de operación a 35°C, en general se observó un ligero aumento de q_{ART}^D al incrementar el valor del pH_o del medio transcurrido el mismo tiempo de bioproceso. En efecto, durante la serie de fermentaciones microaeróbicas de 25 g dm⁻³ de L-arabinosa con *H. polymorpha* a 35°C e incrementando el pH_o del medio (3,5, 4,5 y 5,5), los valores de q_{ART}^D tras 50 h de cultivo fueron del orden de 0,029, 0,039 y 0,116 g g⁻¹ h⁻¹, respectivamente, Tabla 4.25. A 40 y 45°C no se ha observado una tendencia claramente definida.

No obstante, cabe destacar que, independientemente del sustrato, condiciones de temperatura de operación y pH_o, los valores de q_{ART}^D tienden a aproximarse a medida que avanza el tiempo de cultivo, Fig. 4.32, comportamiento fácilmente justificable si se considera que estamos en la fase final de consumo de sustrato.

Estos valores de q_{ART}^D (Tablas 4.24 y 4.25) son inferiores a los obtenidos en investigaciones anteriores realizadas por este Grupo de Investigación utilizando biorreactores discontinuos, tipo mezcla perfecta, con un volumen de cultivo de 500 cm³ y 500 rpm y D-xilosa como sustrato. Concretamente, en la fermentación microaeróbica de 25 g dm⁻³ de D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C, y aumentando las condiciones del pH_o del cultivo (3,5, 4,5 y 5,5), tras 100 h de cultivo, los valores determinados para q_{ART}^D fueron del orden de 0,07, 0,09 y 0,07 g g⁻¹ h⁻¹, respectivamente (Sánchez *et al.*, 1998). De igual forma, durante la fermentación de 25 g dm⁻³ de D-xilosa con *C. shehatae* en condiciones microaeróbicas, a 30°C y pH_o = 4,5, se determinó un valor para q_{ART}^D de 0,8 g g⁻¹ h⁻¹ tras 40 h de bioproceso (Sánchez *et al.*, 1997); al aumentar el pH_o (5,5) se alcanzó un valor de q_{ART}^D del orden de 2,0 g g⁻¹ h⁻¹ tras 20 h de cultivo.

Cuando el rendimiento en biomasa permanece constante en el transcurso del experimento, y además se admite que no existe mantenimiento celular, es decir, $Y_{X/ART} = Y_{X/ART}^G$, la velocidad específica de consumo de sustrato (q_{ART}) puede ser calculado usando el método integral de tratamiento de datos cinéticos, Ec. 4.22. En esta serie la velocidad de consumo de sustrato se ha determinado en las fases exponencial y de desaceleración (esta última zona de comportamiento lineal de la biomasa con el tiempo). En general, se observa una aceptable concordancia entre los valores de las velocidades específicas de consumo de sustrato evaluados por los métodos diferencial (q_{ART}^D) e integral (q_{ART}), Tablas 4.24 y 4.25. Se detecta mayor discrepancia en los valores determinados en la fase exponencial.

Tabla 4.25
 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*. INFLUENCIA DEL pH₀ DEL MEDIO

Velocidades específicas de consumo de L-arabinosa (q_{ART}^D y q_{ART})

Condiciones de microaeración y L-ARA₀ = 25 g dm⁻³

T °C	pH ₀	Expto.	Fase	t , h	q_{ART}^D g g ⁻¹ h ⁻¹	q_{ART} g g ⁻¹ h ⁻¹		
35	3,5	FS2T3-pH1	EXP	10,0	0,184	0,273		
			LIN	50,0	0,029	0,025		
			LIN	100,0	0,020	0,016		
			LIN	150,0	0,015	0,012		
	4,5	FS2T3-pH2	LIN	50,0	0,039	0,040		
			LIN	100,0	0,019	0,025		
			5,5	FS2T3-pH3	EXP	19,8	0,272	1,261
					LIN	50,0	0,116	0,091
	LIN	100,0			0,071	0,064		
	EST	160,0			0,047	—		
	40	3,5	FS2T4-pH1	LIN	28,0	0,113	0,134	
				LIN	50,0	0,068	0,083	
EST				153,0	0,017	—		
4,5		F-S2a	LIN	50,0	0,059*	0,046*		
			LIN	150,0	0,018*	0,024*		
		F-S2b	EXP	10,0	0,887*	0,569*		
			LIN	50,0	0,073*	0,078*		
5,5		FS2T4-pH3	EST	166,5	0,021*	—		
			EXP	6,0	0,375	1,553		
			LIN	50,0	0,073	0,059		
			LIN	100,0	0,038	0,037		
45		3,5	FS2T5-pH1	LIN	150,0	0,023	0,027	
	EXP			6,5	2,591	0,896		
	LIN			20,5	0,211	0,212		
	LIN			50,0	0,067	0,094		
	4,5	FS2T5-pH2	LIN	100,0	0,026	0,053		
			EST	140,5	0,021	—		
			LIN	50,0	0,110	0,117		
			LIN	100,0	0,064	0,055		
	5,5	FS2T5-pH3	LIN	150,0	0,043	0,036		
			EXP	7,0	0,713	1,158		
			LIN	50,0	0,086	0,061		
			LIN	100,0	0,038	0,038		
5,5	FS2T5-pH3	LIN	150,0	0,021	0,028			
		LIN	100,0	0,038	0,038			
		LIN	50,0	0,086	0,061			

(*) Valores calculados anteriormente e indicados en la Tabla 4.12.

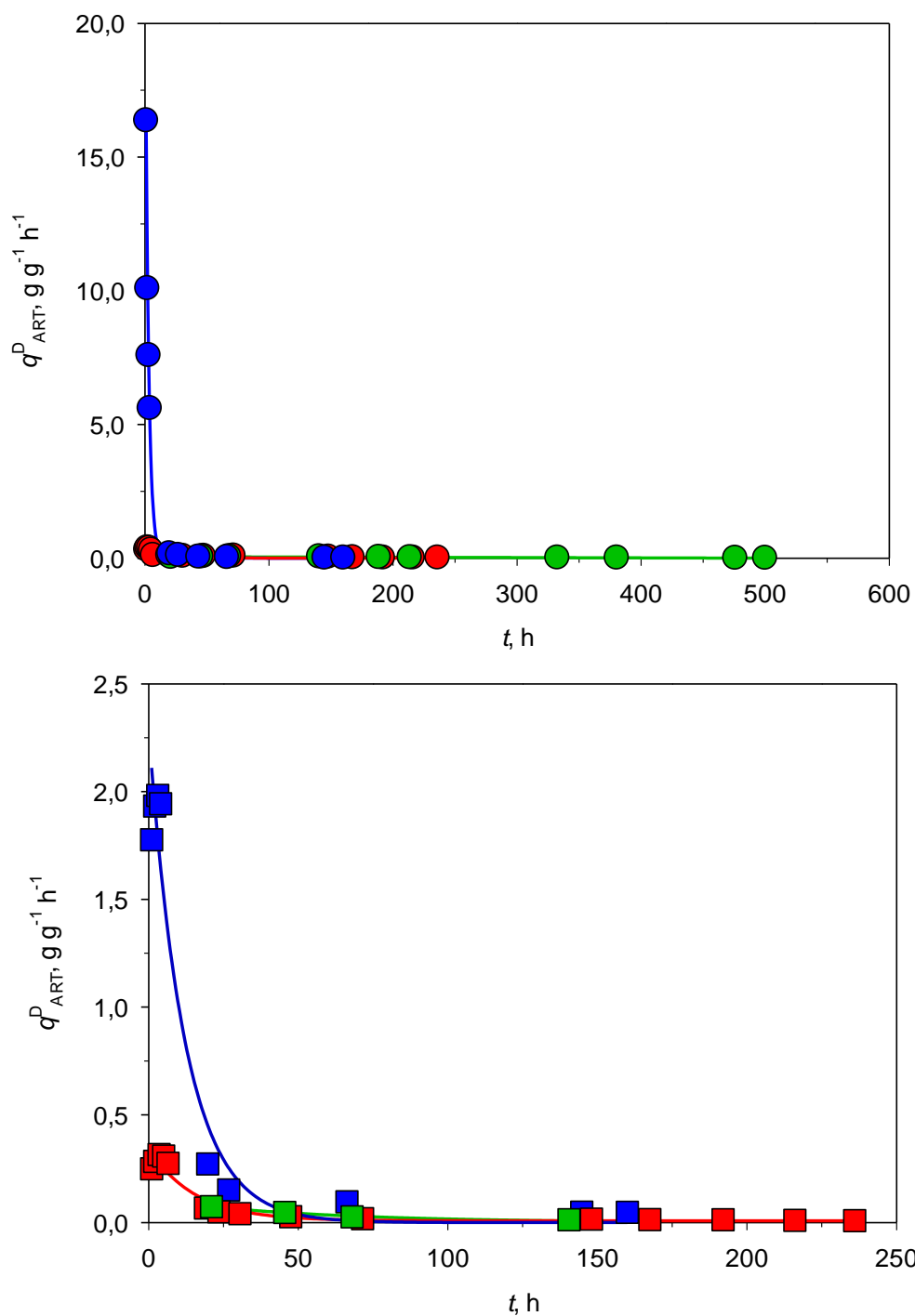


Figura 4.32 Velocidades específicas de consumo de sustrato (q_{ART}^D) en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1T3-pH1, FS1T3-pH2, FS1T3-pH3, FS2T3-pH1, FS2T3-pH2 y FS2T3-pH3), a 35°C y en condiciones de microaeración, con 25 g dm⁻³ de D-ARA_o (círculo) y L-ARA_o (cuadrado), y modificando el pH_o de 3,5 (símbolo rojo), 4,5 (verde) a 5,5 (azul).

4.2.3.3 Formación de bioproductos

En esta serie experimental centrada en el estudio de la influencia del pH inicial del medio, donde se utilizó D y L-arabinosa como sustrato, el bioproducto mayoritario fue arabitol. La máxima concentración determinada en etanol no superó los $0,29 \text{ g dm}^{-3}$ en la fermentación microaeróbica de D-arabinosa con *H. polymorpha* a 35°C y $\text{pH}_0 = 3,5$ (Expto. FS1T3-pH1, Anexo B.3), no considerándose, por tanto, un producto de formación mayoritaria. De igual forma, no se han detectado concentraciones elevadas de ácido acético durante el cultivo, siendo $0,07 \text{ g dm}^{-3}$ el valor más elevado alcanzado en esta serie utilizando D-arabinosa a 45°C y $\text{pH}_0 = 4,5$ (Expto. FS1T5-pH2, Anexo B.3).

En esta serie no se han determinado concentraciones en xilitol significativas, siendo la máxima alcanzada $0,10 \text{ g dm}^{-3}$, utilizando D-arabinosa como sustrato, a 35°C y $\text{pH}_0 = 5,5$ (Expto. FS1T3-pH3, Anexo B.3). En lo que respecta a la formación de arabitol, se alcanzó una concentración máxima de $2,25 \text{ g dm}^{-3}$, en la fermentación microaeróbica de D-arabinosa con *H. polymorpha*, a 35°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, tras 380,5 h (Expto. FS1T3-pH2, Anexo B.3). Manteniendo la misma pentosa como sustrato, así como las condiciones de pH inicial de cultivo, se obtuvo una concentración máxima de $1,96 \text{ g dm}^{-3}$ tras 190 h, y $1,00 \text{ g dm}^{-3}$ tras 216 h, cuando la temperatura de operación se incrementó a 40 y 45°C , respectivamente (Exptos. F-S1a, Anexos B.1 y FS1T5-pH2 Anexo B.3). Cuando L-arabinosa fue usada como fuente de carbono y energía, se alcanzó una concentración máxima en arabitol de $1,54 \text{ g dm}^{-3}$ tras 137,0 h a 40°C y $\text{pH}_0 = 3,5$ (Expto FS2T4-pH1, Anexo B.3), siendo muy próxima esta concentración máxima a la obtenida tras 144,8 h, $1,37 \text{ g dm}^{-3}$, cuando la temperatura se redujo a 35°C y $\text{pH}_0 = 5,5$ (Expto. FS2T3-pH3, Anexo B.3).

La formación de bioproductos ha sido estudiada a través de la determinación del rendimiento instantáneo en arabitol ($Y_{Ar/ART}$), y la velocidad específica de formación de arabitol (q_{Ar}).

➤ Velocidad específica de formación de arabitol

Con el fin de determinar este parámetro se aplicó el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos (q_{Ar}^D) a los valores experimentales de concentración de arabitol en el medio (Tablas B13 a B28, Anexo B.3 y Tablas B1 a B5, Anexo B.1). A partir de la representación de *Ar versus t* (Fig. 4.33), se obtiene la velocidad de producción de arabitol por unidad de volumen, dAr/dt , Tabla 4.26 y 4.27.

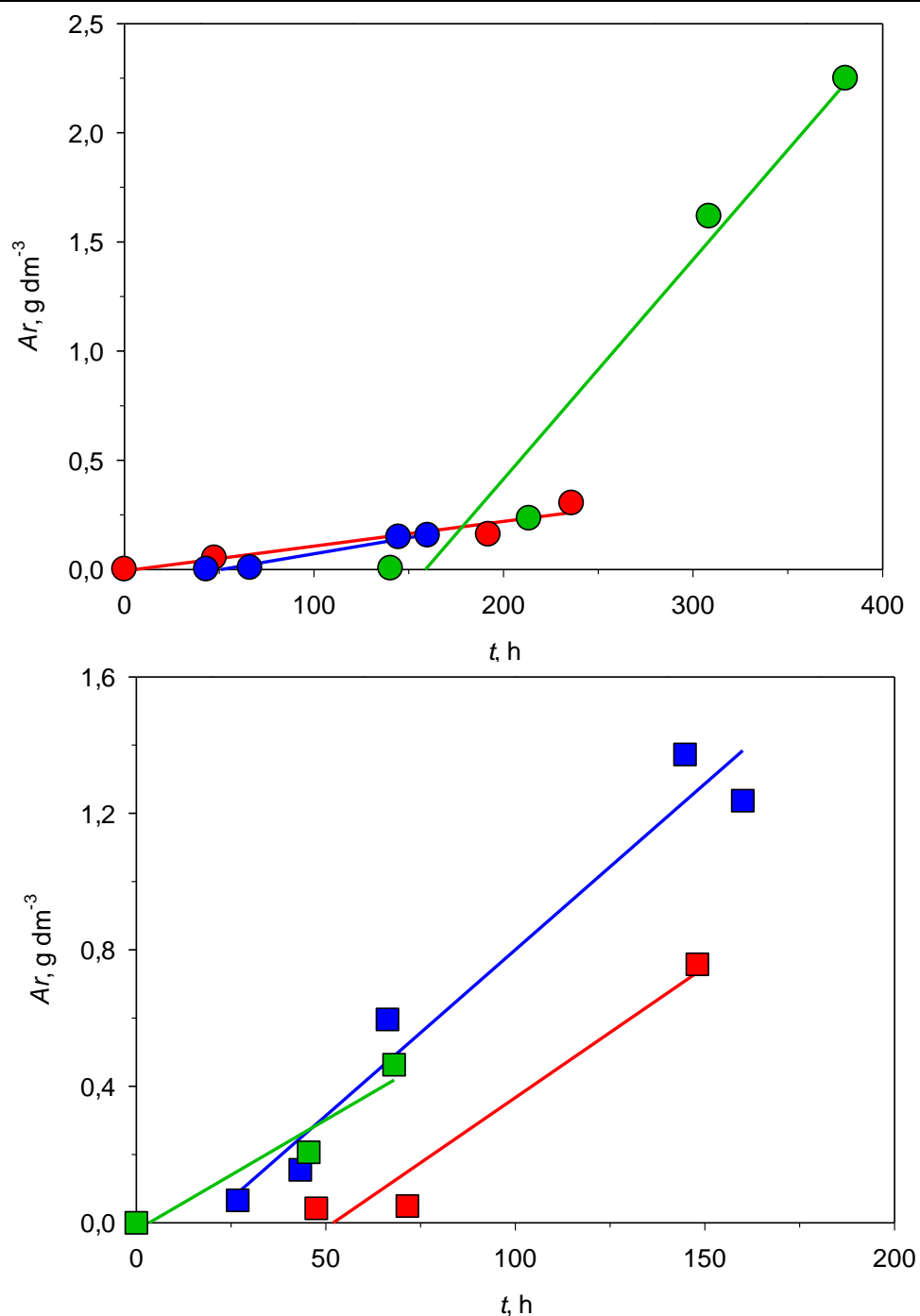


Figura 4.33 Ajuste de la concentración de arabitol frente al tiempo. Cálculo de la velocidad específica de formación de arabitol (q_{Ar}^D) en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1T3-pH1, FS1T3-pH2, FS1T3-pH3, FS2T3-pH1, FS2T3-pH2 y FS2T3-pH3), a 35°C y en condiciones de microaeración, con 25 g dm^{-3} de D-ARA₀ (círculo) y L-ARA₀ (cuadrado), y modificando el pH₀ de 3,5 (símbolo rojo), 4,5 (verde) a 5,5 (azul).

En general, independientemente del sustrato utilizado (D o L-arabinosa), durante la fermentación microaeróbica con *H. polymorpha*, a temperatura constante, no se observa una tendencia definida, aunque los mayores valores de dAr/dt se determinaron en el cultivo realizado a pH inicial 3,5 y 40°C, usando L-arabinosa como sustrato (Expto. FS2T4-pH1). No obstante, durante la fermentación microaeróbica de D-arabinosa con *H. polymorpha* a 45°C, la productividad volumétrica en arabitol (0,002, 0,004 y 0,006 g dm⁻³ h⁻¹) aumentó al incrementar el pH₀ de 3,5, 4,5 a 5,5 (Exptos. FS1T5-pH3, FS1T5-pH2 y FS1T5-pH3), Tabla 4.26. De igual forma, al modificar la pentosa por L-arabinosa, manteniendo la misma temperatura de operación (45°C) y aumentando el pH₀ de 4,5 a 5,5, se observó un ligero incremento de dAr/dt , 0,002 y 0,005 g dm⁻³ h⁻¹, respectivamente (Exptos. FS2T5-pH2 y FS2T5-pH3). Por otro lado, se observa que, manteniendo el pH₀ constante e independientemente de la pentosa utilizada como sustrato (D o L-arabinosa), en general, tampoco se observa una tendencia definida.

Por otra parte, utilizando D-arabinosa y fijada la temperatura de operación a 35°C, la producción de arabitol fue más tardía a pH₀ = 4,5, dando comienzo en torno a las 140,5 h del inicio del cultivo (Expto. FS1T3-pH2, Anexo B.3), mientras que a pH₀ 3,5 y 5,5 esta producción da comienzo prácticamente al comienzo del cultivo, (Exptos. FS1T3-pH1 y FS1T3-pH3, Anexo B.3), Fig. 4.33.

A partir de las productividades volumétricas en arabitol se determinan las velocidades específicas de producción de arabitol mediante el método diferencial (q_{Ar}^D) según la Ec. 4.24 (Tablas 4.26 y 4.27). Se observa que q_{Ar}^D disminuye a lo largo del tiempo de cultivo independientemente de la fuente de carbono y energía empleada, así como de las condiciones de pH inicial y temperatura establecidas.

En general, para cualquiera de las pentosas utilizada en esta serie, y a temperatura constante, no se aprecia una tendencia definida de q_{Ar}^D al aumentar el pH₀ del medio y tras el mismo tiempo de cultivo, Tablas 4.26 y 4.27. No obstante, utilizando D-arabinosa como sustrato, a 40°C y aumentando el pH₀ (3,5, 4,5 y 5,5), la velocidad de formación de arabitol aumentó (0,0006, 0,0065 y 0,0078 g g⁻¹ h⁻¹) transcurridos el mismo tiempo de bioproceso, 50h, Fig. 4.34. Por el contrario, utilizando L-arabinosa como pentosa, a 35°C y modificando el pH₀ de 3,5, 4,5 a 5,5, no se observa este incremento en los valores de q_{Ar}^D .

Tabla 4.26

FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*. INFLUENCIA DEL pH₀ DEL MEDIO Productividad volumétrica (Q_{Ar}) y velocidades específicas de formación de arabitol (q_{Ar}^D , q_{Ar}) Condiciones de microaeración y D-ARA₀ = 25 g dm⁻³

T °C	pH ₀	Expto.	Q_{Ar} 10 g dm ⁻³ h ⁻¹	Fase	t, h	q_{Ar}^D 10 g g ⁻¹ h ⁻¹	q_{Ar} 10 g g ⁻¹ h ⁻¹
35	3,5	FS1T3-pH1	0,011	EXP	10,0	0,085	0,079
				LIN	100,0	0,012	0,005
				EST	192,0	0,003	—
	4,5	FS1T3-pH2	0,101	LIN	140,5	0,084	0,073
				LIN	332,5	0,025	0,022
				EST	380,5	0,029	—
	5,5	FS1T3-pH3	0,015	LIN	50,0	0,021	0,029
				LIN	144,8	0,010	0,014
				EST	160,0	0,012	—
40	3,5	FS1T4-pH1	0,006	LIN	50,0	0,006	0,006
				LIN	100,0	0,003	0,003
				LIN	150,0	0,002	0,002
	F-S1a	0,076	LIN	50,0	0,065*	0,063*	
			LIN	150,0	0,030*	0,029*	
			LIN	189,5	0,031*	0,030*	
	4,5	F-S1b	0,053	LIN	165,0	0,037*	0,030*
				LIN	200,0	0,039*	0,032*
				LIN	332,0	0,022*	0,018*
	F-S1c	0,019	LIN	68,0	0,016*	0,014*	
			LIN	150,0	0,006*	0,006*	
			LIN	176,5	0,006*	—	
5,5	FS1T4-pH3	0,066	EXP	6,0	0,320	1,641	
			LIN	50,0	0,078	0,069	
			LIN	100,0	0,047	0,042	
			LIN	189,5	0,029	0,025	
45	3,5	FS1T5-pH1	0,023	EXP	6,5	0,308	0,210
				LIN	50,0	0,029	0,029
				LIN	116,5	0,014	0,014
	EST	—	LIN	167,5	0,014	—	
			LIN	50,0	0,091	0,077	
			LIN	100,0	0,052	0,044	
	4,5	FS1T5-pH2	0,039	EST	216,0	0,019	—
				LIN	100,0	0,043	0,037
				LIN	150,0	0,031	0,026
5,5	FS1T5-pH3	0,064	LIN	100,0	0,043	0,037	
			LIN	150,0	0,031	0,026	

(*) Valores calculados anteriormente e indicados en la Tabla 4.13.

Tabla 4.27
 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
 INFLUENCIA DEL pH₀ DEL MEDIO DE CULTIVO

Productividad volumétrica (Q_{Ar}) y velocidades específicas de formación de arabitol (q_{Ar}^D , q_{Ar})
 Condiciones de microaeración y L-ARA₀ = 25 g dm⁻³

T °C	pH ₀	Expto.	Q_{Ar} 10 g dm ⁻³ h ⁻¹	Fase	t , h	q_{Ar}^D 10 g g ⁻¹ h ⁻¹	q_{Ar} 10 g g ⁻¹ h ⁻¹
35	3,5	FS2T3-pH1	0,076	LIN	50,0	0,075	0,072
				LIN	100,0	0,048	0,046
				LIN	148,0	0,038	0,037
	4,5	FS2T3-pH2	0,065	LIN	21,0	0,073	0,050
				LIN	50,0	0,049	0,033
				LIN	68,0	0,037	0,025
				LIN	50,0	0,134	0,155
				LIN	100,0	0,094	0,108
				LIN	144,8	0,075	0,086
40	3,5	FS2T4-pH1	0,110	EXP	10,0	0,311	0,487
				LIN	50,0	0,066	0,093
				EST	137,0	0,036	—
	4,5	F-S2a	0,055	LIN	21,0	0,059*	0,038*
				LIN	50,0	0,037*	0,024*
				LIN	117,0	0,021*	0,014*
				EXP	10,0	0,327*	0,392*
				LIN	50,0	0,061*	0,054*
				LIN	94,0	0,039*	0,034*
	5,5	FS2T4-pH3	0,045	EXP	6,0	0,187	0,757
				LIN	20,0	0,068	0,050
				LIN	30,5	0,053	0,038
LIN				47,0	0,042	0,031	
LIN				164,5	0,012	0,011	
LIN				188,0	0,010	0,009	
45	4,5	FS2T5-pH2	0,021	LIN	216,0	0,008	0,007
				LIN	310,5	0,006	0,005
				LIN	30,0	0,053	0,053
				LIN	50,0	0,039	0,039
	5,5	FS2T5-pH3	0,047	LIN	100,0	0,024	0,025
				LIN	140,5	0,020	0,020

(*) Valores calculados anteriormente e indicados en la Tabla 4.13.

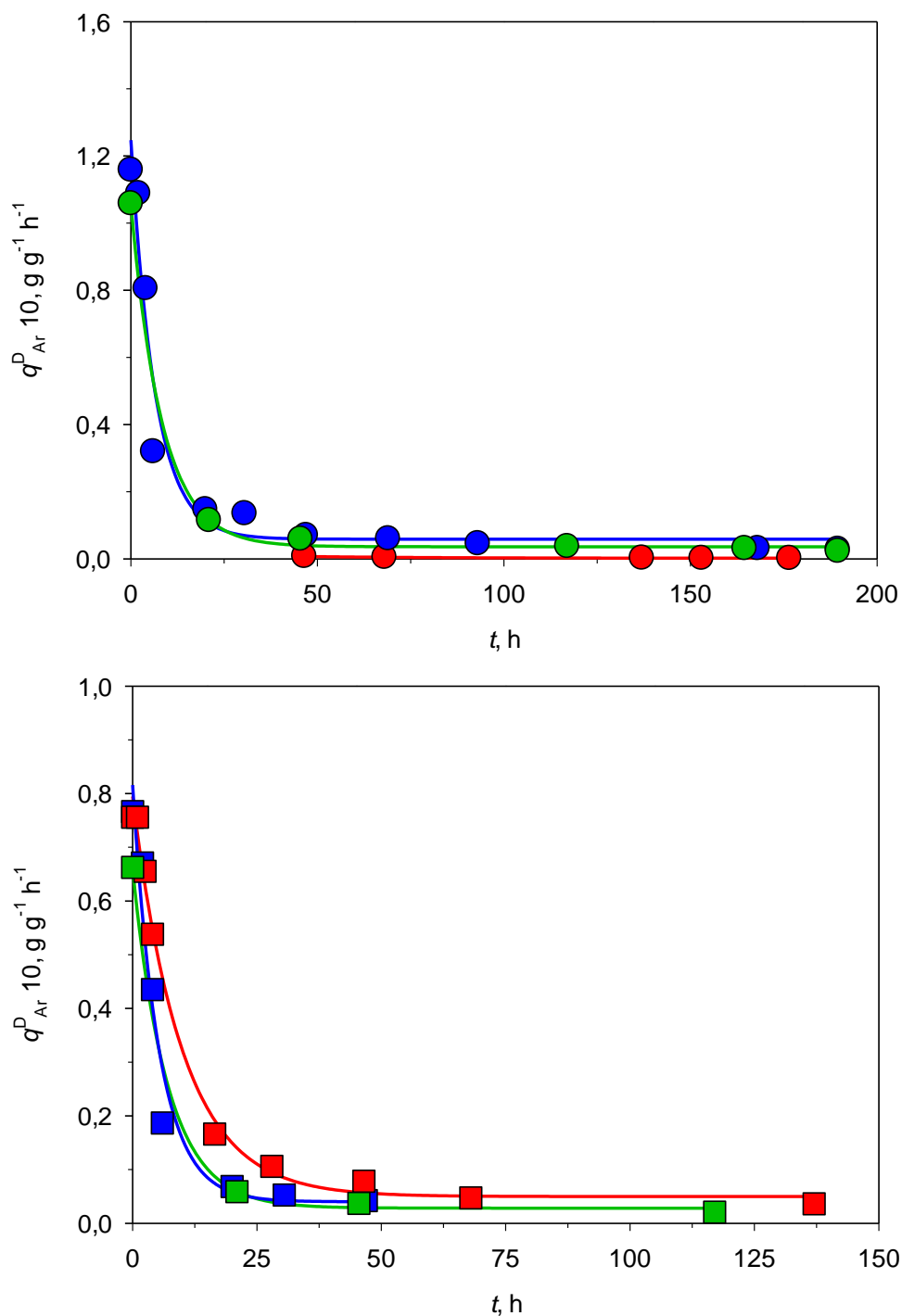


Figura 4.34 Velocidad específica de formación de arabitol (q_{Ar}^D) en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1T4-pH1, F-S1a, FS1T4-pH3, FS2T4-pH1, F-S2a y FS2T4-pH3), a 40°C y en condiciones de microaeración, con 25 g dm^{-3} de D-ARA₀ (círculo) y L-ARA₀ (cuadrado), y modificando el pH₀ de 3,5 (símbolo rojo), 4,5 (verde) a 5,5 (azul).

Los valores determinados de q_{Ar}^D a 35°C y pH₀ de 3,5, 4,5 a 5,5, fueron inferiores a los obtenidos por Sánchez *et al.* (1998) en la fermentación de D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C y pH₀ entre 4,5 y 5,5, obteniendo xilitol como bioproducto principal; en efecto, se determinaron unos valores de la velocidad específica de producción de xilitol, 0,04, 0,06 y 0,1 g g⁻¹ h⁻¹, al aumentar el pH₀ (3.5, 4,5 y 5.5) y una vez transcurridas 80 h de cultivo.

La determinación de la productividad global en arabitol ($Y_{Ar/x}^G$) se realizó según Ec. 4.25, es decir, recurriendo a la pendiente de la línea recta obtenida en la representación de *Ar* vs (*x-x₀*), Fig. 4.35. Durante la fermentación de D-arabinosa con *H. polymorpha*, a 40°C y pH₀ = 4,5 (Expto. F-S1b), se obtuvo una productividad global en arabitol superior, 0,68 g g⁻¹, si se compara con el obtenido cuando 3,5 y 5,5 (0,03 y 0,54 g g⁻¹) fue el valor del pH₀, (Exptos. FS1T4-pH1 y FS1T4-pH3), Fig. 4.35. Igual tendencia se observa con L-arabinosa.

A partir de $Y_{Ar/x}^G$, y haciendo uso de la definición de velocidad específica de crecimiento (Aiba *et al.*, 1973), se calculó la velocidad específica de producción de arabitol mediante el método integral de acuerdo con la Ec. 4.26. Se observa una aceptable concordancia entre los valores de las velocidades específicas de producción de arabitol evaluados por los métodos diferencial (q_{Ar}^D) e integral (q_{Ar}), Tabla 4.26 y 4.27, fundamentalmente en la fase de desaceleración del crecimiento.

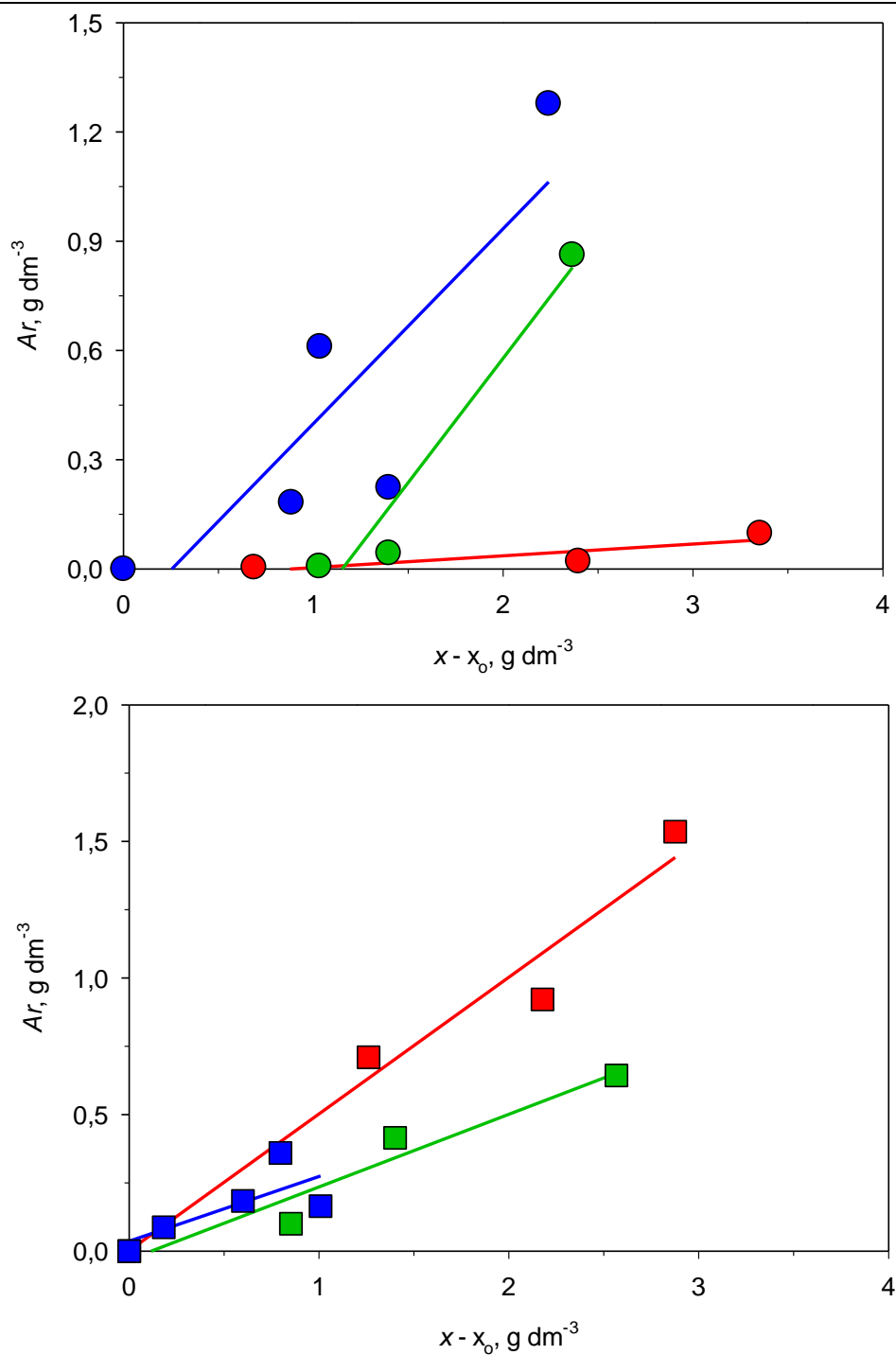


Figura 4.35 Determinación de la productividad global en arabitol ($Y_{Ar/x}^G$) según la Ec. 4.25 en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1T4-pH1, F-S1b, FS1T4-pH3, FS2T4-pH1, F-S2a y FS2T4-pH3), a 40°C y en condiciones de microaeración, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (círculo) y L-ARA₀ (cuadrado), y modificando el pH₀ de 3,5 (símbolo rojo), 4,5 (verde) a 5,5 (azul).

➤ Rendimiento en arabitol

A partir de la representación de los valores de Ar a distintos tiempos frente a $(ART_0 - ART)$, Fig. 4.36, se obtiene una recta cuya pendiente corresponde a $Y_{Ar/ART}^G$, según la Ec. 4.30, siendo la concentración inicial en arabitol nula, ya que a $t = 0$ h $Ar_0 \rightarrow 0$.

En general, a temperatura constante, para cualquiera de las pentosas utilizadas en esta serie, los valores de $Y_{Ar/ART}^G$ muestran una cierta tendencia al modificar los valores de pH_0 , Tabla. 4.28, diferente en ambos sustratos. En efecto, utilizando D-arabinosa como sustrato, a 40°C y $pH_0 = 4,5$, el valor de $Y_{Ar/ART}^G$, 0,086 g g⁻¹, fue superior al determinado a pH inicial 3,5 y 5,5, Fig. 4.36. Sin embargo, al modificar la pentosa por L-arabinosa y manteniendo la temperatura de operación (40°C), el mayor valor de $Y_{Ar/ART}^G$, 0,114 g g⁻¹, se alcanzó a $pH_0 = 3,5$, disminuyendo éste con el incremento del pH inicial, Fig. 4.36.

Por otro lado, al mantener constante el valor del pH inicial del medio y modificar la temperatura de operación, en general, no se pone de manifiesto una tendencia claramente definida en el rendimiento global en arabitol $Y_{Ar/ART}^G$, Tabla. 4.28. Sin embargo, cabe mencionar que el máximo rendimiento global en arabitol se determina con D-arabinosa a 35°C y $pH_0 = 4,5$.

En general, estos resultados obtenidos en $Y_{Ar/ART}^G$ durante la fermentación de D y L-arabinosa con *H. polymorpha* (*Pichia augusta*) son superiores a los determinados por Fonseca *et al.* (2007), 0,01 g g⁻¹, en la fermentación de L-arabinosa con *Candida arabinofermentans* PYCC 5603^T a 30°C y $pH = 5,5$. No obstante, al modificar la levadura por *P. guilliermondii* PYYCC 3012, estos autores obtuvieron un rendimiento en arabitol superior, 0,47 g g⁻¹. Este grupo de investigación utilizó biorreactores de 1 dm³ operando con 500 cm³ de medio de cultivo, sometidos a una velocidad de agitación de 200 rpm; también, cabe destacar que ambas levaduras, *C. arabinofermentans* y *P. guilliermondii*, son mesófilas a diferencia con *H. polymorpha*.

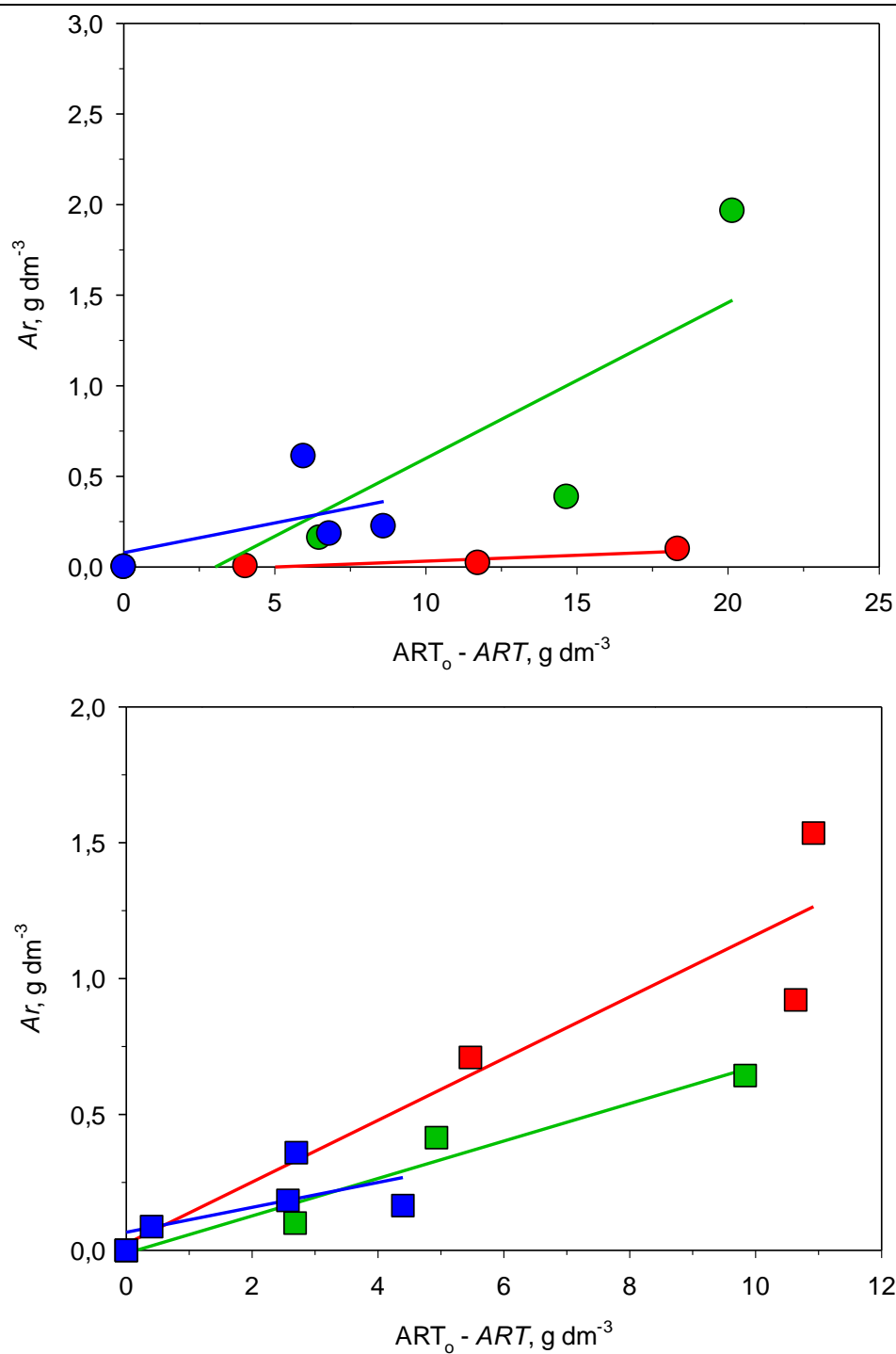


Figura 4.36 Determinación de los rendimientos globales en arabitol ($Y_{Ar/ART}^G$) según la Ec. 4.30 en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1T4-pH1, F-S1a, FS1T4-pH3, FS2T4-pH1, F-S2a y FS2T4-pH3), a 40°C y en condiciones de microaeración, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (círculo) y L-ARA₀ (cuadrado), y modificando el pH₀ de 3,5 (símbolo rojo), 4,5 (verde) a 5,5 (azul).

Tabla 4.28
 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
 INFLUENCIA DEL pH₀ DEL MEDIO DE CULTIVO

Rendimientos globales en arabitol ($Y_{Ar/ART}^G$)

Condiciones de microaeración

Sustrato	T °C	pH ₀	Expto.	t, h	$Y_{Ar/ART}^G$ g g ⁻¹	
D-arabinosa	35	3,5	FS1T3-pH1		0,021	
		4,5	FS1T3-pH2		0,141	
		5,5	FS1T3-pH3		0,069	
	40	3,5	FS1T4-pH1		0,006	
		4,5	F-S1a		0,086*	
			F-S1b	332	0,069 ^{i*}	
		5,5	FS1T4-pH3		0,033	
		45	3,5	FS1T5-pH1		0,051
			4,5	FS1T5-pH2		0,061
			5,5	FS1T5-pH3	163,0	0,053 ⁱ
L-arabinosa	35	3,5	FS2T3-pH1	148,0	0,168 ⁱ	
		4,5	FS2T3-pH2		0,087	
		5,5	FS2T3-pH3		0,112	
	40	3,5	FS2T4-pH1		0,114	
		4,5	F-S2a		0,069*	
			F-S2b	94,0	0,074 ^{i*}	
		5,5	FS2T4-pH3		0,046	
		45	4,5	FS2T5-pH2		0,055
			5,5	FS2T5-pH3	30	0,022 ⁱ

(ⁱ) Rendimientos instantáneos ($Y_{Ar/ART}$).

(*) Valores calculados anteriormente e indicados en la Tabla 4.15.

4.2.4 Efecto de la temperatura

En relación al estudio de la influencia de la temperatura, para cada una de las pentosas utilizadas como sustrato (D-arabinosa, L-arabinosa y D-xilosa), se llevó a cabo una serie experimental de fermentaciones con *H. polymorpha* partiendo de una concentración inicial de sustrato de 25 g dm⁻³ en el medio de cultivo de Lindegren *et al.* (1958), en condiciones de microaeración (entrada de aire sólo por el vórtice de agitación) y 4,5 de pH inicial. En esta serie experimental, se modificó la temperatura dentro de un rango de 25 a 50°C con el fin de observar el efecto de esta variable en el proceso de fermentación de cada una de las pentosas utilizadas, aunque este intervalo fue algo diferente para cada sustrato. En efecto,

cuando la pentosa usada fue D-arabinosa, el rango de temperaturas fue 25 – 50°C, en L-arabinosa 35 – 50°C y empleando D-xilosa, 30 – 50°C.

Los resultados experimentales obtenidos en cuanto a evolución del *pH*, generación de biomasa, consumo de sustrato, y formación de bioproductos durante el transcurso del proceso de fermentación se han indicado en las Tablas B.29 a B.33 (Anexo B.4), y se han representado en las Figuras B.29 a B.33 (Anexo B.4) los mismos parámetros excepto el *pH* y la concentración de etanol; cuando el sustrato es D o L-arabinosa se representa la concentración de arabitol que debe ser el bioproducto de mayor concentración, y cuando el sustrato es D-xilosa en las gráficas se muestra la concentración de xilitol.

Los procesos de fermentación llevados a cabo con D y L-arabinosa y D-xilosa, en condiciones de microaeración, $pH_0 = 4,5$ y 40°C ya se mencionaron en el Anexo B.1 referido al estudio de la influencia de la naturaleza del sustrato (Exptos. F-S1a, F-S1b, F-S1c, F-S2a, F-S2b y F-S3).

Los resultados de los experimentos de fermentación de D-arabinosa con *H. polymorpha*, a 30°C y $pH_0 = 4,5$, en condiciones de microaeración, fueron expuestos en el Anexo B.2 dentro del estudio de la influencia de la aeración (Exptos. FS1-Ma y FS1-Mb). Bajo las mismas condiciones de operación, se llevó a cabo la fermentación de D-xilosa con *H. polymorpha*, mostrándose los resultados en Anexo B.2 (Expto. FS3-M).

Utilizando D y L-arabinosa como sustrato, $pH_0 = 4,5$ y condiciones de microaeración, se realizaron fermentaciones con *H. polymorpha* a diferente temperatura, 35 y 45°C. Estos experimentos se muestran en el Anexo B.3 destinado al estudio de la influencia del *pH* del medio de cultivo en la fermentación con *H. polymorpha* (Exptos. FS1T3-pH2, FS1T5-pH2, FS2T3-pH2 y FS2T5-pH2).

4.2.4.1 Formación de biomasa

La evaluación de la formación en biomasa durante la fermentación con *H. polymorpha* se llevó a cabo mediante los parámetros característicos del crecimiento celular, es decir, velocidad específica máxima de crecimiento y productividad volumétrica en biomasa. En general, en estos experimentos, se ha observado un periodo exponencial de muy corta duración y por esta razón en algunos cultivos no se ha podido evaluar μ_m durante esta fase, ya que no se pudo caracterizar ésta de forma exhaustiva (Exptos. FS1-Ma, FS1-Mb, FS1T3-pH2, F-S1a, FS1T5-pH2, FS2T3-pH2, F-S2a, FS2T5-pH2 y FS3-M).

Tras establecer el periodo de crecimiento exponencial en las curvas de crecimiento, Fig. 4.37, se determinaron los valores de μ_m mediante ajuste por mínimos cuadrados, a la Ec. 4.15, los datos del logaritmo neperiano de la concentración adimensional de biomasa y tiempo de operación, Tabla 4.29. En esta serie experimental sólo se aprecia una corta fase de latencia, 1,5 h, previa a la fase de crecimiento exponencial, durante la fermentación microaeróbica de L-arabinosa con *H. polymorpha*, a 40°C y $\text{pH}_o = 4,5$ (Expto. F-S2b). En la fermentación microaeróbica de D-xilosa a 40°C y $\text{pH}_o = 4,5$, se observa una corta fase de crecimiento exponencial, 4 h. Del mismo modo, se aprecia una duración de 6 h de fase exponencial, al sustituir el sustrato por D-arabinosa, a 50°C y $\text{pH}_o = 4,5$.

El máximo valor alcanzado de la velocidad específica máxima de crecimiento en esta serie, próximo a $0,18 \text{ h}^{-1}$, corresponde a los procesos de fermentación microaeróbica de D-arabinosa y D-xilosa a 50°C y $\text{pH}_o = 4,5$ (Exptos. FS1-T6b y FS3-T6), Tabla 4.29. Por el contrario, en esta serie experimental se observa que la velocidad específica máxima de crecimiento adquiere un valor mínimo, $0,06 \text{ h}^{-1}$, utilizando D-arabinosa como sustrato a 25°C y $\text{pH}_o = 4,5$ (Expto. FS1-T1).

Se observa que la velocidad específica máxima de crecimiento aumenta con el incremento de la temperatura de fermentación cuando la pentosa utilizada fue D-arabinosa, alcanzándose un valor de μ_m del orden de $0,06$, $0,09$ y $0,15 \text{ h}^{-1}$ cuando la temperatura aumentó de 25, 40 a 50°C, Tabla 4.29 (Exptos. FS1-T1, F-S1b + F-S1c, y FS1-T6a + FS1-T6b). Cabe destacar que, cuando se utilizó D-xilosa como fuente de carbono y energía durante la fermentación microaeróbica con *H. polymorpha* a $\text{pH}_o = 4,5$ y una temperatura de bioproceso de 45 y 50°C, se alcanzó un valor de μ_m similar en ambos casos, $0,18 \text{ h}^{-1}$ (Exptos. F-S3 y FS3-T6). No obstante, cuando el sustrato fue L-arabinosa, se aprecia una disminución de μ_m con el aumento de la temperatura, Tabla 4.29; efectivamente, durante la fermentación microaeróbica de L-arabinosa a $\text{pH}_o = 4,5$ y 40°C se determinó una velocidad específica máxima del orden de $0,11 \text{ h}^{-1}$ (Expto. F-S2b), valor que es superior al alcanzado para μ_m cuando la temperatura de fermentación fue 50°C, $0,08 \text{ h}^{-1}$ (Expto. FS2-T6).

Al igual que en las series experimentales anteriores, se determina que los valores más elevados de μ_m se alcanzan cuando el sustrato es D-xilosa. Este hecho indica que *H. polymorpha* metaboliza de forma más favorable D-xilosa que D o L-arabinosa. Sin embargo, en esta serie no se ha observado diferencias apreciables entre los valores de μ_m calculados para D o L-arabinosa.

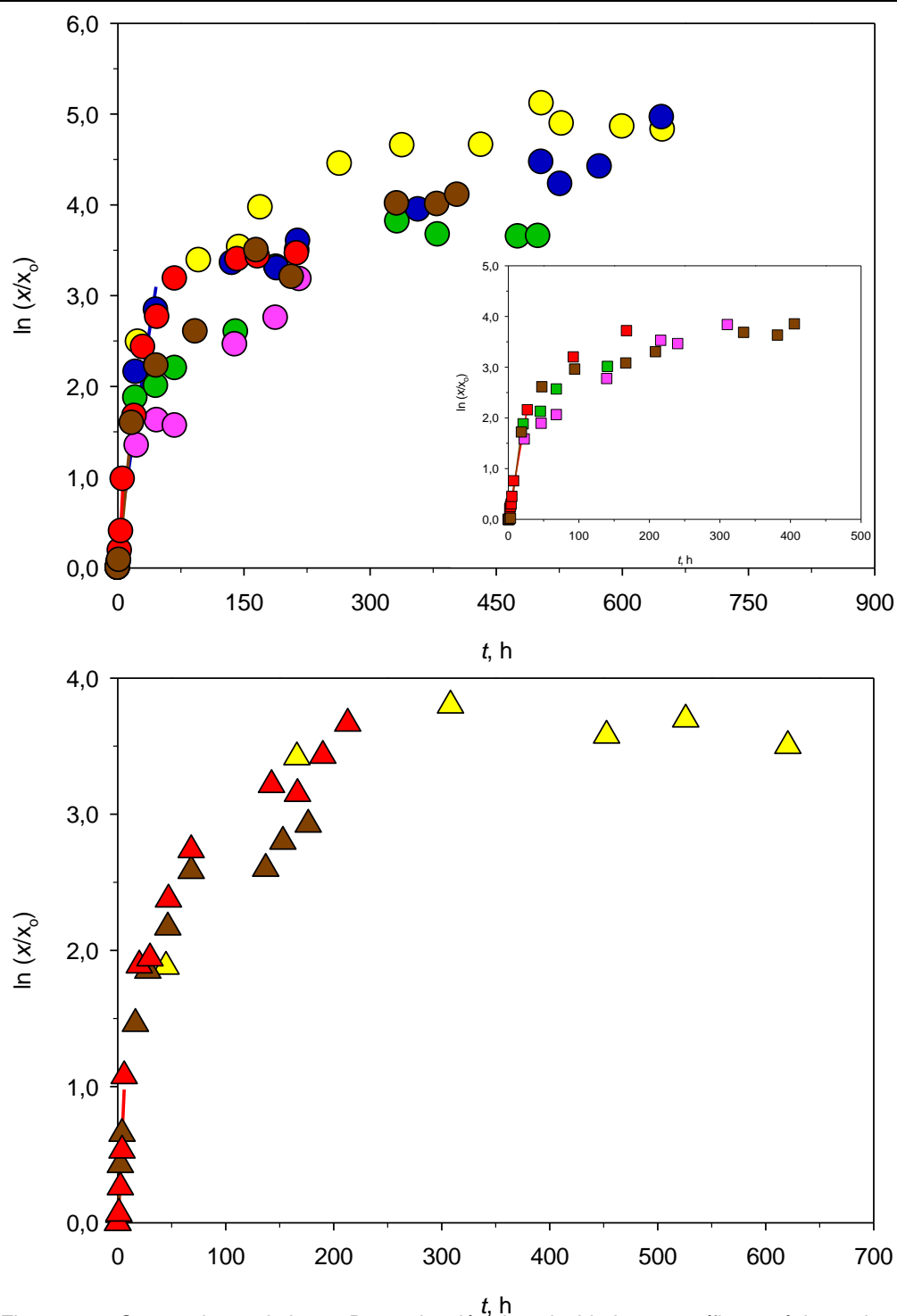


Figura 4.37 Curvas de crecimiento. Determinación de velocidades específicas máximas de crecimiento en los experimentos de fermentación (FS1-T1, FS1-Mb, FS1T3-pH2, F-S1b, FS1T5-pH2, FS1-T6b, FS2T3-pH2, F-S2b, FS2T5-pH2, FS2-T6, FS3-M, F-S3 y FS3-T6), en condiciones de microaeración y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm^{-3} de D-ARA₀ (○), L-ARA₀ (□) y D-XIL₀ (△) y modificando la temperatura de 25 (azul), 30 (amarillo), 35 (verde), 40 (marrón), 45 (rosa) a 50°C (rojo).

Tabla 4.29
 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
 EFECTO DE LA TEMPERATURA

Velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) y productividad volumétrica en biomasa (P_b)
 Condiciones de microaeración y $\text{pH}_0 = 4,5$

Sustrato	T °C	Expto.	μ_m h ⁻¹	r ²	P_b 10 g dm ⁻³ h ⁻¹	r ²
D-arabinosa	25	FS1-T1	0,062	0,900	0,056	0,939
	30	FS1-Ma	—		0,091 ^c	
		FS1-Mb	—			
	35	FS1T3-pH2	—		0,119	0,955
	40	F-S1a	—		0,133 ^b	
		F-S1b		0,085 ^b		
		F-S1c				
	45	FS1T5-pH2	—		0,064	0,968
	50	FS1-T6a		0,151 ^a		0,105 ^a
		FS1-T6b				
L-arabinosa	35	FS2T3-pH2	—		0,160	0,982
	40	F-S2a	—		0,109 ^b	
		F-S2b	0,105 ^b			
	45	FS2T5-pH2	—		0,113	0,975
	50	FS2-T6	0,080	0,993	0,076	0,999
D-xilosa	30	FS3-M	—		0,161 ^c	
	40	F-S3	0,175 ^b	0,972	0,244 ^b	0,994
	50	FS3-T6	0,179	0,954	0,075	0,962

. Valores medios (^a).

Valores calculados anteriormente e indicados en las Tablas 4.10 (^b) y 4.16 (^c).

Durante la revisión bibliográfica realizada al inicio de esta Tesis Doctoral, no se ha encontrado referencias de trabajos centrados en la fermentación de D o L-arabinosa con *H. polymorpha* que determinen velocidades específicas máximas de crecimiento. Por el contrario, sí existen trabajos de investigación que estudian la fermentación con otras levaduras no tradicionales y con D-xilosa como sustrato. En efecto, en la fermentación de D-xilosa pura con *H. polymorpha* a 30°C y $\text{pH}_0 = 4,5$ (Sánchez *et al.*, 1998), se alcanzó un valor de μ_m en torno a 0,43 h⁻¹, velocidad que es considerablemente superior a las determinadas para cualquier temperatura en esta serie experimental (Tabla 4.29). De igual forma, manteniendo el sustrato y las condiciones de operación, pero sustituyendo la levadura por *C. shehatae* (Sánchez *et al.*, 1997), se determinó una velocidad específica máxima de crecimiento de biomasa, 0,33 h⁻¹, superior a las obtenidas en esta investigación (Tabla 4.29).

Por otra parte, durante la fermentación de 25 g dm⁻³ en D-xilosa con *P. tannophilus*, a 30°C y pH₀ = 4,5, partiendo de 4 g dm⁻³ de extracto de levadura (Bravo *et al.*, 1995), la velocidad específica máxima de crecimiento determinada fue también superior, 0,26 h⁻¹, a las obtenidas en esta serie experimental. En estas investigaciones mencionadas se operó con un biorreactor discontinuo, tipo mezcla perfecta, y condiciones de aeración por vórtice (500 rpm). Estas diferencias en los valores de μ_m se pueden justificar considerando las distintas configuraciones del biorreactor que permiten en la investigación previa un mayor nivel de aeración y concentración de oxígeno disuelto; en este trabajo se ha operado usando matraces Erlenmeyer de 50 cm³ (tapados con algodón) y un agitador orbital a 100 rpm. Lógicamente, estas condiciones conducen a un nivel de aeración más pequeño, que puede dar lugar a un nivel de O₂ disuelto tan bajo que constituya un factor limitante del crecimiento.

Durante la fermentación de D-glucosa con *H. polymorpha*, a 45°C y modificando el pH₀ (en el rango de 3,5 a 5,5), se alcanzó un valor para μ_m del orden de 0,55 h⁻¹ cuando el pH₀ estuvo próximo a 4,5 (Escalante *et al.*, 1990a). Esta velocidad es de nuevo superior a las alcanzadas en esta serie experimental (Tabla 4.29). En dicha investigación se operó utilizando matraces Erlenmeyer agitados (100 rpm), conteniendo 100 cm³ de medio de cultivo de *H. polymorpha* con 1% (p/V) de hexosa. Al mismo tiempo, estos autores llevaron a cabo un estudio del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de la levadura. Para ello se realizó una serie de fermentaciones con medio de cultivo al 5% en D-glucosa usando *H. polymorpha* a diferentes temperaturas (40, 45, 48 y 50°C), pH₀ = 4,8, en un biorreactor con una velocidad de agitación de 500 rpm, y un volumen de trabajo de 1,5 dm³. A medida que la temperatura de operación se incrementaba, el valor obtenido de μ_m fue disminuyendo. En efecto, a 45°C el valor determinado de μ_m , 0,5 h⁻¹, fue inferior al obtenido a 40°C, que fue próximo a 0,6 h⁻¹. Ambos valores de μ_m son superiores a los obtenidos en esta serie experimental (Tabla 4.29).

En un estudio de investigación sobre la influencia de la temperatura en la fermentación de D-xilosa por *P. tannophilus* para producir etanol y xilitol (Sánchez *et al.*, 2004), a partir de 25 g dm⁻³ de D-xilosa, pH₀ = 4,5, y temperaturas en el rango de 10 – 40°C, se determinó un valor para μ_m en torno a 0,26 h⁻¹ cuando la temperatura de fermentación fue 30 y 35°C. Al aumentar la temperatura de fermentación, 37°C, se alcanzó una velocidad específica máxima del orden de 0,15 h⁻¹, valor que es próximo al obtenido en esta serie experimental, 0,18 h⁻¹, utilizando D-xilosa a 40°C y pH₀ = 4,5 y con *H. polymorpha* en el proceso de fermentación (Expto. F-S3), Tabla 4.29.

Una vez representados los datos de x vs t , Fig. 4.38, se obtienen los valores de P_b por ajuste por mínimos cuadrados de los datos de concentración de biomasa y tiempo de proceso a la Ec. 4.16, Tabla 4.29.

Los valores obtenidos de P_b no muestran ninguna tendencia definida con respecto al aumento de la temperatura de fermentación, Tabla 4.29. Parcialmente, este hecho podría justificarse considerando que en la fermentación con *H. polymorpha* se han utilizado matraces Erlenmeyer de 50 cm³ ubicados de forma aleatoria dentro de un agitador orbital (100 rpm). En efecto, fijado un pH inicial constante dentro del agitador y variando la temperatura de fermentación, posiciones no similares de los matraces Erlenmeyer dentro del agitador, podrían generar ligeras variaciones de las condiciones de operación (T y aeración) y por tanto, evoluciones diferentes en lo que se refiere a formación de biomasa.

Durante la fermentación de D-arabinosa con *H. polymorpha* a $pH_0 = 4,5$, la productividad volumétrica aumenta (0,006 a 0,013 g dm⁻³ h⁻¹) con el incremento de la temperatura de 25 a 40°C, Tabla 4.29. Sin embargo, al aumentar a temperaturas superiores (45 y 50°C), P_b disminuye, 0,006 y 0,011 h⁻¹. Por otro lado, cuando se sustituye la pentosa por L-arabinosa, los valores obtenidos de P_b disminuyen (0,016 a 0,008 g dm⁻³ h⁻¹) al aumentar la temperatura desde 35 a 50°C. Finalmente, utilizando D-xilosa como fuente de carbono y energía, los valores determinados de P_b no manifiestan una tendencia definida, obteniéndose un valor máximo, 0,024 g dm⁻³ h⁻¹, cuando la temperatura de fermentación fue 40°C, Tabla 4.29.

El máximo valor de productividad en biomasa obtenido en esta serie, 0,024 g dm⁻³ h⁻¹, fue durante la fermentación microaeróbica de D-xilosa con *H. polymorpha*, a 40°C y $pH_0 = 4,5$ (Expto. F-S3). Valores de P_b cercanos a este valor máximo, se alcanzaron utilizando D y L-arabinosa como sustrato, a $pH_0 = 4,5$ y una temperatura de bioproceso de 50 y 35°C, respectivamente (Exptos. FS1-T6b y FS2T3-pH2), Tabla 4.29. Por otra parte, y de forma general, al igual que sucede con la velocidad específica máxima de crecimiento, los valores de P_b fueron ligeramente superiores utilizando D-xilosa como fuente de carbono y energía frente a D y L-arabinosa.

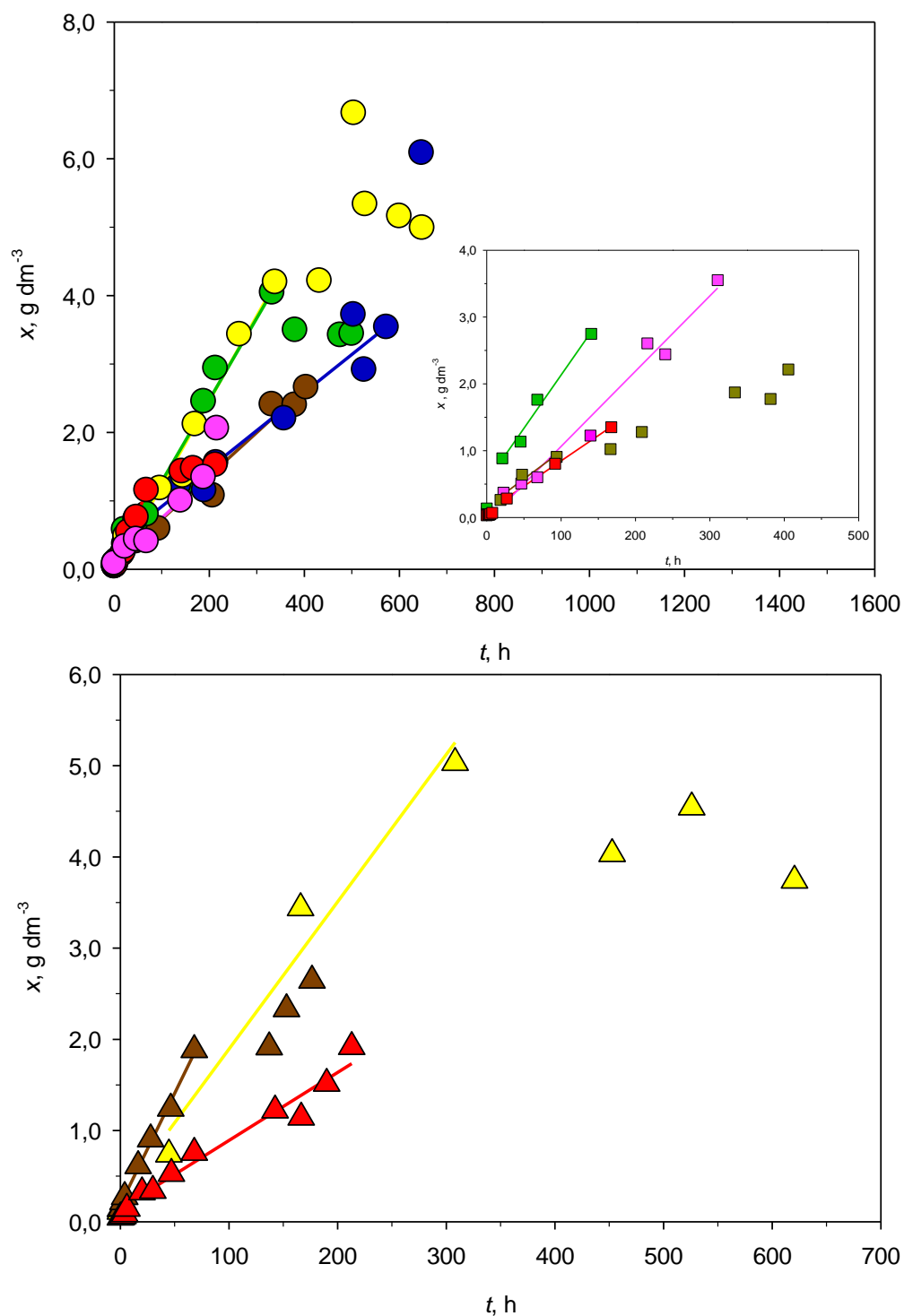


Figura 4.38 Determinación de la productividad volumétrica en biomasa, según la Ec. 4.16, en los experimentos de fermentación (FS1-T1, FS1-Mb, FS1T3-pH2, F-S1b, FS1T5-pH2, FS1-T6b, FS2T3-pH2, F-S2b, FS2T5-pH2, FS2-T6, FS3-M, F-S3 y FS3-T6), en condiciones de microaeración y $\text{pH}_0 = 4,5$, con 25 g dm^{-3} de D-ARA_o (○), L-ARA_o (□) y D-XIL_o (△) y modificando la temperatura de 25 (azul), 30 (amarillo), 35 (verde), 40 (marrón), 45 (rosa) a 50°C (rojo).

Los valores de P_b obtenidos son inferiores a los determinados en otros trabajos que también utilizan levaduras no tradicionales. Así durante la fermentación de D-xilosa con *C. shehatae* a 30°C y $pH_0 = 4,5$ (Sánchez *et al.*, 1997), se alcanzó una productividad volumétrica en biomasa, 0,024 g dm⁻³ h⁻¹, superior a la obtenida en esta serie experimental, 0,016 g dm⁻³ h⁻¹, bajo las mismas condiciones de operación (Expto. FS3-M), Tabla 4.29. De igual forma, a partir de la misma concentración inicial en D-xilosa y manteniendo las condiciones de operación (30°C y $pH_0 = 4,5$), se estudió la fermentación con *P. tannophilus*, partiendo de 4 g dm⁻³ de extracto de levadura (Bravo *et al.*, 1995), obteniéndose un valor de P_b , también superior si se compara con el alcanzado en este estudio, 0,023 g dm⁻³ h⁻¹. En estas investigaciones se operó con un biorreactor discontinuo, tipo mezcla perfecta, y condiciones de aeración por vórtice (500 rpm) mientras que en este trabajo se ha operado usando matraces Erlenmeyer de 50 cm³ (tapados con algodón) y un agitador orbital a 100 rpm.

En otro estudio de investigación sobre la influencia de la temperatura en la fermentación de D-xilosa por *P. tannophilus* para producir etanol y xilitol (Sánchez *et al.*, 2004), a partir de 25 g dm⁻³ de D-xilosa, $pH_0 = 4,5$, y temperaturas en el rango de 10 a 40°C, se determinó un valor de P_b próximo a 0,02 g dm⁻³ h⁻¹ cuando la temperatura de fermentación fue 40°C. Este valor es del mismo orden al determinado durante la fermentación microaeróbica de D-xilosa con *H. polymorpha* a 40°C y $pH_0 = 4,5$ (Expto. F-S3), Tabla 4.29. En cierta medida, al igual que en el trabajo de *P. tannophilus*, se observa que el período de crecimiento lineal comienza antes a medida que aumenta la temperatura; esta tendencia general se pone claramente de manifiesto cuando el sustrato utilizado por *H. polymorpha* es D-arabinosa. Este comportamiento puede explicarse por el hecho de que la solubilidad del oxígeno en el cultivo disminuye concomitantemente con un aumento de la temperatura. La duración de la fase de crecimiento lineal también disminuye con respecto a la temperatura: a 25°C dura 527,5 h, mientras que a 50°C no dura más de 160 h, lo que podría esperarse si tenemos en cuenta que el coeficiente de difusión efectivo de un gas (en este casos oxígeno) en el medio líquido, aumenta exponencialmente con la temperatura (Bennett y Myers, 1973).

Por otra parte, en esta serie experimental, cabe destacar que las máximas concentraciones de biomasa, 6,09 y 6,67 g dm⁻³, se alcanzaron transcurridas 815 y 504 h de cultivo en los procesos de fermentación de D-arabinosa a las más bajas temperaturas (25 y 30°C), en condiciones microaeróbicas y $pH_0 = 4,5$, existiendo todavía una concentración final de ART en el medio del orden de 2,54 g dm⁻³ y siendo 4,3 el valor del *pH* (Expto FS1-T1 y Expto. FS1-Mb, Anexos B.4 y B.2). En general, para los tres monosacáridos, se

observa que la formación de biomasa en los tiempos finales del cultivo disminuye cuando se incrementa la temperatura del experimento. Este comportamiento es fácilmente justificable si se considera que cuando se aumenta la temperatura la solubilidad del oxígeno en el medio líquido disminuye; es decir, cuando se aumenta la temperatura se avanza desde condiciones semiaeróbicas a condiciones anaeróbicas.

Finalmente, en cuanto a la evolución del *pH* durante el bioproceso, en algunos experimentos de esta serie se observa un aumento del valor inicial (4,5). En efecto, en la fermentación microaeróbica de D-arabinosa a 25°C y $pH_0 = 4,5$, el *pH* alcanzó un valor máximo de 6,8 tras 214,5 h de cultivo (Expto. FS1-T1, Tabla B.29 del Anexo B.4). Cuando se utilizó L-arabinosa como sustrato a 40°C y $pH_0 = 4,5$, valores de *pH* próximos a 7,0 se alcanzaron una vez transcurridas 167 h (Expto. F-S2b). Durante la fermentación de D-xilosa a 30°C y $pH_0 = 4,5$, tras 452,8 h de cultivo se alcanzó un *pH* de 6,4, no variando significativamente hasta finalizar el bioproceso (Expto. FS3-M, Tabla B.11, Anexo B.2).

4.2.4.2 Consumo de sustrato

Para evaluar el consumo de azúcares se determinó $Y_{x/ART}^G$ y q_{ART} . Una vez representados los valores de $(x-x_0)$ vs (ART_0-ART) , Fig. 4.39, se obtuvo el rendimiento global en biomasa según la Ec. 4.17, Tabla 4.30.

En general, se observa que a *pH* inicial constante, independientemente de la pentosa utilizada en la fermentación, el rendimiento global en biomasa disminuye con el aumento de la temperatura de bioproceso, Tabla 4.30. En efecto, durante la fermentación microaeróbica de L-arabinosa a *pH* inicial constante (4,5) y temperaturas en el rango de 35 a 50°C, se alcanzaron valores de $Y_{x/ART}^G$ desde 0,30 a 0,13 g g⁻¹. Esta tendencia de $Y_{x/ART}^G$ ya se puso de manifiesto en la sección de influencia del *pH* del medio de cultivo (Apartado 4.2.3). Por otro lado, a *pH* inicial constante (4,5) y en las mismas condiciones de temperatura de operación, en general, se alcanzaron valores de $Y_{x/ART}^G$ superiores cuando L-arabinosa fue utilizada como fuente de carbono y energía, tal y como ya se indicó en la serie de naturaleza del sustrato (Apartado 4.2.1).

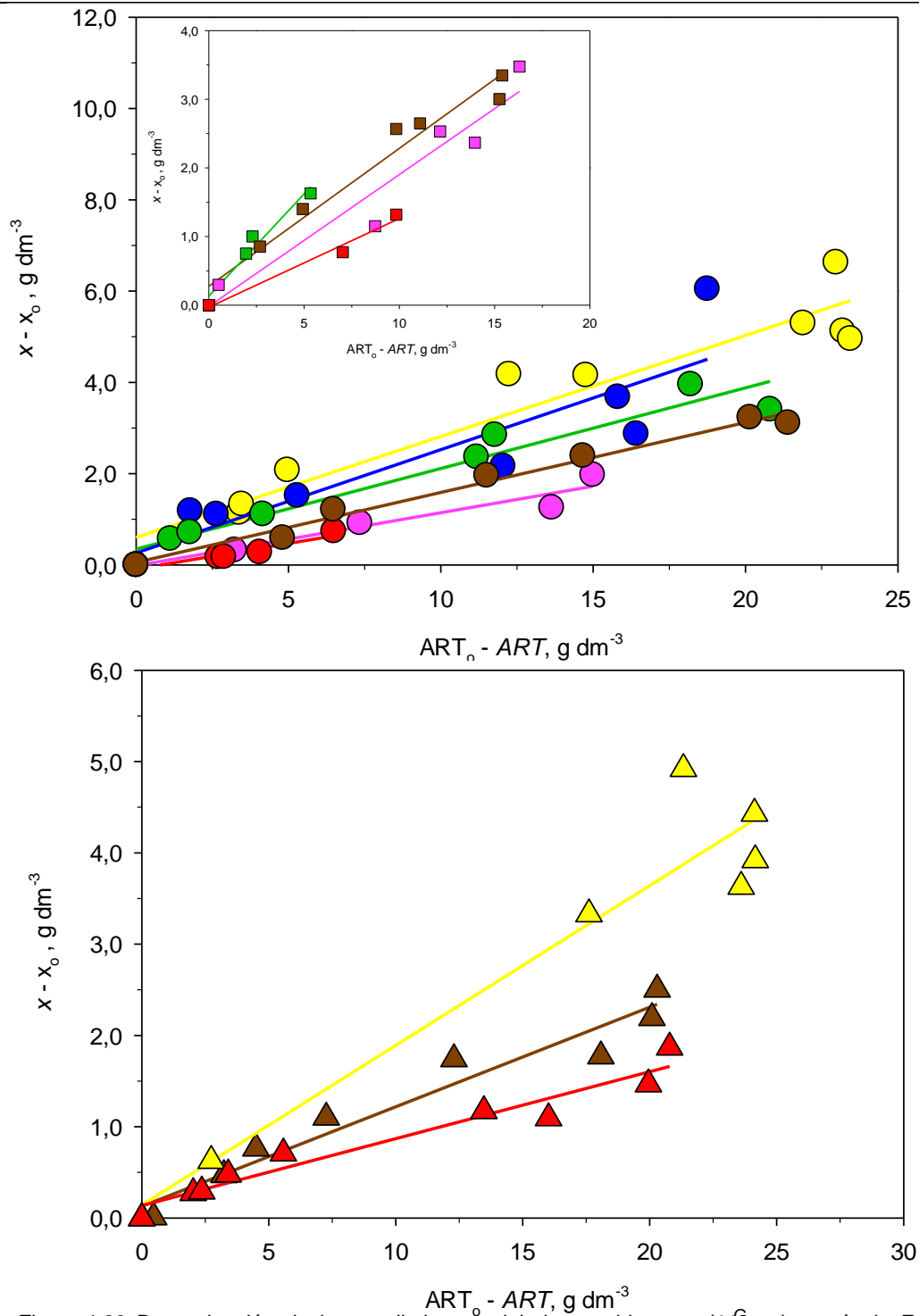


Figura 4.39 Determinación de los rendimientos globales en biomasa ($Y_{X/ART}^G$), según la Ec. 4.17, en la fermentación con *H. polymorpha* (Exptos. FS1-T1, FS1-Mb, FS1T3-pH2, F-S1a, FS1T5-pH2, FS1-T6a, FS2T3-pH2, F-S2a, FS2T5-pH2, FS2-T6, FS3-M, F-S3 y FS3-T6), en condiciones de microaeración y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm^{-3} de D-ARA₀ (○), L-ARA₀ (□) y D-XIL₀ (△), modificando la temperatura de 25 (azul), 30 (amarillo), 35 (verde), 40 (marrón), 45 (rosa) a 50°C (rojo).

Tabla 4.30
FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
EFECTO DE LA TEMPERATURA

Rendimientos globales en biomasa ($Y_{X/ART}^G$)
Condiciones de microaeración y $pH_0 = 4,5$

Sustrato	T °C	Expto.	$Y_{X/ART}^G$ g g ⁻¹	r ²
D-arabinosa	25	FS1-T1	0,226	0,811
	30	FS1-Ma FS1-Mb	0,200 ^c	
	35	FS1T3-pH2	0,177 ^d	0,944
	40	F-S1a F-S1b	0,161 ^b	
	45	FS1T5-pH2	0,116 ^d	0,931
	50	FS1-T6a FS1-T6b	0,169 ^a	
L-arabinosa	35	FS2T3-pH2	0,298 ^d	0,954
	40	F-S2a F-S2b	0,193 ^b	
	45	FS2T5-pH2	0,192 ^d	0,939
	50	FS2-T6	0,129	
D-xilosa	30	FS3-M	0,175 ^c	0,920
	40	F-S3	0,109 ^b	0,953
	50	FS3-T6	0,073	0,947

Valores medios (^a).

Valores calculados anteriormente e indicados en las Tablas 4.11 (^b), 4.17 (^c) y 4.23 (^d).

En estudios previos del Grupo de Investigación Bioprocesos (Sánchez *et al.*, 1998), durante la fermentación de 25 g dm⁻³ de D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C y $pH_0 = 4,5$, y en condiciones microaeróbicas conseguidas sólo a partir de vórtice de agitación, se obtuvo un valor de $Y_{X/ART}^G$, 0,15 g g⁻¹, ligeramente inferior al alcanzado en esta serie. Por otro parte, en la fermentación de 25 g dm⁻³ de D-xilosa con *C. shehatae* a 30°C, y $pH_0 = 4,5$, se alcanzaron valores de $Y_{X/ART}^G$, 0,036 g g⁻¹, inferiores a los obtenidas en esta serie experimental (Sánchez *et al.*, 1997). En ambos casos se operó con un biorreactor discontinuo, tipo mezcla perfecta, y condiciones de aeración (500 rpm).

Por otro lado, Sánchez *et al.* (2004), en la fermentación de 25 g dm⁻³ de D-xilosa con *P. tannophilus*, $pH = 4,5$, y temperaturas en el rango de 10 – 37°C, obtuvieron un valor de

$Y_{X/ART}^G$ más próximo al obtenido en esta serie, del orden de 0,13 y 0,18 g g⁻¹, cuando la temperatura de operación fue 35 y 37°C, respectivamente.

Para determinar la velocidad específica de consumo de sustrato, se aplicó inicialmente el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos, utilizando la Ec. 4.19. Tras linealizar esta ecuación, Ec. 4.20, y mediante ajustes por mínimos cuadrados de $\ln[\ln(ART_0/ART)]$ vs $\ln t$, se obtuvieron los parámetros α y β en cada uno de los experimentos, Fig. 4.40.

En esta serie experimental (Tablas B.1 a B.6, Anexo B.1; Tablas B.7, B.8 y B.11, Anexo B.2; Tablas B.14, B.17, B.24 y B.27, Anexo B.3; Tablas B.29 a B.33, Anexo B.4), se observa cómo el descenso de la concentración de sustrato en el medio fue más rápida desde el inicio del cultivo para después disminuir lentamente, Fig. 4.41. De nuevo se observan sólo dos etapas de consumo de sustrato, aunque ésta no es la tendencia general cuando la concentración de inóculo es pequeña. Este comportamiento, en relación al consumo rápido de los azúcares desde $t = 0$ h, se justifica considerando que se ha usado una alta concentración de inóculo, y ello conduce a que no se aprecie la parte horizontal inicial de la curva de consumo de sustrato. A partir de α y β , se comprobó la bondad del ajuste recalculando los valores de ART mediante la ecuación Ec. 4.19, observándose una reproducción satisfactoria en todo el intervalo de tiempo, Fig. 4.41 (línea continua).

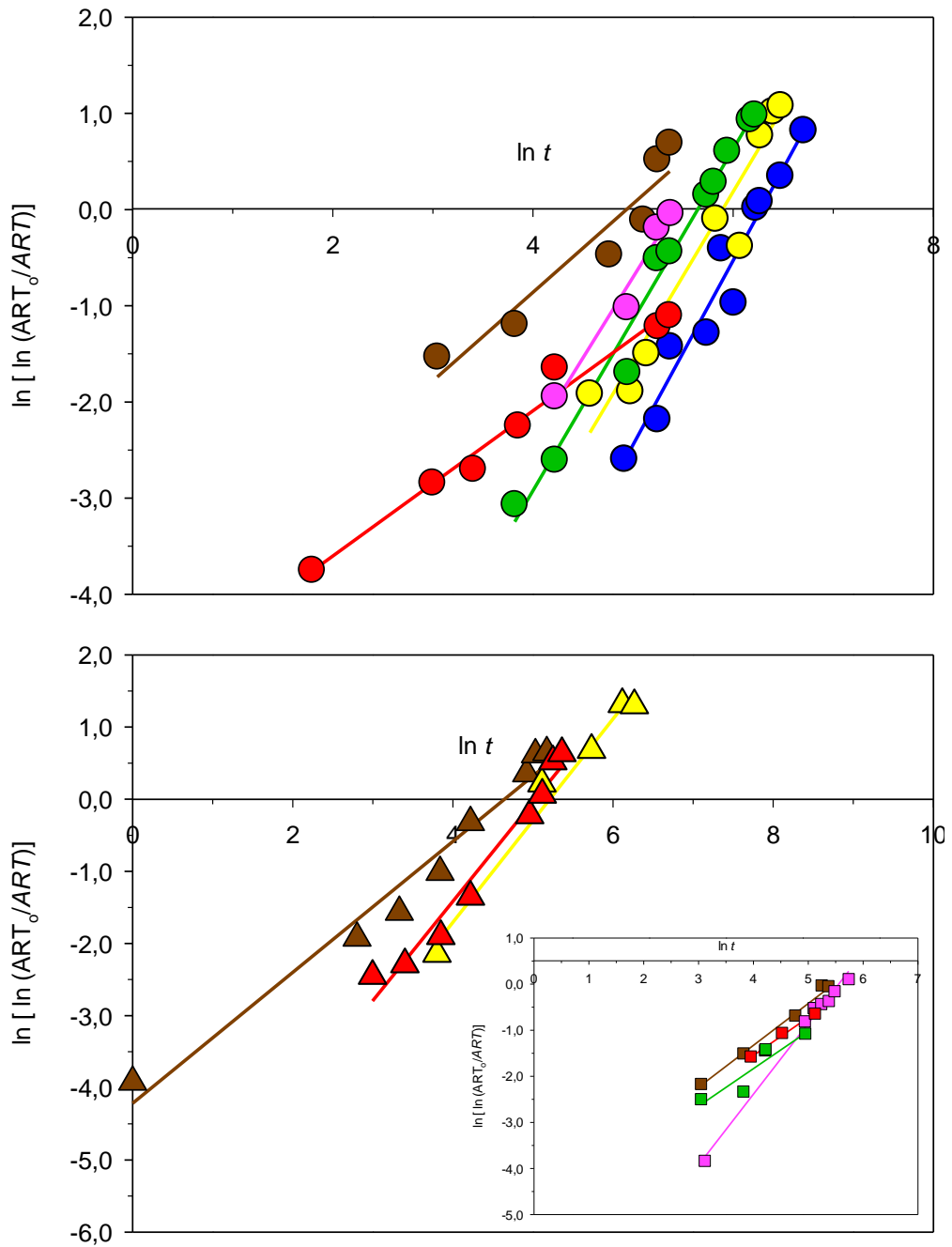


Figura 4.40 Ajuste a la Ec. 4.20 para la determinación de la velocidad específica de consumo de sustrato (q_{ART}^D) de los resultados en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1-T1, FS1-Mb, FS1T3-pH2, F-S1a, FS1T5-pH2, FS1-T6b, FS2T3-pH2, FS2a, FS2T5-pH2, FS2-T6, FS3-M, F-S3 y FS3-T6), en condiciones de microaeración y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm^{-3} de D-ARA₀ (○), L-ARA₀ (□) y D-XIL₀ (△) y modificando la temperatura de 25 (azul), 30 (amarillo), 35 (verde), 40 (marrón), 45 (rosa) a 50°C (rojo).

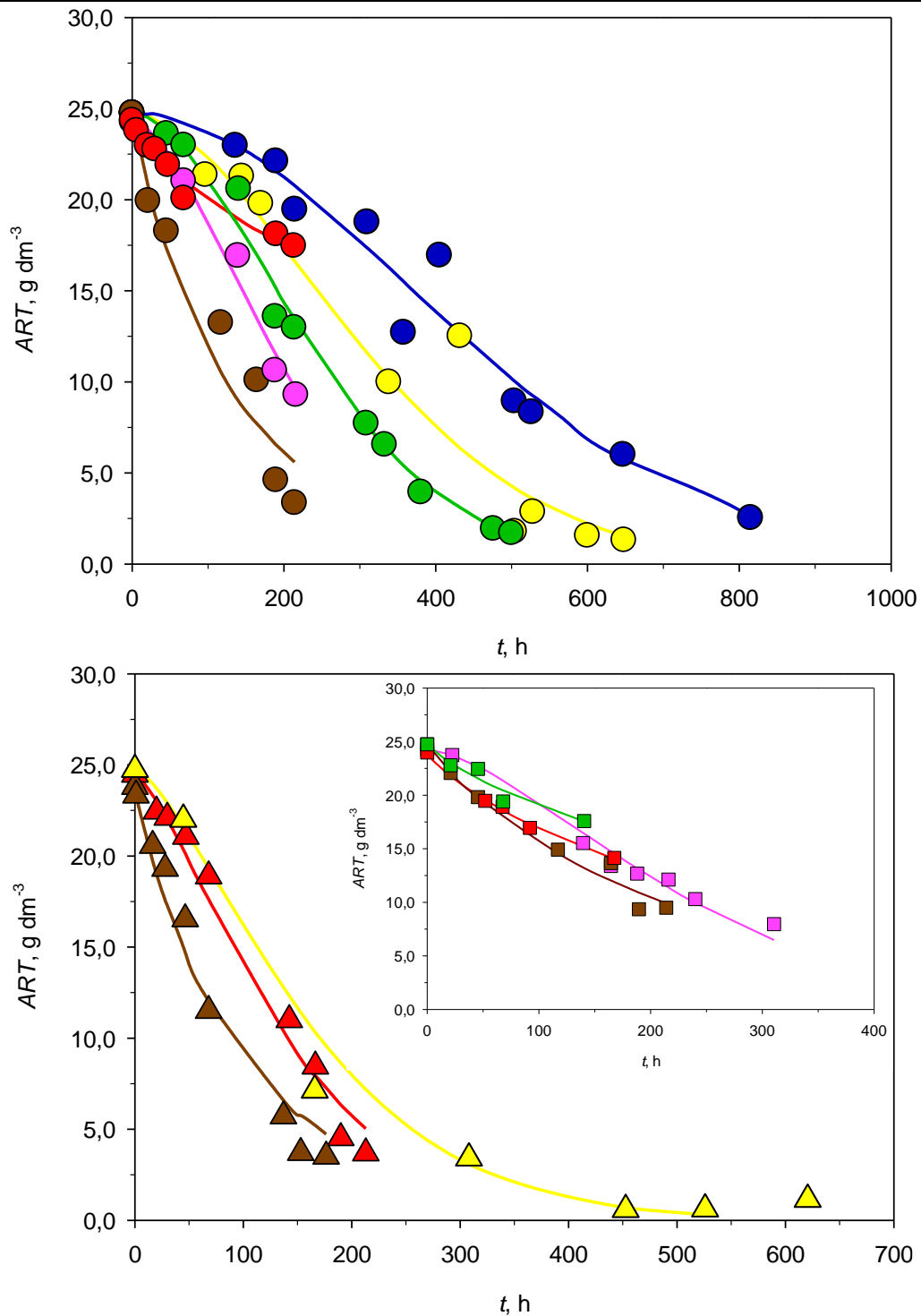


Figura 4.41 Consumo de sustrato en los experimentos de fermentación FS1-T1, FS1-Mb, FS1T3-pH2, F-S1a, FS1T5-pH2, FS1-T6b, FS2T3-pH2, FS2a, FS2T5-pH2, FS2-T6, FS3-M, F-S3 y FS3-T6, en condiciones de microaeración y $\text{pH}_0 = 4,5$, con 25 g dm^{-3} de D-ARA_o (○), L-ARA_o (□) y D-XIL_o (△) y modificando la temperatura de 25 (azul), 30 (amarillo), 35 (verde), 40 (marrón), 45 (rosa) a 50°C (rojo). La línea continua reproduce la Ec. 4.19 de los mismos cultivos.

A partir de la Ec. 4.21, y con los parámetros α y β , se determinó la velocidad específica de consumo de sustrato en función del tiempo (q_{ART}^D), Tablas 4.31 a 4.33.

Tabla 4.31
FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
EFECTO DE LA TEMPERATURA

Velocidades específicas de consumo de D-arabinosa (q_{ART}^D y q_{ART})
Condiciones de microaeración, $pH_0 = 4,5$ y $D-ARA_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$

T °C	Expto.	Fase	t , h	q_{ART}^D $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$	q_{ART} $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
25	FS1-T1	LIN	150,0	0,021	0,021
		LIN	200,0	0,021	0,017
		LIN	300,0	0,019	0,012
		LIN	400,0	0,015	0,010
		EST	647,0	0,004	—
30	FS1-Ma	LIN	50,0	0,092 ^b	0,046 ^b
		LIN	150,0	0,024 ^b	0,025 ^b
	FS1-Mb	LIN	200,0	0,016 ^b	0,021 ^b
		LIN	50,0	0,043 ^b	0,092 ^b
		LIN	150,0	0,027 ^b	0,030 ^b
35	FS1T3-pH2	LIN	200,0	0,022 ^b	0,023 ^b
		LIN	50,0	0,057 ^c	0,099 ^c
		LIN	100,0	0,046 ^c	0,053 ^c
	F-S1a	EST	380,5	0,010 ^c	—
		LIN	50,0	0,104 ^a	0,077 ^a
40	F-S1b	LIN	150,0	0,022 ^a	0,035 ^a
		EXP	10,0	1,048 ^a	0,567 ^a
	F-S1b	LIN	50,0	0,130 ^a	0,091 ^a
		LIN	150,0	0,027 ^a	0,036 ^a
45	FS1T5-pH2	LIN	50,0	0,139 ^c	0,128 ^c
		LIN	100,0	0,107 ^c	0,074 ^c
		LIN	150,0	0,077 ^c	0,052 ^c
		EST	216,0	0,034 ^c	—
50	FS1-T6a	LIN	52,0	0,197	0,179
		LIN	100,0	0,081	0,087
		LIN	150,0	0,048	0,058
	FS1-T6b	EXP	6,0	0,550	0,817
		LIN	50,0	0,045	0,090
		EST	142,5	0,018	—

Valores calculados anteriormente e indicados en las Tablas 4.12 ^(a), 4.18 ^(b), y 4.24 ^(c).

Tabla 4.32
FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
EFECTO DE LA TEMPERATURA

Velocidades específicas de consumo de L-arabinosa (q_{ART}^D y q_{ART})
Condiciones de microaeración, $pH_0 = 4,5$ y $L-ARA_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$

T °C	Expto.	Fase	t , h	q_{ART}^D $\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$	q_{ART} $\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$
35	FS2T3-pH2	LIN	50,0	0,039 ^b	0,040 ^b
		LIN	100,0	0,019 ^b	0,025 ^b
40	F-S2a	LIN	50,0	0,059 ^a	0,046 ^a
		LIN	150,0	0,018 ^a	0,024 ^a
	EXP	10,0	0,887 ^a	0,569 ^a	
	F-S2b	LIN	50,0	0,073 ^a	0,078 ^a
EST		166,5	0,021 ^a	—	
45	FS2T5-pH2	LIN	50,0	0,110 ^b	0,117 ^b
		LIN	100,0	0,064 ^b	0,055 ^b
		LIN	150,0	0,043 ^b	0,036 ^b
50	FS2-T6	LIN	52,0	0,131	0,121
		LIN	100,0	0,058	0,069
		LIN	150,0	0,032	0,048

Valores calculados anteriormente e indicados en las Tablas 4.12 ^(a) y 4.25 ^(b).

Tabla 4.33
FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
EFECTO DE LA TEMPERATURA

Velocidades específicas de consumo de D-xilosa (q_{ART}^D y q_{ART})
Condiciones de microaeración, $pH_0 = 4,5$ y $D-XIL_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$

T °C	Expto.	Fase	t , h	q_{ART}^D $\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$	q_{ART} $\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$
30	FS3-M	LIN	50,0	0,088 ^b	0,085 ^b
		LIN	150,0	0,031 ^b	0,034 ^b
		LIN	200,0	0,018 ^b	0,026 ^b
40	F-S3	EXP	2,0	1,508 ^a	1,602 ^a
		LIN	10,0	0,530 ^a	0,518 ^a
		LIN	50,0	0,095 ^a	0,159 ^a
		EST	153,0	0,021 ^a	—
50	FS3-T6	LIN	50,0	0,224	0,196
		LIN	100,0	0,120	0,114
		LIN	150,0	0,065	0,080

Valores calculados anteriormente e indicados en las Tablas 4.12 ^(a) y 4.18 ^(b).

Independientemente de la pentosa utilizada durante la fermentación con *H. polymorpha*, a pH inicial constante (4,5) y en cada una de las condiciones de temperaturas estudiadas, se observa un descenso del valor de q_{ART}^D en el transcurso del cultivo, Tablas 4.31 a 4.33.

En general, en los tres monosacáridos utilizados en la fermentación, se observó un ligero aumento del valor de la velocidad específica de consumo de sustrato con el incremento de la temperatura del bioproceso transcurrido el mismo tiempo de cultivo. Efectivamente, en la serie de fermentaciones microaeróbicas de 25 g dm⁻³ de D-arabinosa con *H. polymorpha*, pH₀ = 4,5 y aumentando la temperatura en un rango de 30 – 50°C, el valor de q_{ART}^D aumenta tras 50 h de cultivo, desde 0,092 a 0,197 g g⁻¹ h⁻¹, respectivamente, Tabla 4.31.

De igual forma, usando L-arabinosa, en un rango de temperatura de operación de 35 – 50°C, el valor de q_{ART}^D aumentó desde 0,039 a 0,131 g g⁻¹ h⁻¹ tras 50 y 52 h de cultivo, respectivamente, Tabla 4.32. Utilizando D-xilosa como fuente de carbono y energía, se observó la misma tendencia de q_{ART}^D , Tabla 4.33.

No obstante, cabe destacar que, a pH₀ constante (4,5), e independientemente del sustrato y condiciones de temperatura de operación, los valores de q_{ART}^D tienden a aproximarse a medida que avanza el tiempo de cultivo, Fig. 4.42, comportamiento fácilmente justificable si se considera que estamos en la fase final de consumo de sustrato.

Estos valores de q_{ART}^D (Tablas 4.31 a 4.33) son inferiores a los obtenidos en investigaciones anteriores realizadas por este Grupo de Investigación utilizando biorreactores discontinuos, tipo mezcla perfecta, con un volumen de cultivo de 500 cm³ y 500 rpm. Concretamente, en la fermentación microaeróbica de 25 g dm⁻³ de D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C y pH₀ = 4,5, los valores determinados para q_{ART}^D fueron del orden de 0,11 y 0,09 g g⁻¹ h⁻¹, tras 75 y 100 h de cultivo, respectivamente, una vez que la fase exponencial hubo terminado (Sánchez *et al.*, 1998). De igual forma, manteniendo las mismas condiciones de operación así como el sustrato, durante la fermentación con *C. shehatae*, se determinó un valor para q_{ART}^D en torno a 0,8 g g⁻¹ h⁻¹ tras 40 h de bioproceso (Sánchez *et al.*, 1997).

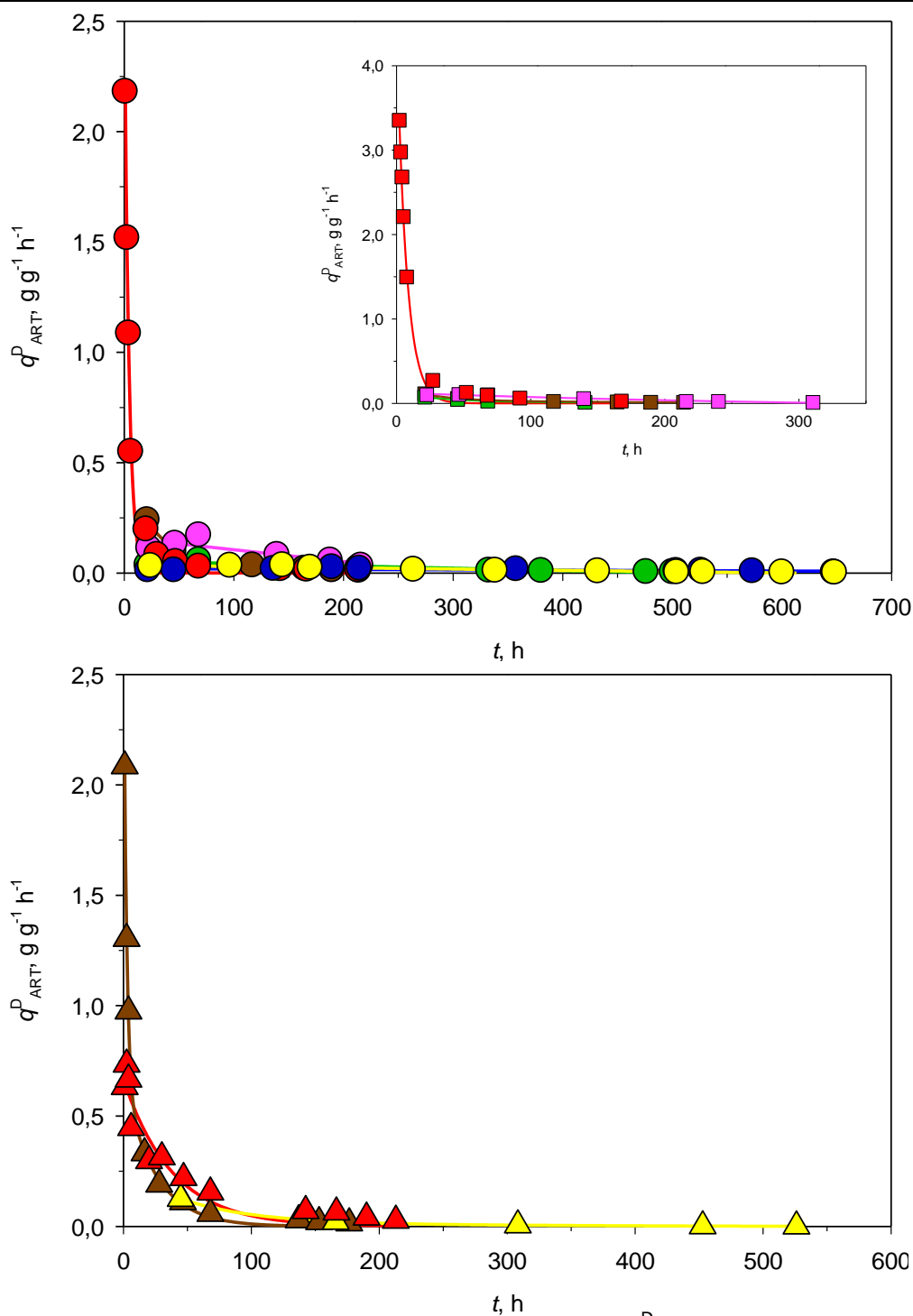


Figura 4.42 Velocidades específicas de consumo de sustrato (q_{ART}^D) en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1-T1, FS1-Mb, FS1T3-pH2, F-S1a, FS1T5-pH2, FS1-T6b, FS2T3-pH2, FS2a, FS2T5-pH2, FS2-T6, FS3-M, F-S3 y FS3-T6), en condiciones de microaeración y $pH_0 = 4,5$, con $25 g dm^{-3}$ de D-ARA₀ (○), L-ARA₀ (□) y D-XIL₀ (△) y modificando la temperatura de 25 (azul), 30 (amarillo), 35 (verde), 40 (marrón), 45 (rosa) a 50°C (rojo).

Cuando se estudió la fermentación de D-xilosa con *P. tannophilus*, a 30°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, los valores determinados de $q_{\text{ART}}^{\text{D}}$ fueron del orden 0,29 y 0,18 $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ tras 50 y 75 h de cultivo (Bravo *et al.*, 1995). Por otro lado, Sánchez *et al.* (2004), en la fermentación de 25 g dm^{-3} de D-xilosa con *P. tannophilus*, $\text{pH} = 4,5$, y temperaturas en el rango de 10 – 37°C, $q_{\text{ART}}^{\text{D}}$ observaron la misma tendencia tras las mismas horas de proceso.

La velocidad específica de consumo de sustrato (q_{ART}) se calculó mediante el método integral de tratamiento de datos cinéticos, a partir de la Ec. 4.22, considerando que $Y_{\text{X/ART}} = Y_{\text{X/ART}}^{\text{G}}$. En general, se observa una aceptable concordancia entre los valores de las velocidades específicas de consumo de sustrato evaluados por los métodos diferencial ($q_{\text{ART}}^{\text{D}}$) e integral (q_{ART}), Tablas 4.31 a 4.33. Se detecta mayor discrepancia en los valores determinados en la fase exponencial.

Al igual que en las series anteriores, estos datos, indican, que desde el punto de vista de formación de bioproductos, *H. polymorpha* es más eficiente cuando utiliza D-xilosa frente a D-arabinosa o L-arabinosa, pues consume más sustrato y forma menos concentración de biomasa.

4.2.4.3 Formación de bioproductos

En esta serie experimental los bioproductos mayoritarios formados durante la fermentación de D-arabinosa y L-arabinosa con *H. polymorpha* fueron arabitol, y en el caso de D-xilosa, xilitol. La máxima concentración determinada en etanol no supera los 0,25 g dm^{-3} , utilizando D-xilosa como sustrato, en condiciones de microaeración, 30°C y 4,5 de pH inicial (Tabla B.11 del Anexo B.2), no considerándose un bioproducto de formación mayoritaria. Por otro parte, la máxima concentración alcanzada de ácido acético fue del orden de 0,5 g dm^{-3} (Tabla B.7, Anexo B.2).

En lo que se refiere a la formación de arabitol, se alcanzó una concentración máxima de 2,25 g dm^{-3} , en la fermentación microaeróbica de D-arabinosa con *H. polymorpha*, a 35°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, tras 380,5 h (Expto. FS1T3-pH2, Anexo B.3). Cuando se modificó la pentosa por L-arabinosa, la máxima concentración en arabitol no supera los 0,65 g dm^{-3} tras 117,0 h a 40°C, $\text{pH}_0 = 4,5$ y en condiciones microaeróbicas (Expto F-S1a, Anexo B.1). Finalmente, durante la fermentación de D-xilosa con *H. polymorpha*, se alcanzó una concentración

máxima en xilitol del orden de $3,57 \text{ g dm}^{-3}$ tras 176,5 h, cuando la temperatura de operación fue 40°C , $\text{pH}_0 = 4,5$ y en condiciones de microaeración (Expto. F-S3, Anexo B.1).

Con el fin de estudiar la formación de los bioproductos se determinaron los rendimientos instantáneos en arabitol y xilitol, así como las velocidades específicas de formación de arabitol y xilitol.

➤ Velocidad específica de formación de arabitol

Para la determinación de este parámetro se aplicó el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos (q_{Ar}^D) a los datos experimentales de concentración de arabitol, obteniéndose el valor de la productividad volumétrica en arabitol, Fig. 4.43, y a partir de ésta se determinó q_{Ar}^D según la Ec. 4.24 (Tablas 4.34 y 4.35).

En general, utilizando D-arabinosa como fuente de carbono y energía, durante la fermentación microaeróbica, en condiciones de pH inicial constante, no se aprecia una tendencia definida en cuanto a la productividad volumétrica en arabitol. No obstante, aumentando la temperatura en un rango de $25 - 35^\circ\text{C}$, el valor de dAr/dt se incrementó desde $0,7$ a $10,1 \text{ mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (Exptos. FS1-T1, FS1-Ma + FS1-Mb, y FS1T3-pH2), Tabla 4.34.

Por otro lado, cuando el sustrato utilizado fue L-arabinosa, se observa una disminución de la productividad volumétrica en arabitol, desde $6,5$ hasta $2,4 \text{ mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, a medida que la temperatura aumenta en un rango de $25 - 50^\circ\text{C}$ (Exptos FS2T3-pH2, FS2a + FS2b, FS2T5-pH2 y FS2T6), Tabla 4.35.

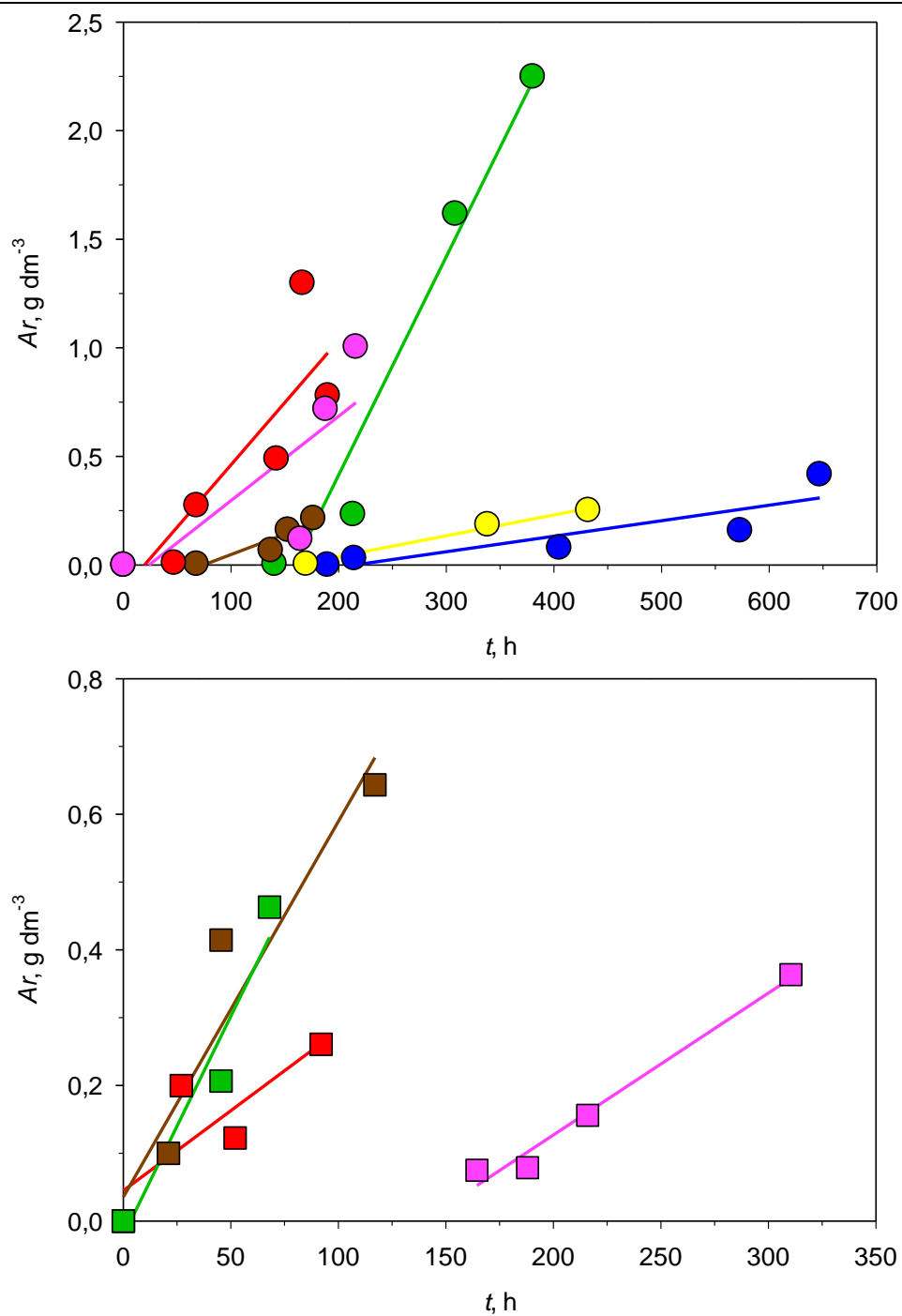


Figura 4.43 Ajuste de la concentración de arabitol frente al tiempo. Cálculo de la velocidad específica de formación de arabitol (q_{Ar}^D) en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1-T1, FS1-Mb, FS1T3-pH2, F-S1c, FS1T5-pH2, FS1-T6b, FS2T3-pH2, FS2a, FS2T5-pH2 y FS2-T6), en condiciones de microaeración y $pH_0 = 4,5$, con $25\ g\ dm^{-3}$ de D-ARA₀ (○), L-ARA₀ (□) y modificando la temperatura de 25 (azul), 30 (amarillo), 35 (verde), 40 (marrón), 45 (rosa) a 50°C (rojo).

Tabla 4.34
 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
 EFECTO DE LA TEMPERATURA

Productividad volumétrica (Q_{Ar}) y velocidades específica de formación de arabitol (q_{Ar}^D , q_{Ar})
 Condiciones de microaeración, $pH_0 = 4,5$ y $D-ARA_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$

T °C	Expto.	$Q_{Ar} 10$ $\text{g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$	Fase	t , h	$q_{Ar}^D 10$ $\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$q_{Ar} 10$ $\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
25	FS1-T1	0,007	LIN	200	0,005	0,003
			LIN	526	0,002	0,002
			EST	647	0,001	—
30	FS1-Ma	0,013	LIN	50,0	0,019 ^b	0,013 ^b
			LIN	150,0	0,010 ^b	0,007 ^b
	FS1-Mb	0,010	LIN	169,8	0,005 ^b	0,006 ^b
			LIN	200,0	0,004 ^b	0,005 ^b
35	FS1T3-pH2	0,101	LIN	140,5	0,08 ^c	0,073 ^c
			LIN	332,5	0,025 ^c	0,022 ^c
			EST	380,5	0,029 ^c	—
40	F-S1a	0,076	LIN	50,0	0,065 ^a	0,063 ^a
			LIN	150,0	0,030 ^a	0,029 ^a
			LIN	189,5	0,031 ^a	0,030 ^a
	F-S1b	0,053	LIN	165,0	0,037 ^a	0,030 ^a
			LIN	200,0	0,039 ^a	0,032 ^a
			LIN	332,0	0,022 ^a	0,018 ^a
	F-S1c	0,019	LIN	68,0	0,016 ^a	0,014 ^a
			LIN	150,0	0,006 ^a	0,006 ^a
LIN	176,5	0,006 ^a	—			
45	FS1T5-pH2	0,039	LIN	50,0	0,091 ^c	0,077 ^c
			LIN	100,0	0,052 ^c	0,044 ^c
			EST	216,0	0,019 ^c	—
50	FS1-T6a	0,044	LIN	7,5	0,543	0,800
			LIN	27,0	0,225	0,331
			LIN	52,0	0,215	0,317
			LIN	92,0	0,142	0,209
	FS1-T6b	0,057	EXP	4,0	0,798	1,216
			LIN	50,0	0,068	0,134
			LIN	68,0	0,049	0,097
EST	142,5	0,040	—			

Valores calculados anteriormente e indicados en las Tablas 4.13 (e), 4.19 (b) y 4.26 (c).

Tabla 4.35
FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
EFECTO DE LA TEMPERATURA

Productividad volumétrica (Q_{Ar}) y velocidades específicas de formación de arabitol (q_{Ar}^D , q_{Ar})
Condiciones de microaeración, $pH_0 = 4,5$ y $L-ARA_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$

T °C	Expto.	$Q_{Ar} 10$ $\text{g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$	Fase	t , h	$q_{Ar}^D 10$ $\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$q_{Ar} 10$ $\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
35	FS2T3-pH2	0,065	LIN	21,0	0,073 ^b	0,050 ^b
			LIN	50,0	0,049 ^b	0,033 ^b
			LIN	68,0	0,037 ^b	0,025 ^b
40	F-S2a	0,055	LIN	21,0	0,059 ^a	0,038 ^a
			LIN	50,0	0,037 ^a	0,024 ^a
			LIN	117,0	0,021 ^a	0,014 ^a
40	F-S2b	0,035	EXP	10,0	0,327 ^a	0,392 ^a
			LIN	50,0	0,061 ^a	0,054 ^a
			LIN	94,0	0,039 ^a	0,034 ^a
45	FS2T5-pH2	0,021	LIN	164,5	0,012 ^b	0,011 ^b
			LIN	188,0	0,010 ^b	0,009 ^b
			LIN	216,0	0,008 ^b	0,007 ^b
			LIN	310,5	0,006 ^b	0,005 ^b
50	FS2-T6	0,024	EXP	10,0	0,318	0,229
			LIN	52,0	0,050	0,045
			LIN	92,0	0,030	0,027

Valores calculados anteriormente e indicados en las Tablas 4.13 ^(a) y 4.27 ^(b).

En general, para cualquiera de las pentosas utilizada en esta serie, y a pH inicial constante, q_{Ar}^D disminuye a lo largo del tiempo de cultivo, Tablas 4.34 y 4.35. Cuando se utilizó D-arabinosa como sustrato, la velocidad específica de formación de arabitol aumentó desde 1,9 hasta 21,5 $\text{mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ transcurridos prácticamente el mismo tiempo de bioproceso (50 y 52 h respectivamente), con el aumento de la temperatura de fermentación desde 30 a 50°C, Tabla 4.34. Por el contrario, utilizando L-arabinosa como pentosa, a $pH_0 = 4,5$, no se aprecia una tendencia definida al aumentar la temperatura de fermentación y tras el mismo tiempo de cultivo, Fig. 4.44.

Por otro parte, los valores alcanzados para q_{Ar}^D , en las mismas condiciones de operación (pH_0 y temperatura), fueron superiores cuando la pentosa usada fue D-arabinosa; en efecto, durante la fermentación microaeróbica a $pH_0 = 4,5$ y 40°C, y tras 50 h de cultivo, se determinó una velocidad específica de formación de arabitol de 6,5 $\text{mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ utilizando D-

arabinosa (Expto. F-S1a), valor superior al alcanzado cuando el monosacárido fue L-arabinosa, $3,7 \text{ mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (Expto. F-S2a).

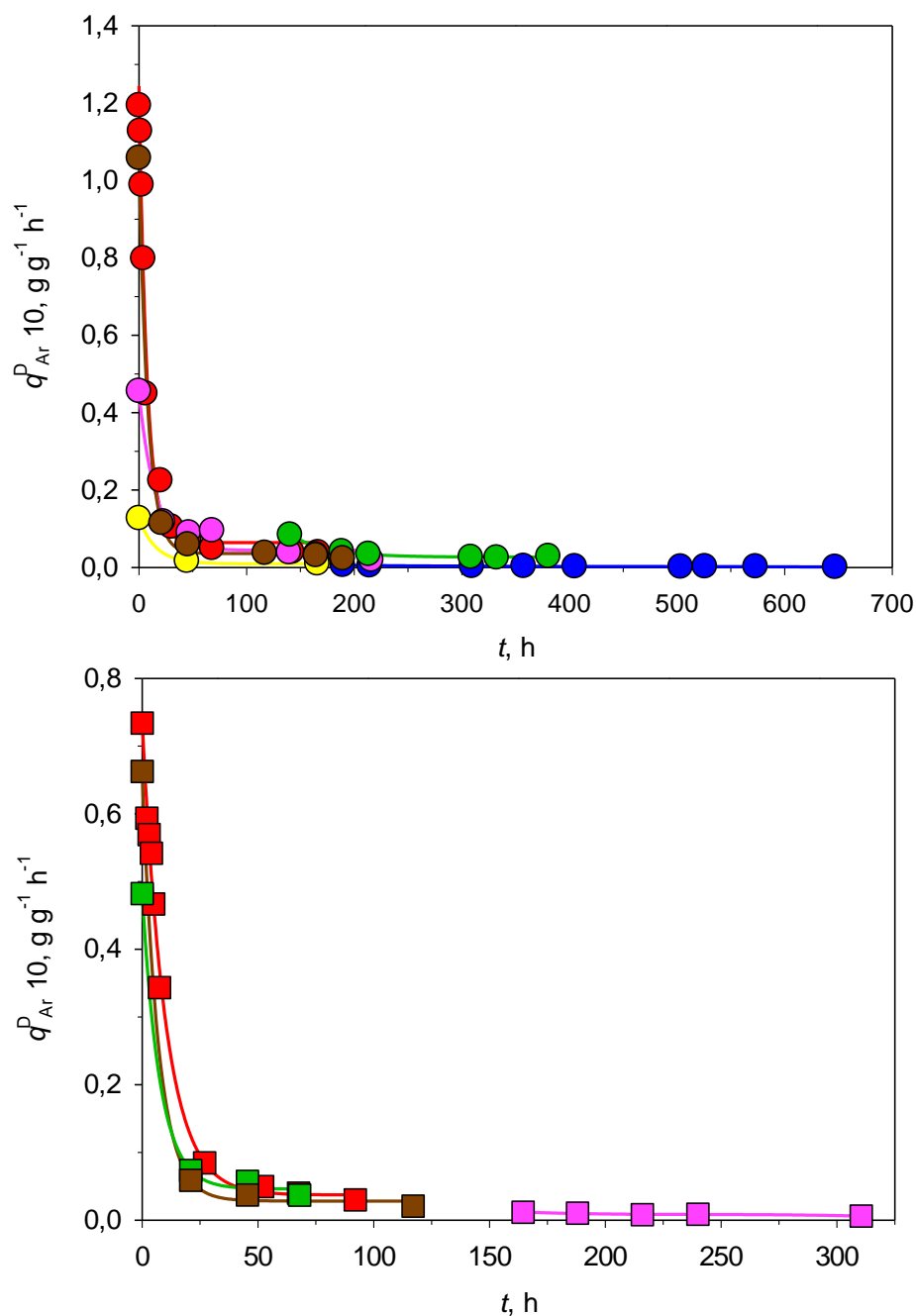


Figura 4.44 Velocidad específica de formación de arabitól (q_{Ar}^D) en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1-T1, FS1-Ma, FS1T3-pH2, F-S1a, FS1T5-pH2, FS1-T6b, FS2T3-pH2, F-S2a, FS2T5-pH2 y FS2-T6), en condiciones de microaeración y $\text{pH}_0 = 4,5$, con 25 g dm^{-3} de D-ARA₀ (○), L-ARA₀ (□) y modificando la temperatura de 25 (azul), 30 (amarillo), 35 (verde), 40 (marrón), 45 (rosa) a 50°C (rojo).

En la revisión bibliográfica realizada al inicio de esta Tesis Doctoral, no se ha encontrado referencias de trabajos que traten la fermentación de D o L-arabinosa con *H. polymorpha* y que determinen velocidades específicas de formación de arabitol. Sin embargo, sí existen referencias sobre la asimilación de D-xilosa por otras levaduras no tradicionales con vista a la formación de xilitol.

Durante la fermentación microaeróbica de D o L-arabinosa con *H. polymorpha*, a pH inicial constante (4,5), los valores determinados de la productividad global en arabitol no muestran una tendencia definida con el incremento de la temperatura de fermentación, Fig. 4.45. No obstante, cuando el sustrato utilizado fue L-arabinosa, en general, los valores alcanzados de $Y_{Ar/x}^G$ fueron inferiores a los obtenidos cuando el monosacárido fue D-arabinosa; en efecto, durante la fermentación microaeróbica de L-arabinosa a $pH_0 = 4,5$ y 35°C (Expto. FS2T3-pH2), se alcanzó una productividad global en arabitol, $0,28 \text{ g g}^{-1}$, inferior a la determinada usando D-arabinosa bajo las mismas condiciones de fermentación, $0,74 \text{ g g}^{-1}$ (Exptos. FS1T3-pH2).

Una vez calculada q_{Ar} de la misma forma que en series anteriores, y tras comparar los valores obtenidos de velocidades específicas de producción de arabitol evaluados por los métodos diferencial (q_{Ar}^D) e integral (q_{Ar}), se observa una aceptable concordancia entre ambos, fundamentalmente en la fase de desaceleración del crecimiento, Tablas 4.34 y 4.35.

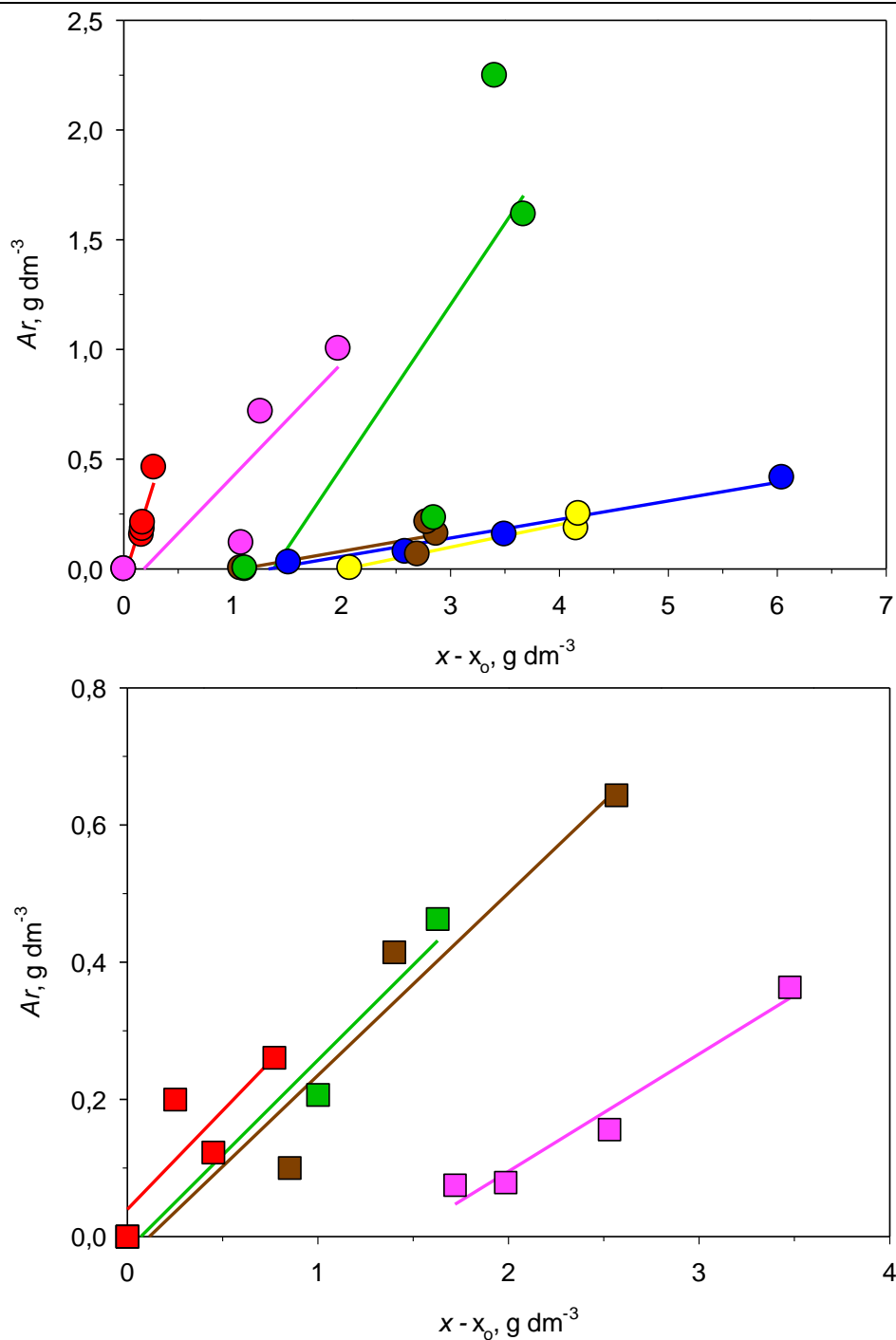


Figura 4.45 Determinación de la productividad global en arabitol ($Y_{Ar/x}^G$) según la Ec. 4.25 en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1-T1, FS1-Mb, FS1T3-pH2, F-S1c, FS1T5-pH2, FS1-T6a, FS2T3-pH2, F-S2a, FS2T5-pH2 y FS2-T6), en condiciones de microaeración y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm⁻³ de D-ARA₀ (○), L-ARA₀ (□) y modificando la temperatura de 25 (azul), 30 (amarillo), 35 (verde), 40 (marrón), 45 (rosa) a 50°C (rojo).

➤ Velocidad específica de formación de xilitol

A partir de la determinación analítica de Q_{Xi} como pendiente de la representación de los datos X_i vs t , Fig. 4.46, se calculó q_{Xi}^D , Tabla 4.36. Durante la fermentación microaeróbica de D-xilosa, a pH inicial constante (4,5), se detecta que los valores globales alcanzados de Q_{Xi} disminuyen con el aumento de la temperatura de bioproceso, Tabla 4.36. En este sentido, cuando la temperatura de operación fue 40°C (Expto. F-S3), se determinó un valor de productividad volumétrica en xilitol, 0,18 g dm⁻³ h⁻¹, superior al alcanzado a 50°C (Expto. FS3-T6), 0,07 g dm⁻³ h⁻¹, Fig. 4.46.

En general, a pH₀ = 4,5, durante la fermentación de D-xilosa se alcanzaron valores de Q_{Xi} superiores a los alcanzados para Q_{Ar} cuando D o L-arabinosa fue utilizada como sustrato bajo las mismas condiciones, Tablas 4.34 a 4.36. En efecto, en la fermentación de D-xilosa a pH₀ = 4,5 y 50°C, se determinó un valor de Q_{Xi} , 0,07 g dm⁻³ h⁻¹ (Expto. FS3-T6) superior al alcanzado usando D-arabinosa, 0,04 g dm⁻³ h⁻¹ (Expto. FS1-T6a) y L-arabinosa, 0,02 g dm⁻³ h⁻¹ (Expto. FS2-T6) en las mismas condiciones de operación.

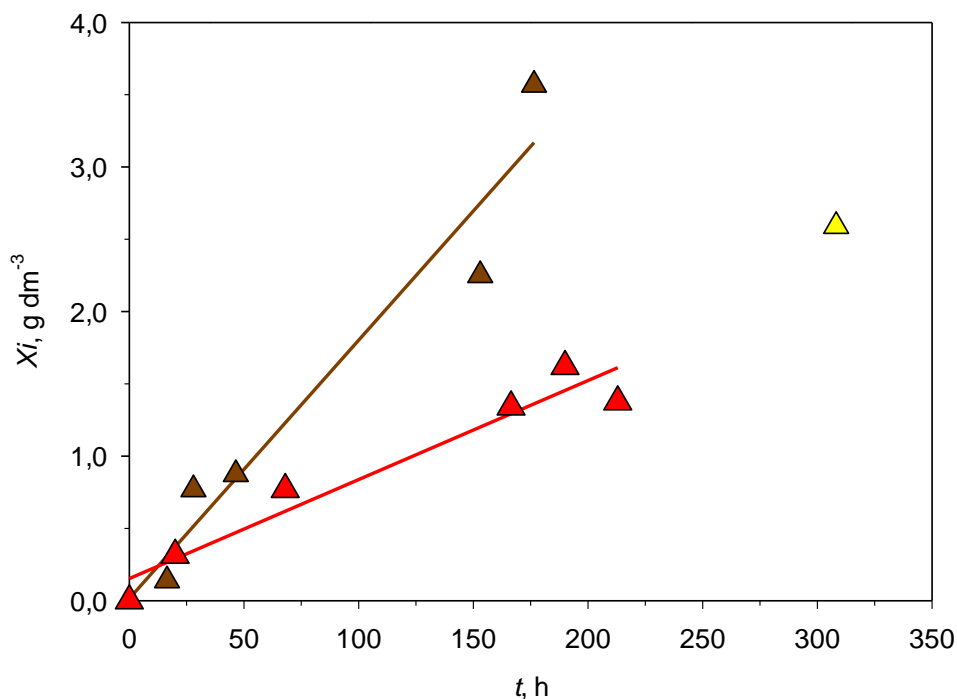


Figura 4.46 Ajuste de la concentración de xilitol frente al tiempo. Cálculo de la velocidad específica de formación de xilitol (q_{Xi}^D) en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS3-M, F-S3 y FS3-T6), en condiciones de microaeración y pH₀ = 4,5, con 25 g dm⁻³ de D-XIL₀ (△) y modificando la temperatura de 30 (amarillo), 40 (marrón) a 50°C (rojo).

Tabla 4.36
 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
 EFECTO DE LA TEMPERATURA

Productividad volumétrica (Q_{xi}) y Velocidades específicas de formación de xilitol (q_{xi}^D y q_{xi})
 Condiciones de microaeración, $pH_o = 4,5$ y $D-XIL_o = 25 \text{ g dm}^{-3}$

T °C	Expto.	$Q_{xi} 10$ $\text{g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$	Fase	t h	$q_{xi}^D 10$ $\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$q_{xi} 10$ $\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
30	FS3-M	0,084*	LIN	44,8	0,114 ^b	0,114 ^b
			LIN	50,0	0,078 ^b	0,078 ^b
			LIN	150,0	0,031 ^b	0,031 ^b
			LIN	200,0	0,024 ^b	0,024 ^b
40	F-S3	0,179	LIN	10,0	0,415 ^a	0,766 ^a
			LIN	16,5	0,292 ^a	0,539 ^a
			LIN	28,0	0,198 ^a	0,365 ^a
			LIN	50,0	0,127 ^a	0,235 ^a
			EST	153,0	0,077 ^a	—
50	FS3-T6	0,068	EST	176,5	0,068 ^a	—
			EXP	4,0	0,815	1,522
			LIN	50,0	0,131	0,123
			LIN	100,0	0,076	0,071
			LIN	150,0	0,054	0,050
			LIN	200,0	0,041	0,039

(*) Valor puntual.

Valores calculados anteriormente e indicados en las Tablas 4.14 (^a) y 4.20 (^b).

De forma similar a lo observado en q_{Ar}^D , la velocidad específica de formación de xilitol disminuye a medida que aumenta el tiempo de cultivo en cualquiera de las temperaturas de operación, Tabla 4.36. Por otra parte, si se comparan los valores alcanzados de q_{xi}^D , transcurridas las mismas horas de cultivo, en fermentaciones microaeróbicas y pH inicial constante (4,5), donde únicamente se modificó la temperatura de operación, se observa que, en general, la velocidad específica de formación de xilitol es más elevada a 40°C, Tabla 4.36; en efecto, a 40°C y transcurrido un tiempo próximo a 150 h de cultivo, el valor que se determinó de q_{xi}^D (7,7 $\text{mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), fue superior al valor alcanzado a 30 y 50°C (3,1 y 5,4 $\text{mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Por otro lado, los valores alcanzados para $q_{X_i}^D$, en las mismas condiciones de operación (pH_0 y temperatura), y tras las mismas horas de proceso, Fig. 4.47, fueron superiores a los determinados para q_{Ar}^D cuando la pentosa empleada fue D o L-arabinosa, Fig. 4.44.

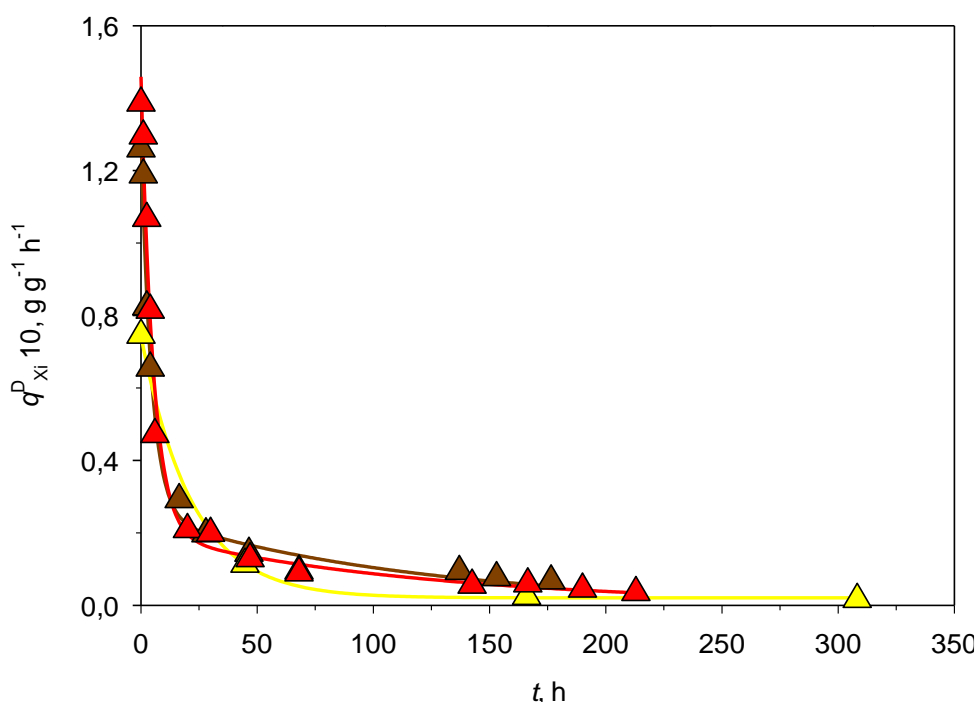


Figura 4.47 Velocidad específica de formación de xilitol ($q_{X_i}^D$) en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS3-M, F-S3 y FS3-T6), en condiciones de microaeración y $\text{pH}_0 = 4,5$, con 25 g dm^{-3} de D-XIL₀ (Δ) y modificando la temperatura de 30 (amarillo), 40 (marrón) a 50°C (rojo).

La velocidad específica de producción de xilitol, determinada a 30°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, y tras 50 h de cultivo, es muy inferior, $7,8 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tabla 4.36) a la obtenida por Sánchez *et al.* (2004) durante la fermentación de D-xilosa con *P. tannophilus*, en las mismas condiciones de temperatura y pH inicial, tras el mismo tiempo de cultivo, cuyo valor fue $25,0 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. De igual forma, se han obtenido unos valores para $q_{X_i}^D$ inferiores si se comparan con las determinadas en la fermentación de D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C y pH_0 de 4,5 (Sánchez *et al.*, 1998); en efecto, en dicha investigación se obtuvieron valores de $q_{X_i}^D$ próximos a $60 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, una vez transcurridas 80 h de cultivo, superior al alcanzado en esta serie experimental y tras el mismo tiempo de fermentación, Expto. FS3-M (Tabla 4.36). Es importante considerar que estas investigaciones previas se realizaron con biorreactores

discontinuos, tipo mezcla perfecta, 500 cm³ y 500 rpm (microaeración por vórtice), mientras que en este estudio se ha operado utilizando matraces Erlenmeyer de 50 cm³ y un agitador orbital con velocidad de 100 rpm.

A partir de la productividad global en xilitol, Fig. 4.48, se determinó q_{X_i} , Tabla 4.36. Al igual que sucede en el arabitol, tras comparar los valores obtenidos de velocidades específicas de producción de xilitol evaluados por los métodos diferencial e integral, se observa una buena concordancia entre $q_{X_i}^D$ y q_{X_i} , Tabla 4.36.

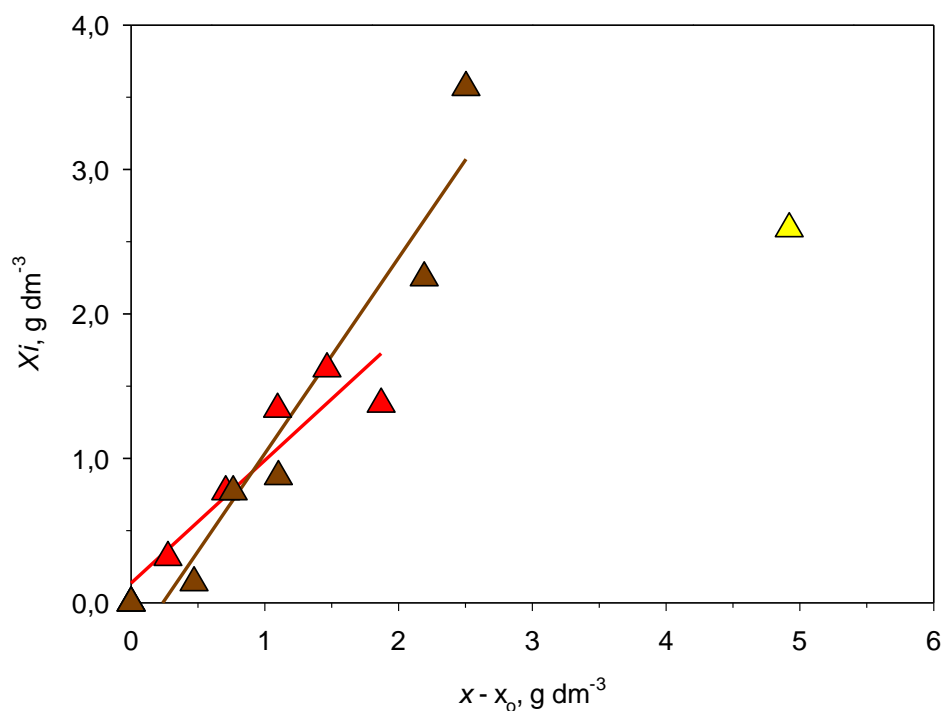


Figura 4.48 Determinación de la productividad en xilitol según la Ec. 4.28 en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS3-M, F-S3 y FS3-T6), en condiciones de microaeración y $pH_0 = 4,5$, con 25 g dm⁻³ de D-XIL₀ (Δ) y modificando la temperatura de 30 (amarillo), 40 (marrón) a 50°C (rojo).

➤ Rendimiento en arabitol

A partir de la representación de los valores de Ar versus $(ART_0 - ART)$, Fig. 4.49, y tal y como se especificó en las series anteriores, se determinó el rendimiento global en arabitol, $Y_{Ar/ART}^G$, Tabla 4.37.

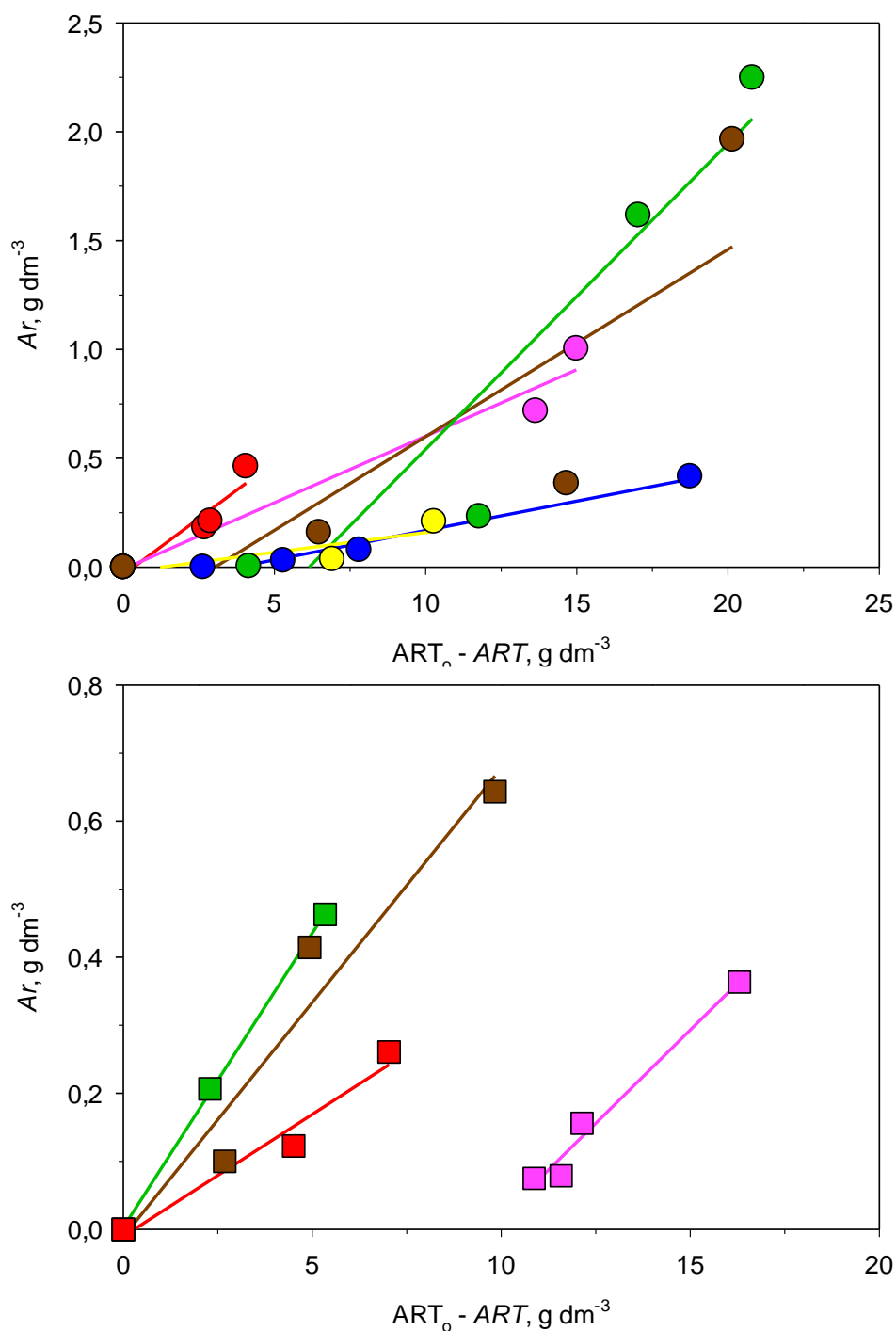


Figura 4.49 Determinación de los rendimientos globales en arabitol ($Y_{Ar/ART}^G$) según la Ec. 4.30 en los experimentos de fermentación con *H. polymorpha* (FS1-T1, FS1-Ma, FS1T3-pH2, F-S1a, FS1T5-pH2, FS1-T6a, FS2T3-pH2, F-S2a, FS2T5-pH2 y FS2-T6), en condiciones de microaeración y $pH_0 = 4,5$, con $25\ g\ dm^{-3}$ de D-ARA₀ (○), L-ARA₀ (□), y modificando la temperatura de 25 (azul), 30 (amarillo), 35 (verde), 40 (marrón), 45 (rosa) a 50°C (rojo).

Tabla 4.37
 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *H. polymorpha*
 EFECTO DE LA TEMPERATURA
 Rendimientos globales en arabitol y xilitol ($Y_{Ar/ART}^G$, $Y_{Xi/ART}^G$)
 Condiciones de microaeración y $pH_0 = 4,5$

Sustrato	T °C	Expto.	t, h	$Y_{Ar/ART}^G$ g g ⁻¹	$Y_{Xi/ART}^G$ g g ⁻¹
D-arabinosa	25	FS1-T1		0,027	
	30	FS1-Ma		0,020 ^b	
		FS1-Mb			
	35	FS1T3-pH2		0,141 ^c	
	40	F-S1a	332,0	0,086 ^a	0,069 ^{*a}
		F-S1b			
	45	FS1T5-pH2		0,061 ^c	
50	FS1-T6a		0,114		
	FS1-T6b				
L-arabinosa	35	FS2T3-pH2		0,087 ^c	
	40	F-S2a	94,0	0,069 ^a	0,074 ^{*a}
		F-S2b			
	45	FS2T5-pH2		0,055 ^c	
	50	FS2-T6		0,036	
D-xilosa	30	FS3-M	308,3		0,122 ^{*b}
	40	F-S3			0,149 ^a
	50	FS3-T6			0,068

(*) Rendimientos instantáneos ($Y_{Ar/ART}$, $Y_{Xi/ART}$).

Valores calculados anteriormente e indicados en las Tablas 4.15 ^(a), 4.21 ^(b) y 4.28 ^(c).

En general, a pH inicial constante, cuando el sustrato utilizado fue D-arabinosa, los valores de $Y_{Ar/ART}^G$ no muestran una tendencia definida con el incremento de la temperatura de operación, Tabla 4.37. No obstante, cuando el monosacárido utilizado en la fermentación fue L-arabinosa, se observa una disminución de $Y_{Ar/ART}^G$ a medida que aumenta la temperatura; en este sentido, durante la fermentación de L-arabinosa con *H. polymorpha*, a $pH_0 = 4,5$ y en el rango de temperaturas de 35 – 50°C, se alcanzaron valores de $Y_{Ar/ART}^G$, desde 0,087 a 0,036 g g⁻¹, Tabla 4.37. Cabe destacar el hecho de que el máximo rendimiento global en arabitol se determina con D-arabinosa a 35°C y $pH_0 = 4,5$ (Expto. FS1T3-pH2).

En general, estos resultados obtenidos en $Y_{Ar/ART}^G$ durante la fermentación de D y L-arabinosa con *H. polymorpha* son superiores a los determinados por Fonseca *et al.* (2007), 0,01 g g⁻¹, en la fermentación de L-arabinosa con *Candida arabinoferrantans* PYCC 5603^T a 30°C y pH = 5,5. No obstante, al modificar la levadura por *P. guilliermondii* PYYCC 3012, estos autores obtuvieron un rendimiento en arabitol superior, 0,47 g g⁻¹. Este grupo de investigación utilizó biorreactores de 1 dm³ operando con 500 cm³ de medio de cultivo, y una velocidad de agitación de 200 rpm; también, cabe destacar que ambas levaduras, *C. arabinoferrantans* y *P. guilliermondii*, son mesófilas a diferencia con *H. polymorpha*.

Por otro lado, el rendimiento global en arabitol determinado a 45°C utilizando como sustrato D-arabinosa (0,061 g g⁻¹) y L-arabinosa (0,055 g g⁻¹), Tabla 4.37, son similares o ligeramente inferiores a los determinados por Escalante *et al.* (1990b), 0,064 g g⁻¹, en la fermentación de 30 g dm⁻³ de D-glucosa con *H. polymorpha* a 45°C y pH = 4,8; este grupo de investigación utiliza fermentadores de 2 dm³ de capacidad con una velocidad de agitación de 1.000 rpm e introduciendo aire esterilizado (1,0 v/v/min), y no explica el mecanismo de formación de arabitol partiendo de una hexosa como es D-glucosa.

➤ Rendimiento en xilitol

En este caso, durante la fermentación de D-xilosa con *H. polymorpha*, a pH_o constante, se observa que $Y_{Xi/ART}^G$ disminuye con el aumento de la temperatura de operación, Fig. 4.50. En efecto, durante la fermentación de D-xilosa a 40°C, se obtuvo un valor del rendimiento global en xilitol, 0,15 g g⁻¹ (Expto. F-S3), que fue superior al obtenido cuando la temperatura se incrementó a 50°C, 0,068 g g⁻¹ (Expto. FS3-T6), Tabla 4.37. Cuando la fermentación se desarrolló a 30°C, sólo se ha podido calcular el rendimiento instantáneo en xilitol por no existir valores experimentales suficientes referidos a concentración de xilitol en la fase de linealidad de xilitol que apoyen dicha etapa con el fin de poder calcular $Y_{Xi/ART}^G$.

Estos valores de rendimiento en xilitol son ligeramente superiores a los obtenidos por Sánchez *et al.* (2004), en torno a 0,10 g g⁻¹, en la fermentación de 25 g dm⁻³ de D-xilosa con *H. polymorpha* a 30°C, pH_o = 4,5 y en condiciones microaeróbicas logradas sólo a partir del vórtice de agitación en un biorreactor discontinuo, tipo tanque agitado. Sin embargo, cuando la temperatura de fermentación aumentó a 35°C, $Y_{Xi/ART}^G$ disminuyó a la mitad, 0,05 g g⁻¹.

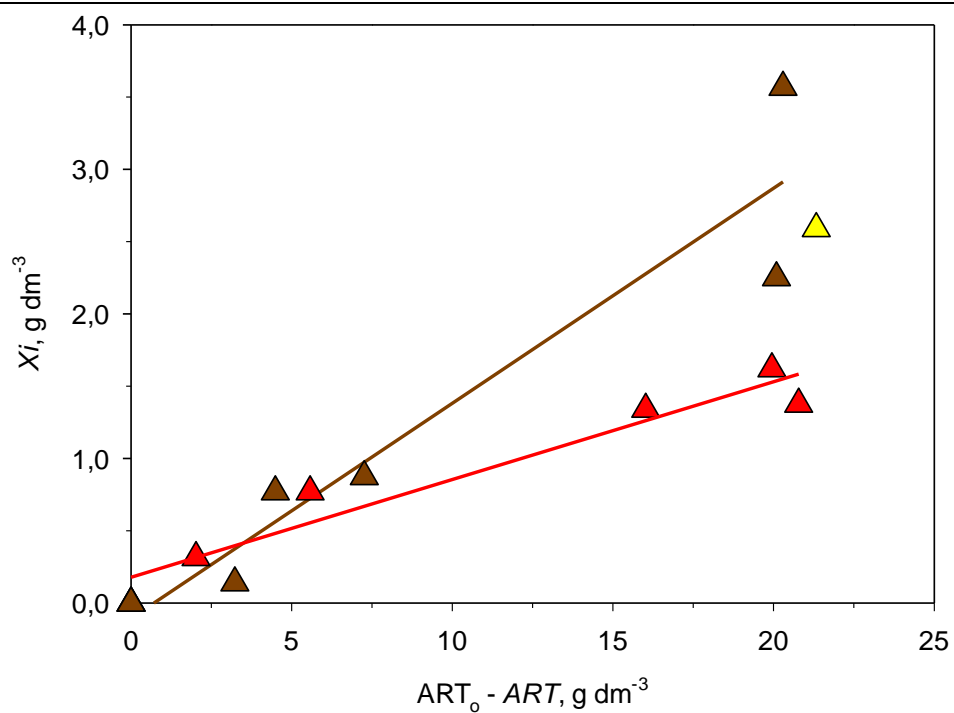


Figura 4.50 Determinación del rendimiento en xilitol según la Ec. 4.31 en el experimento de fermentación con *H. polymorpha* (FS3-M, F-S3 y FS3-T6), en condiciones de microaeración y $\text{pH}_0 = 4,5$, con 25 g dm^{-3} de D-XIL₀ (\triangle) y modificando la temperatura de 30 (amarillo), 40 (marrón) a 50°C (rojo).

4.3 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA

Estos procesos se llevan a cabo en una única etapa, en un mismo reactor, donde la hidrólisis enzimática y la fermentación se desarrollan al mismo tiempo y en las mismas condiciones de operación (Wyman *et al.*, 1992). En definitiva, los enzimas transforman los polisacáridos en monosacáridos fermentables. Simultáneamente, se lleva a cabo la fermentación, con el microorganismo seleccionado, de estos monosacáridos obtenidos, convirtiéndose de forma continua a bioproductos (p. ej. etanol, xilitol, arabitol), sin acumulación de azúcares en la mezcla de reacción. La presencia de la levadura junto con los enzimas reduce la acumulación del sustrato debido a su continua conversión a bioproductos por la fermentación; este hecho puede suponer un aumento en la velocidad de sacarificación y del rendimiento en bioproductos. La sacarificación y fermentación simultánea también reduce los costes económicos, así como el riesgo de contaminación microbiana (De Bari *et al.*, 2002).

Tras someter el material de poda (exento de hoja y con un tamaño de partícula fijo entre 0,300 y 0,425 mm) a un pretratamiento de hidrólisis ácida (ácido sulfúrico 0,05 M) con agua caliente a presión y una relación S/L = 1/6 (p/V), apartado 3.6.1, se consigue hidrolizar la fracción hemicelulósica, Tabla 4.1 y 4.8, facilitando así el posterior ataque enzimático en el proceso SFS. El hidrolizado procedente de esta hidrólisis ácida a presión, compuesto por fase sólida y líquida, se somete al proceso de sacarificación y fermentación simultánea con los enzimas celulasa [EC 3.2.1.4] y β -glucosidasa [EC 3.2.1.21], usando la levadura *H. polymorpha*.

Con el fin de establecer las condiciones de operación más adecuadas en el proceso SFS, se realizó series experimentales donde la concentración del inóculo y el pH₀ del cultivo se modificaron en un rango de 0,11 – 0,36 g dm⁻³ y 3,5 – 5,5, respectivamente, manteniéndose constante la temperatura de bioproceso (45°C).

Hay que destacar el hecho de que, para realizar un seguimiento de la evolución del cultivo con el tiempo con el fin de determinar el crecimiento celular, en este proceso SFS no se ha podido determinar la concentración en biomasa a lo largo del tiempo (x) a partir de la absorbancia de la suspensión celular medida a $\lambda = 620$ nm, según se indica en Apartado 3.9.1 de Materiales y Métodos. Esto es debido a que el proceso SFS se llevó a cabo a partir del hidrolizado pretratado que está constituido por una mezcla S + L; en efecto, a pesar permanecer el reactor sin agitación unos minutos antes de la toma de muestra, con el fin de conseguir la sedimentación de la fase sólida, las muestras contienen partículas sólidas que

provocan un aumento de A_{620} y por consiguiente una determinación errónea de la concentración en biomasa.

No obstante, en algunos experimentos de esta serie se ha estudiado la evolución del cultivo a lo largo del tiempo a partir del conteo de células en microscopio óptico, $N_{células}$, según se indica en Apartado 3.9.2 de Materiales y Métodos. A partir del valor obtenido para $N_{células}$ a lo largo del tiempo de proceso, se determinó posteriormente la concentración celular de la muestra durante el proceso de sacarificación y fermentación simultánea, N , según la Ec. 3.24.

Conocida la concentración celular en el reactor (por conteo celular) al comienzo del proceso, N_0 , durante el crecimiento exponencial, una representación de $\ln (N/N_0)$ vs t conduciría a un ajuste lineal, es decir, una línea recta, a partir de cuya pendiente se podría determinar un valor de la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , Ec. 4.32.

$$\ln \frac{N}{N_0} = \mu_m t + Z' \quad [4.32]$$

siendo Z' una ordenada en el origen no nula.

Durante la sacarificación y fermentación simultánea se determinó la concentración celular en aquellos experimentos donde se hayan evaluado (N), la concentración de monosacáridos fermentables como D-glucosa (*D-GLU*), D-xilosa (*D-XIL*), arabinosa (*ARA*), D-galactosa (*D-GAL*), D-manosa (*D-MAN*), D-fructosa (*D-FRU*), así como azúcares totales (*AT*). Con respecto a los bioproductos, se calculó la concentración en etanol (*E*), xilitol (*Xi*) y arabitol (*Ar*). Finalmente, ante la posible existencia de inhibición, se determinó la concentración en ácido acético (*Ac*), así como el índice de inhibidores (*I*). Por otro lado, se calculó la concentración de compuestos fenólicos totales (*CFT*) existentes en los hidrolizados finales tras el proceso de sacarificación y fermentación simultánea. Todos estos datos primarios se presentan en el Anexo C de esta Memoria.

A partir de estos resultados, se llevó a cabo un estudio del consumo de sustrato y formación de bioproductos a través de los parámetros cinéticos: velocidad volumétrica de consumo de sustrato (Q_s^D), así como productividad volumétrica y rendimientos en bioproductos.

4.3.1 Experimento de referencia

En este caso, el hidrolizado obtenido tras el pretratamiento de hidrólisis a presión (apartado 3.6.1) se sometió a un proceso de filtración, tal y como se indica en el apartado 3.7.2, con el fin de obtener la fase líquida.

Fijada la temperatura de operación (45°C) y el pH₀ (4,5), y manteniendo las condiciones de microaeración (entrada de aire sólo por el vórtice de agitación), se sometió el hidrolizado líquido a un proceso de fermentación con *H. polymorpha*, apartado 3.7.2. La concentración inicial de inóculo en el reactor fue en torno a 0,27 g dm⁻³.

Este ensayo (FHP-pH2) se desarrolló en un biorreactor tipo tanque agitado, tal y como fue descrito en el apartado de Materiales y Métodos, sección 3.7.2, sin la adición de los enzimas celulasa [EC 3.2.1.4] y β-glucosidasa [EC 3.2.1.21], debido a que en este caso no se pretendía sacarificación y fermentación simultánea, sino sólo el proceso de fermentación del hidrolizado.

Durante la fermentación se estudió la evolución del *pH* y se determinó la concentración celular. En relación al sustrato, se determinaron las concentraciones de monosacáridos fermentables como D-glucosa (*D-GLU*), D-xilosa (*D-XIL*), arabinosa (*ARA*), D-galactosa (*D-GAL*), D-manosa (*D-MAN*), D-fructosa (*D-FRU*), así como azúcares totales (*AT*). Con respecto a los bioproductos, se calculó la concentración en etanol (*E*), xilitol (*Xi*) y arabitol (*Ar*). Finalmente, ante la posible existencia de inhibición, se determinó la concentración en ácido acético (*Ac*), así como el índice de inhibidores (*I*). Todos estos datos primarios se presentan en la Tabla C.1 del Anexo C de esta Memoria. A partir de estos datos experimentales, se ha llevado a cabo una representación gráfica de la formación de los bioproductos (Figura C.1), de los consumos de azúcares totales, D-glucosa, D-xilosa y arabinosa (Figura C.2).

A partir de estos resultados, se llevó a cabo un estudio de la formación de biomasa, consumo de sustrato y formación de bioproductos a través de los parámetros cinéticos: velocidad específica máxima de crecimiento, productividad en biomasa, velocidad específica de consumo de sustrato, rendimiento en biomasa, velocidad específica de formación de productos y rendimientos en bioproductos en este experimento de fermentación.

4.3.1.1 Formación de biomasa

La evaluación de la formación en biomasa durante el proceso de fermentación del hidrolizado con *H. polymorpha* se llevó a cabo mediante la determinación de la velocidad específica máxima de crecimiento y la productividad volumétrica en biomasa.

Tras establecer la fase de crecimiento exponencial en la curva de crecimiento, Fig. 4.51, mediante ajuste por mínimos cuadrados, a la Ec. 4.15, de los datos del logaritmo neperiano de la concentración adimensional de biomasa y tiempo de operación, se determinó un valor de μ_m igual a $0,036 \text{ h}^{-1}$ ($r^2 = 0,998$). Esta velocidad específica máxima es inferior a la determinada en las series experimentales de fermentación de pentosas con *H. polymorpha* en un agitador orbital. En efecto, el valor mínimo determinado de μ_m , $0,062 \text{ h}^{-1}$, se alcanzó durante la fermentación de D-arabinosa con *H. polymorpha*, en agitador orbital, a 25°C , $\text{pH}_0 = 4,5$ y en condiciones microaeróbicas (Expto. FS1-T1), Tabla 4.29; el valor máximo de μ_m , $0,320 \text{ h}^{-1}$, se obtuvo a 40°C , $\text{pH}_0 = 5,5$, en condiciones microaeróbicas y utilizando L-arabinosa (Expto.FS2T4-pH3), Tabla 4.22.

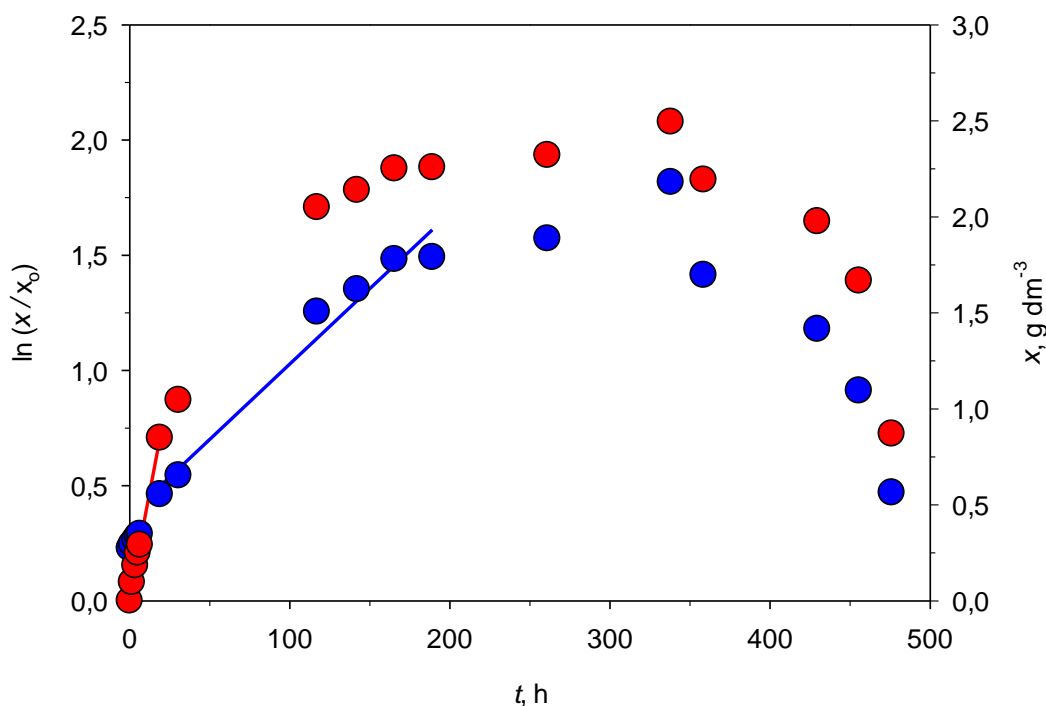


Figura 4.51 Curva de crecimiento. Determinación de la velocidad específica máxima de crecimiento y de la productividad volumétrica en biomasa en la fermentación del hidrolizado a presión con *H. polymorpha* (FHP-pH2), a 45°C , $\text{pH}_0 = 4,5$, y con una concentración inicial de inóculo de $0,27 \text{ g dm}^{-3}$. Valores de $\ln(x/x_0)$ vs t ● ; x vs t ●.

Esta fase exponencial abarca un período de 19 h, duración comparable con las obtenidas durante la fermentación de pentosas con *H. polymorpha* en un agitador orbital (apartado 4.2).

La velocidad específica máxima alcanzada en este experimento de fermentación del hidrolizado a presión con *H. polymorpha* a 45°C, pH₀ 4,5 y en condiciones microaeróbicas (FHP-pH2), es considerablemente inferior a las obtenidas en otros estudios de fermentación. En efecto, durante la fermentación en un biorreactor discontinuo, tipo mezcla perfecta, de D-xilosa pura con *H. polymorpha* a 30°C y pH₀ = 4,5 y 500 rpm (Sánchez *et al.*, 1998), se alcanzó un valor de μ_m en torno a 0,43 h⁻¹, velocidad que es considerablemente superior a las determinadas en este experimento FHP-pH2.

Durante la fermentación de D-glucosa con *H. polymorpha*, a 45°C y modificando el pH₀ (en el rango de 3,5 a 5,5), se alcanzó un valor para μ_m del orden de 0,55 h⁻¹ cuando el pH₀ estuvo próximo a 4,5 (Escalante *et al.*, 1990a). Esta velocidad es de nuevo superior a las alcanzadas en este experimento de fermentación de hidrolizado pretratado a presión con *H. polymorpha* FHP-pH2. En dicha investigación se operó usando matraces Erlenmeyer agitados (100 rpm), conteniendo 100 cm³ de medio de cultivo de *H. polymorpha* con 1% (p/V) de hexosa.

Sin embargo, en la fermentación de hidrolizados de tallos de girasol utilizando esta misma levadura, el mismo dispositivo experimental (reactores tipo tanque agitado), 30°C y una velocidad de agitación de 500 rpm (Martínez *et al.*, 2012), el valor de μ_m fue menor (0,008 h⁻¹).

Una vez representada x vs t , Fig. 4.51, y establecida la fase de desaceleración en el experimento FHP-pH2, se ha determinado P_b por ajuste por mínimos cuadrados de los datos de concentración de biomasa frente a tiempo de proceso a la Ec. 4.16, obteniéndose un valor en torno a 0,008 g dm⁻³ h⁻¹ ($r^2 = 0,970$). Este resultado es muy próximo a los determinados en la fermentación de azúcares puros en esta investigación, usando las mismas condiciones de operación, Tabla 4.22. También, este valor de P_b es muy próximo al obtenido en la fermentación de hidrolizados de tallos de girasol con *H. polymorpha*, la misma configuración de reactor, 30°C y una velocidad de agitación de 500 rpm, (Martínez *et al.*, 2012), donde $P_b = 0,0091$ g dm⁻³ h⁻¹.

En este experimento, la máxima concentración de biomasa, 2,18 g dm⁻³, se alcanzó transcurridas 338 h de cultivo, existiendo en el medio una concentración final de AT en torno a 15,25 g dm⁻³ y siendo 4,5 el valor de pH .

En lo que se refiere a la evolución del pH , en este experimento (FHP-pH2) se ha observado un mantenimiento del valor inicial (4,5) a lo largo de todo el proceso de fermentación. En efecto, sólo en el período final del proceso (a partir de 358,5 h) se detectó una ligera disminución del pH con respecto al valor inicial, manteniéndose en torno a 4,3 el pH mínimo alcanzado.

4.3.1.2 Consumo de sustrato

Este consumo ha sido estudiado a través de la determinación del rendimiento global en biomasa ($Y_{x/AT}^G$) basado en el consumo de azúcares totales y la velocidad específica de consumo de sustrato (q_s).

Si el rendimiento permanece constante a lo largo del experimento, una representación de los valores de $(x-x_0)$ a distintos tiempos frente a (AT_0-AT) debería conducir a una recta de pendiente $Y_{x/AT}$ y de ordenada en el origen nula. Aunque no fuese nula, el rendimiento obtenido mediante la pendiente correspondería a todo el experimento y por tanto, para distinguirlo del instantáneo, se podría denominar rendimiento global, $Y_{x/AT}^G$, Fig. 4.52.

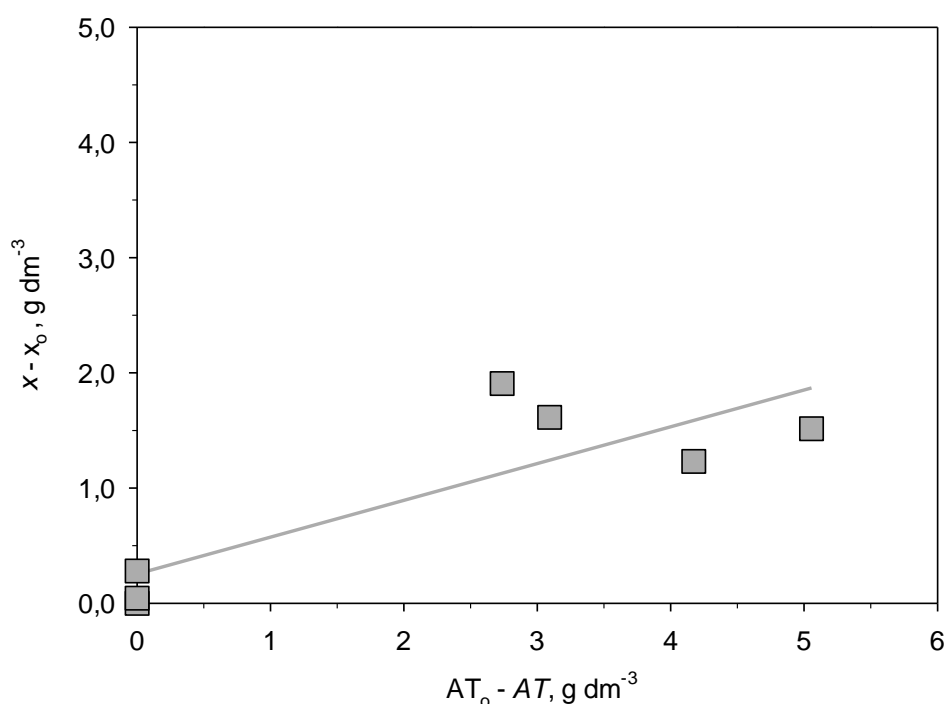


Figura 4.52 Determinación del rendimiento global en biomasa ($Y_{x/AT}^G$), según la Ec. 4.17, en la fermentación del hidrolizado a presión con *H. polymorpha* (FHP-pH2), a 45°C, $pH_0 = 4,5$, y con una concentración inicial de inóculo de $0,27\ g\ dm^{-3}$.

En este experimento (FHP-pH2) se alcanzó un valor de $Y_{x/AT}^G$, 0,56 g g⁻¹ ($r^2 = 0,950$), ligeramente superior al obtenido para $Y_{x/ART}^G$, 0,45 g g⁻¹, durante la fermentación de 25 g dm⁻³ de L-arabinosa con *H. polymorpha*, en agitador orbital, a 35°C, pH_o = 3,5 y en condiciones de microaeración, Tabla 4.23 (Expto. FS2T3-pH1). No obstante, este rendimiento es muy superior al alcanzado en estas series experimentales de fermentación de pentosas con *H. polymorpha* (sección 4.2) bajo las mismas condiciones de operación; en efecto, a 45°C, pH_o = 4,5 y en condiciones microaeróbicas, se alcanzó un valor para $Y_{x/ART}^G$ de 0,12 y 0,19 g g⁻¹ cuando la pentosa utilizada fue D y L-arabinosa, respectivamente (Exptos. FS1T5-pH2 y FS2T5-pH2), Tabla 4.30.

Con el fin de determinar la velocidad específica de consumo de sustrato, se ha aplicado inicialmente el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos. La ecuación que ofrece una mejor reproducibilidad de los datos de sustrato en mayores intervalos de tiempo en los resultados obtenidos con *H. polymorpha* fue de nuevo la Ec. 4.19, pero referida en este caso a la variación de la concentración de azúcares totales y monosacáridos. Tras linealizar esta ecuación, Ec. 4.20, se obtuvieron los parámetros α y β en cada uno de los casos, Fig. 4.53.

En general, en la fermentación de hidrolizado a presión con *H. polymorpha*, en condiciones microaeróbicas, 45°C y pH_o = 4,5 (Expto. FHP-pH2) se observa que la concentración de sustrato disminuye muy lentamente en las primeras horas del cultivo para, a continuación, descender bruscamente hasta que se encuentra muy agotado, Fig. 4.54. No obstante, el consumo de arabinosa se mantiene en esta primera etapa, no sufriendo este descenso acusado de concentración; en efecto, partiendo de una contenido inicial en arabinosa de 1,66 g dm⁻³ se determinó una concentración en este monosacárido de 0,41 g dm⁻³ al final del bioproceso (t = 455,5 h). Este comportamiento es similar al observado durante la fermentación de medios de cultivos conteniendo azúcares puros, sección 4.2.

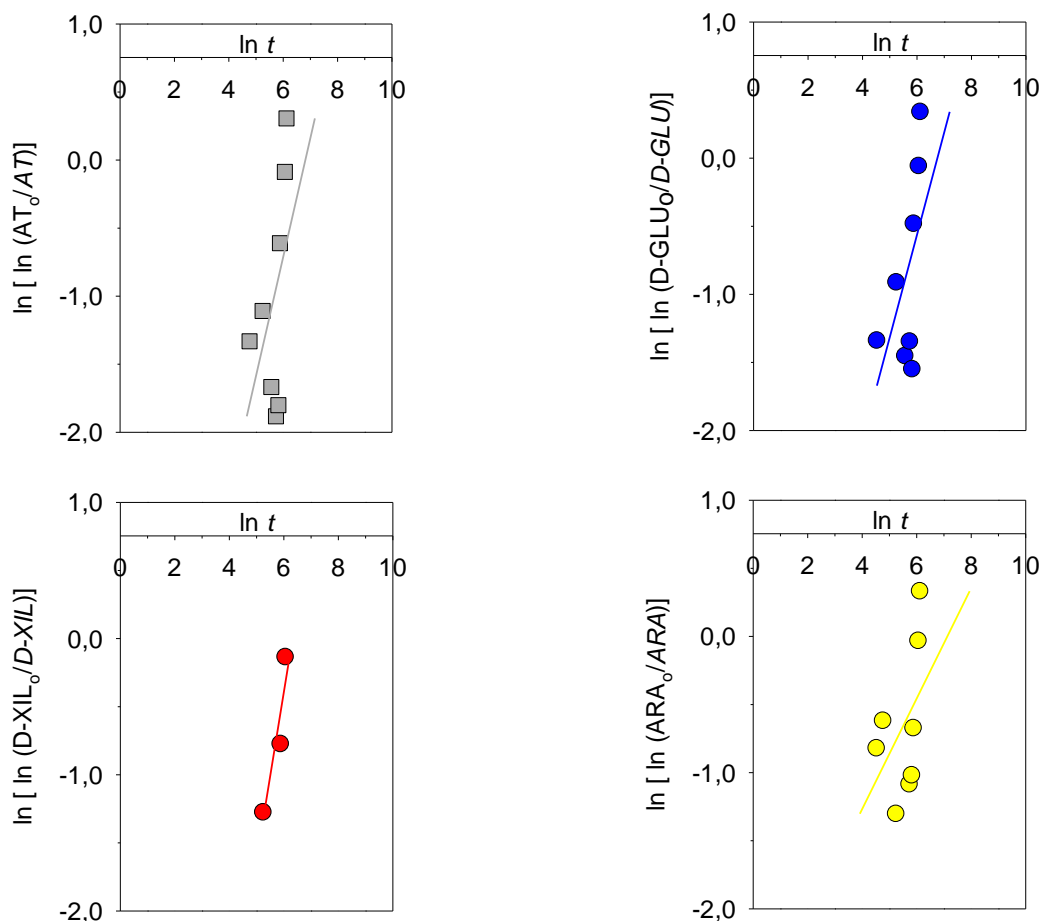


Figura 4.53 Ajuste a la Ec. 4.20 para la determinación de la velocidad específica de consumo de sustrato (azúcares totales, D-glucosa, D-xilosa y arabinosa) en la fermentación del hidrolizado a presión con *H. polymorpha* (FHP-pH2), a 45°C, $pH_0 = 4,5$, y con una concentración inicial de inóculo de $0,27 \text{ g dm}^{-3}$.

Una vez obtenidos los parámetros α y β , se puede comprobar la bondad del ajuste recalculando los valores de AT , $D-GLU$, $D-XIL$ y ARA mediante la ecuación 4.19. Se observa que para el experimento FHP-pH2 la reproducción es aceptable en todo el intervalo de tiempo, Fig. 4.54 (línea continua).

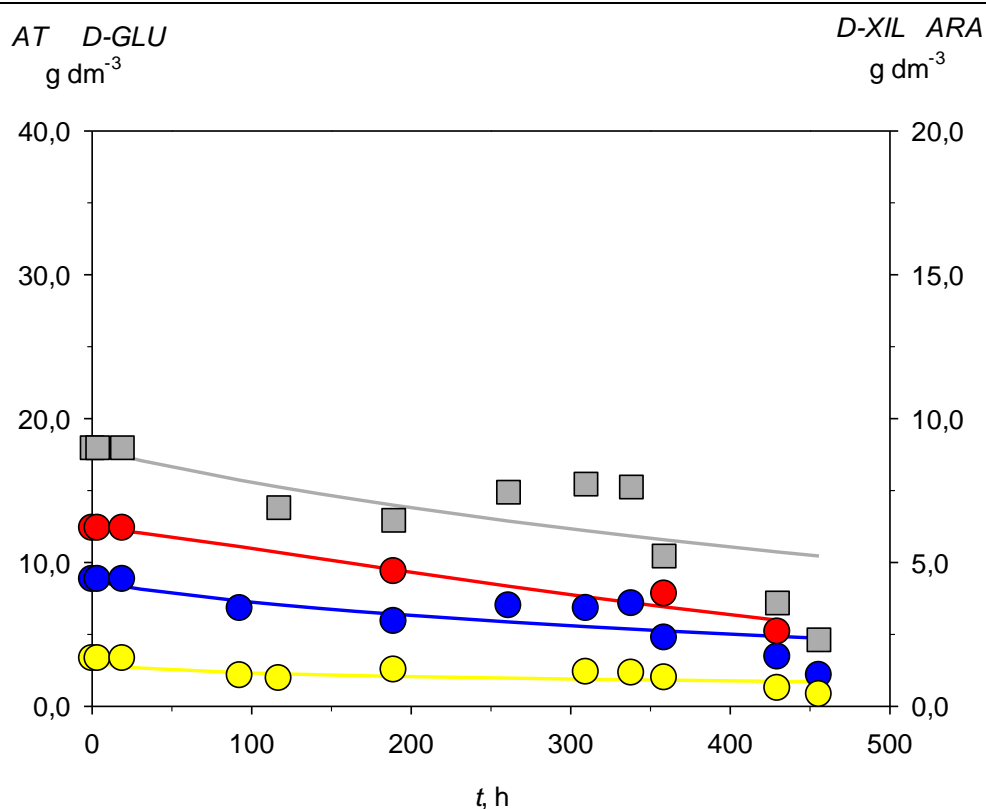


Figura 4.54 Consumo de azúcares totales (■), D-glucosa (●), D-xilosa (●) y arabinosa (●) en la fermentación del hidrolizado a presión con *H. polymorpha* (FHP-pH2), a 45°C, pH₀ = 4,5, y con una concentración inicial de inóculo de 0,27 g dm⁻³. La línea continua reproduce la Ec. 4.19 del mismo cultivo.

A partir de la Ec. 4.21, y haciendo uso de los parámetros α y β , se determinó las velocidades específicas de consumo de sustrato en función del tiempo (q_s^D), Fig. 4.55. En general, se observa una disminución de la velocidad en el transcurso del cultivo.

Los valores de la velocidad específica de consumo referidos a arabinosa a lo largo del cultivo fueron inferiores a los determinados para D-glucosa y D-xilosa; en efecto, tras 261 h bioproceso se alcanzó un valor de q_s^D , 0,43 mg g⁻¹ h⁻¹, 10 veces inferior al determinado para D-glucosa y D-xilosa, Fig. 4.55. En general, la velocidad específica determinada ha sido de menor orden a la alcanzada en los experimentos de fermentación de pentosas con *H. polymorpha* en las mismas condiciones de operación (45°C, pH₀ = 4,5 y microaeración por vórtice de agitación) y tras el mismo tiempo de cultivo. En efecto, utilizando D-arabinosa como sustrato (Expto. FS1T5-pH2) y tras 100 h de proceso, se determinó un valor para la

velocidad específica de consumo de sustrato, $0,11 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, muy superior al obtenido en la fermentación del hidrolizado a presión, $0,65 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (referido a consumo de arabinosa).

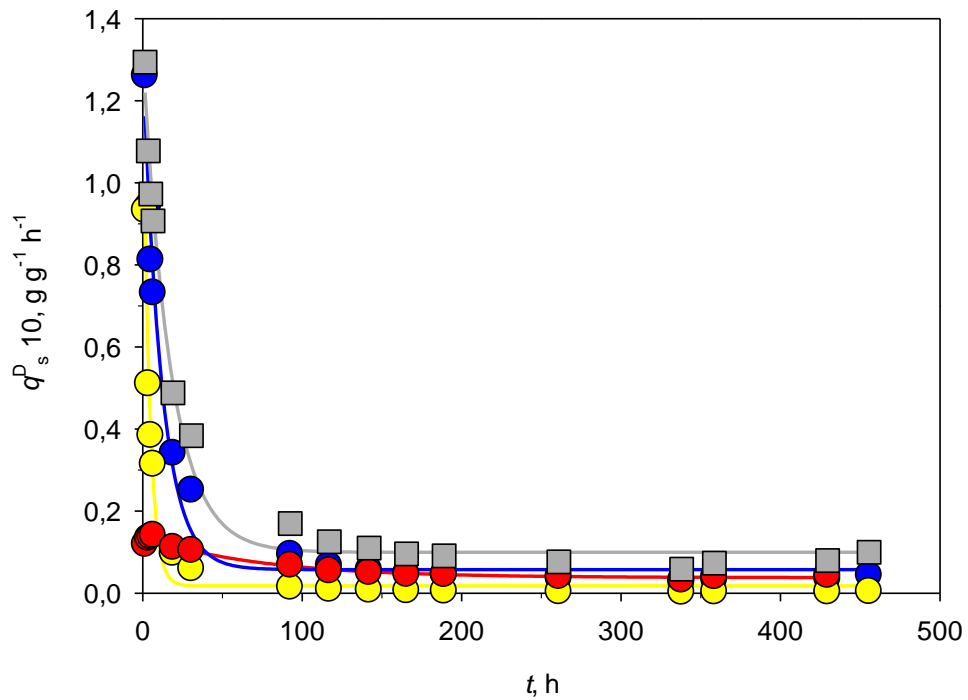


Figura 4.55 Velocidades específicas de consumo de sustrato q_s^D (azúcares totales ■, D-glucosa ●, D-xilosa ● y arabinosa ●), en la fermentación del hidrolizado a presión con *H. polymorpha* (FHP-pH2), a 45°C , $\text{pH}_0 = 4,5$, y con una concentración inicial de inóculo de $0,27 \text{ g dm}^{-3}$.

Cuando el rendimiento en biomasa permanece constante en el transcurso del experimento, y además se admite que no existe mantenimiento celular, es decir, $Y_{x/AT} = Y_{x/AT}^G$, la velocidad específica de consumo de sustrato referida a azúcares totales puede ser calculada usando el método integral de tratamiento de datos cinéticos, Ec. 4.22. En general, se observa una aceptable concordancia entre los valores de las velocidades específicas de consumo de sustrato evaluados por los métodos diferencial (q_{AT}^D) e integral (q_{AT}).

4.3.1.3 Formación de bioproductos

Los bioproductos mayoritarios formados durante la fermentación de hidrolizado a presión con *H. polymorpha*, a 45°C, $\text{pH}_0 = 4,5$ y en condiciones de microaeración (FHP-pH2), han sido xilitol, arabitol, y etanol. Las concentraciones máximas alcanzadas en etanol y arabitol, 0,11 y 0,17 g dm^{-3} , fueron inferiores a la máxima obtenida en el caso de xilitol, 0,44 g dm^{-3} (Tabla C.1, Anexo C.1)

En lo que se refiere a la concentración de ácido acético, no se han detectado concentraciones muy elevadas durante la fermentación, siendo 1,84 g dm^{-3} el valor más alto detectado tras 3,5 h de cultivo; posteriormente su concentración disminuye con el tiempo lo cual indica que la levadura lo está consumiendo usándolo como sustrato (Tabla C.1, Anexo C.1). En lo que se refiere al índice de inhibición se observa que los valores más elevados se determinan al comienzo del experimento y posteriormente se detecta una disminución progresiva que fácilmente se ajusta a una relación lineal según Ec. 4.33, (Fig. 4.56).

$$I_1 = -0,358 t + 218,959 \quad r^2 = 0,988 \quad [4.33]$$

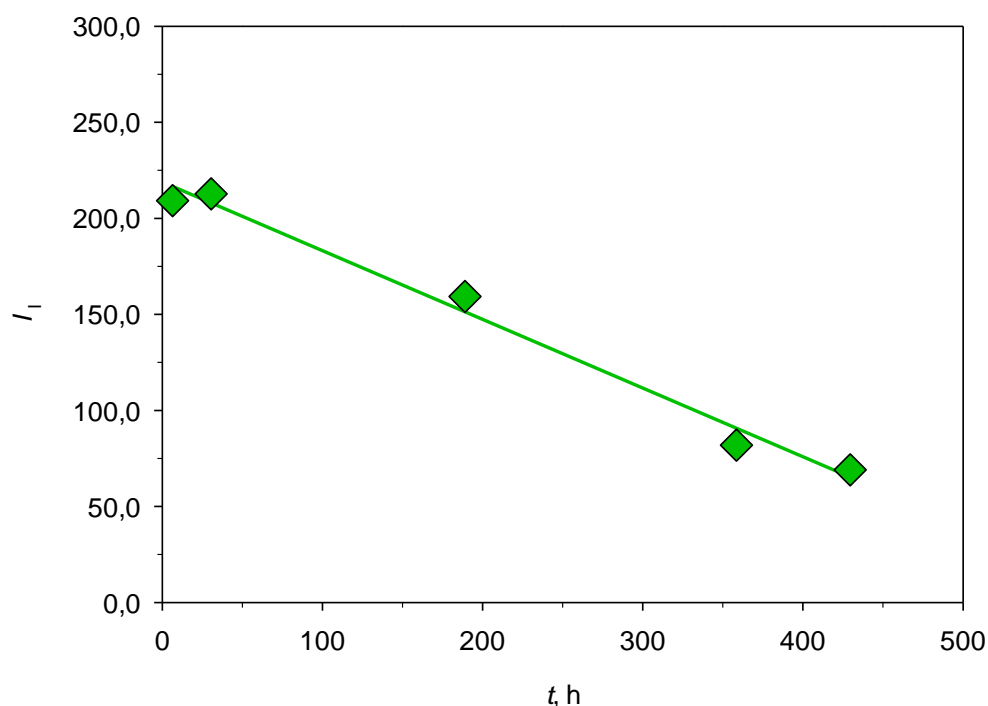


Figura 4.56 Evolución del índice de inhibidores vs tiempo en el experimento FHP-pH2 con *H. polymorpha*, a 45°C, en condiciones de microaeración, $\text{pH}_0 = 4,5$, y con una concentración inicial de inóculo de 0,27 g dm^{-3} .

Al igual que con el ácido acético, considerando que se determina una disminución de la concentración del índice de inhibición, por tanto de las concentraciones de los principales compuestos inhibidores (ácido acético, furfural y HMF), cabría pensar que también el furfural e 5-(hidroximetil)-2-furaldehído es consumido por *H. polymorpha*. Este hecho pone de manifiesto, que el efecto de la inhibición en el cultivo disminuye con el tiempo de proceso.

La formación de bioproductos ha sido estudiada a través de la determinación de los siguientes parámetros: velocidades específicas de formación de arabitol (q_{Ar}) y etanol (q_E), así como rendimientos instantáneos en arabitol referido a azúcares totales y arabinosa ($Y_{Ar/AT}$ y $Y_{Ar/ARA}$) y en etanol referido a azúcares totales ($Y_{E/AT}$).

➤ Velocidad específica de formación de bioproductos

Para el cálculo de la velocidad de producción de arabitol, inicialmente es preciso determinar Q_{Ar} como pendiente de la representación de los datos Ar vs t , Fig. 4.57. Durante la fermentación de hidrolizado a presión con *H. polymorpha* a 45°C, pH inicial constante (4,5), y en condiciones microaeróbicas, la productividad volumétrica en arabitol, 0,6 mg dm⁻³ h⁻¹, se prolonga hasta tiempos cercanos a las 190 h de bioproceso, Fig. 4.57. Tras determinar Q_{Ar} se calcula las velocidades específicas de formación de arabitol por el método diferencial, observándose una disminución de q_{Ar}^D a medida que avanza el tiempo de cultivo, Tabla 4.38.

En general, la velocidad específica de formación de arabitol determinada en la fermentación del hidrolizado a presión con *H. polymorpha* (Expto. FPH-pH2) es inferior a la determinada durante la fermentación de azúcares sintéticos utilizando la misma levadura, Sección 4.2. En efecto, bajo las mismas condiciones de operación (45°C, pH_o = 4,5 y condiciones microaeróbicas) y utilizando L-arabinosa como sustrato (Expto. FS2T5-pH2) se alcanzó un valor de q_{Ar}^D , 1,0 mg g⁻¹ h⁻¹, superior al obtenido en este experimento FHP-pH2, 0,3 mg g⁻¹ h⁻¹, tras un periodo de cultivo próximo a las 190 h.

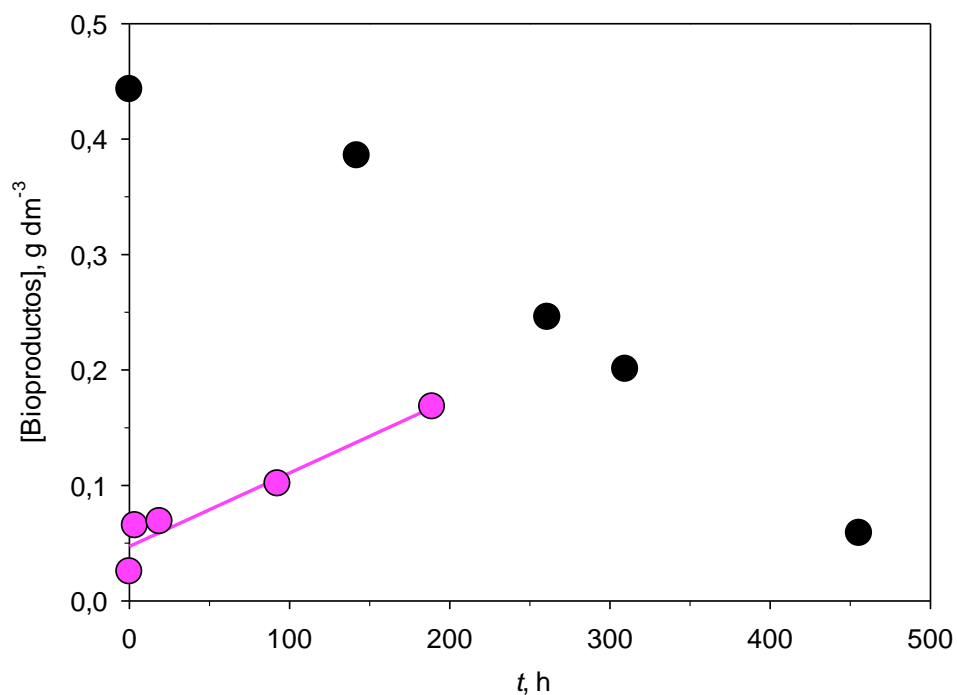


Figura 4.57 Ajuste de la concentración de arabitol (●) y xilitol (●) frente al tiempo. Cálculo de la velocidad específica de formación de arabitol (q_{Ar}^D) en la fermentación del hidrolizado a presión con *H. polymorpha* (FHP-pH2), a 45°C, $pH_o = 4,5$, y con una concentración inicial de inóculo de 0,27 g dm⁻³.

Tabla 4.38

FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADO A PRESIÓN CON *H. polymorpha*.

Velocidades específicas de formación de arabitol (q_{Ar}^D y q_{Ar}) y etanol (q_E^D y q_E)

Experimento FHP-pH2, $T = 45^\circ\text{C}$, $pH_o = 4,5$ y condiciones de microaeración

Fase	t, h	q_{Ar}^D 10 g g ⁻¹ h ⁻¹	q_{Ar} 10 g g ⁻¹ h ⁻¹	q_E^D 10 g g ⁻¹ h ⁻¹	q_E 10 g g ⁻¹ h ⁻¹
EXP	0,0	0,024	0,029	—	0,638
EXP	1,5	0,022	0,029	0,729	0,638
EXP	3,5	0,020	0,029	0,505	0,638
EXP	5,0	0,019	0,029	0,422	0,638
LIN	19,0	0,012	0,011		
LIN	30,5	0,010	0,010		
LIN	117,0	0,004	0,004		
LIN	189,0	0,003	0,003		

A partir de la representación de los valores arabitol a lo largo del tiempo frente al incremento neto de biomasa, se determinó la productividad global en arabitol, $0,079 \text{ g g}^{-1}$, Fig. 4.57. Con este valor de $Y_{Ar/x}^G$ se determinó la velocidad específica de producción de arabitol por el método integral, observándose una buena concordancia entre los valores evaluados por los métodos diferencial e integral, Tabla 4.38.

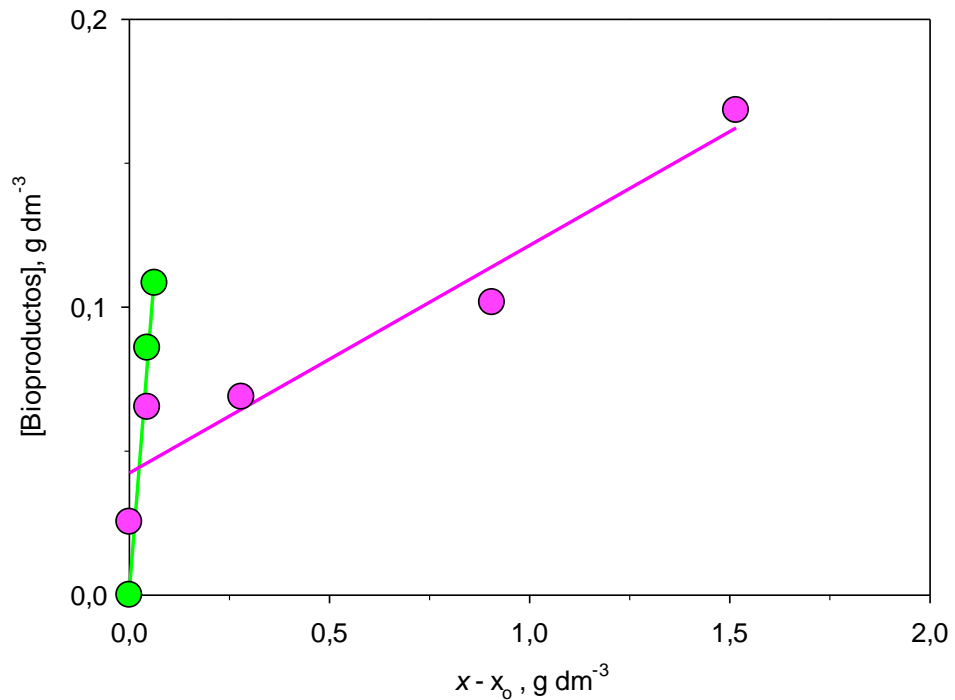


Figura 4.58 Determinación de la productividad en arabitol ($Y_{Ar/x}^G$ ●) mediante la Ec. 4.25, y en etanol ($Y_{E/x}^G$ ●) según Ec. 4.37, en la fermentación del hidrolizado a presión con *H. polymorpha* (FHP-pH2), a 45°C , $\text{pH}_0 = 4,5$, y con una concentración inicial de inóculo de $0,27 \text{ g dm}^{-3}$.

La velocidad específica de producción de etanol, se define según la Ec. 4.34,

$$q_E = \frac{1}{x} \frac{dE}{dt} \quad [4.34]$$

Con objeto de calcular la productividad volumétrica de etanol (Q_E), se han ensayado diferentes ecuaciones empíricas con el fin de ajustar los datos experimentales. Entre estas expresiones empíricas, la que permite obtener una mejor reproducibilidad de los datos de la

concentración de etanol en mayores intervalos de tiempo en los resultados obtenidos con *H. polymorpha* ha sido la Ec. 4.35,

$$\frac{E_M}{E_M - E} = A t^B \quad [4.35]$$

donde E_M representa la concentración máxima de etanol alcanzable, basada en el rendimiento de Gay-Lussac, es decir, si el rendimiento de la transformación de azúcares totales en etanol fuese teórico. A partir de la linealización de la ecuación 4.34, se obtiene la Ec. 4.36,

$$\ln\left(\ln\frac{E_M}{E_M - E}\right) = B \ln t + \ln(\ln A) \quad [4.36]$$

y mediante ajustes por mínimos cuadrados de los valores del primer miembro frente a los del logaritmo neperiano del tiempo, los parámetros empíricos (A y B) pueden ser determinados, puesto que para $t = 0$ h, $E_0 \rightarrow 0$. Una vez evaluados estos parámetros empíricos, a partir de la Ec. 4.35, se puede determinar analíticamente dE/dt , y por tanto, sustituyendo en la Ec. 4.34, obtener la expresión para la velocidad específica de producción de etanol en función del tiempo, Ec. 4.37,

$$q_E^D = \frac{E_M B (\ln A) (t^{B-1}) (A \cdot t^B)}{x} \quad [4.37]$$

donde se sustituye la concentración de biomasa, x , por el valor correspondiente al tiempo considerado.

En la fermentación del hidrolizado a presión con *H. polymorpha* (Expto. FPH-pH2) la productividad volumétrica en etanol, $14,14 \text{ mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, es considerablemente superior a Q_{Ar} ($0,6 \text{ mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$), abarcando únicamente el período inicial del bioproceso, es decir, las 5 primeras horas de cultivo. Al igual que en el caso del arabitol, se observa una disminución de q_E^D a lo largo del tiempo, Tabla 4.38. No obstante, si se comparan la velocidad de formación de arabitol y etanol, transcurridas las mismas horas de cultivo, se detecta que los valores de q_E^D son superiores a los determinados para q_{Ar}^D a lo largo de todo el proceso, Fig. 4.59; efectivamente, transcurridas 5 h de fermentación, el valor que se determinó de q_E^D , $42,2 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, fue superior al valor alcanzado para q_{Ar}^D , $1,8 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Durante la fermentación de hidrolizados de tallos de girasol utilizando esta misma levadura, con reactores tipo tanque agitado, 30°C y una velocidad de agitación de 500 rpm

(Martínez *et al.*, 2012), el valor de q_E^D tras 30 h de proceso fue $14 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, fue del mismo orden al determinado durante la fermentación de hidrolizado a presión a 45°C (Expto. FHP-pH2).

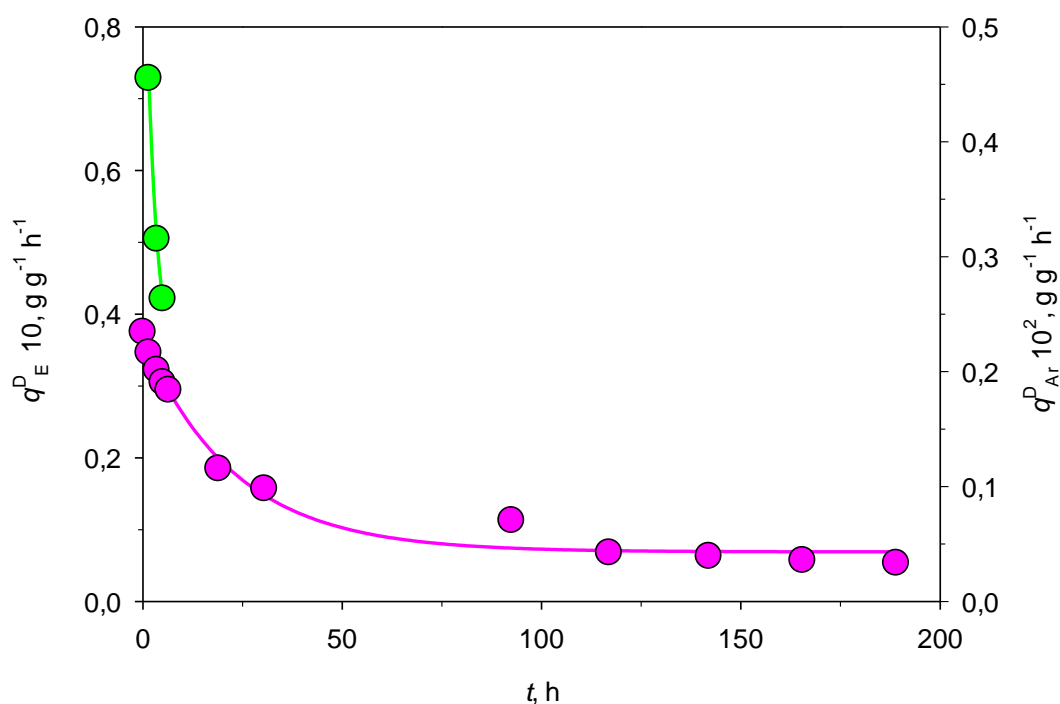


Figura 4.59 Velocidad específica de formación de arabitol (q_{Ar}^D ●) y etanol (q_E^D ●) en la fermentación del hidrolizado a presión con *H. polymorpha* (FHP-pH2), a 45°C , $\text{pH}_0 = 4,5$, y con una concentración inicial de inóculo de $0,27 \text{ g dm}^{-3}$.

Por otra parte, la productividad instantánea en etanol se define según Ec. 4.38.

$$Y_{E/x} = \frac{dE}{d(x - x_0)} \quad [4.38]$$

Si este parámetro permanece constante durante la fermentación, y en experimentos donde no exista concentración en etanol a tiempo cero, una representación de E vs $(x-x_0)$ daría lugar a una línea recta cuya pendiente se obtendría la productividad global en etanol, $Y_{E/x}^G$, Fig. 4.58. En este experimento de fermentación con *H. polymorpha* (Expto. FH-pH2) se ha alcanzado un valor de $Y_{E/x}^G$, $1,75 \text{ g g}^{-1}$, muy superior al obtenido en el caso de arabinosa, $0,08 \text{ g g}^{-1}$, Fig. 4.58.

Durante la fermentación de hidrolizados de tallos de girasol utilizando esta misma levadura, y biorreactores tipo tanque agitado, operando a 30°C y con una velocidad de agitación de 500 rpm (Martínez *et al.*, 2012), se determinó un valor de $Y_{E/x}^G$, 1,16 g g⁻¹, ligeramente inferior al obtenido en este experimento.

A partir de la definición de velocidad específica de crecimiento (Aiba *et al.*, 1973), usando las ecuaciones 4.33 y 4.37, y admitiendo la ausencia de mantenimiento celular, la velocidad específica de producción de etanol puede expresarse según Ec. 4.39,

$$q_E = Y_{E/x}^G \mu \quad [4.39]$$

A partir de la productividad global en etanol ($Y_{E/x}^G$), Fig. 4.58, se determinó la velocidad específica de formación de bioproductos por el método integral, Tabla 4.38, observándose una buena concordancia entre los valores obtenidos de velocidades específicas de producción de bioproductos evaluados por los métodos diferencial e integral. Cabe destacar que en este experimento FHP-pH2, q_E sólo se pudo determinar en la fase exponencial debido a que el período de producción de este bioproducto fue muy corto y abarcó esa fase inicial.

En lo que se refiere a la formación de xilitol, la máxima concentración, 0,44 g dm⁻³, se alcanzó al inicio del proceso (t = 0 h), disminuyendo de forma lineal hasta alcanzar un valor de 0,06 g dm⁻³ tras 455,5 h de cultivo.

➤ Rendimiento en bioproductos

A partir de la representación de los valores de Ar a distintos tiempos frente a (AT_o-AT) así como Ar versus (ARA_o-ARA), Fig. 4.61, se obtienen en ambos casos una recta cuya pendiente corresponde a $Y_{AT/AT}^G$ y $Y_{AT/ARA}^G$, respectivamente, según la Ec. 4.30, Tabla 4.39.

En la fermentación del hidrolizado a presión con *H. polymorpha* a 45°C, pH_o =4,5 y en condiciones de microaeración (Expto. FHP-pH2), el rendimiento global en arabitol alcanzado, basado en el consumo neto de arabinosa, 0,12 g g⁻¹, lógicamente muy superior al referido a azúcares totales, 0,02 g g⁻¹, Tabla 4.39.

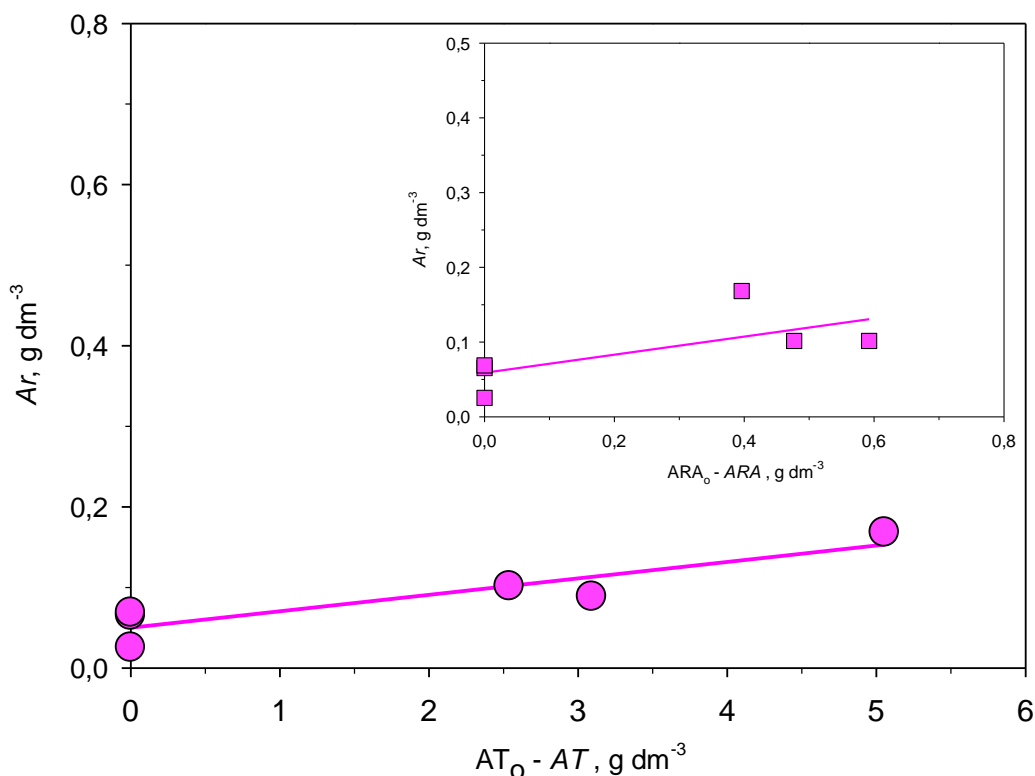


Figura 4.60 Determinación de los rendimientos globales en arabitól ($Y_{Ar/AT}^G$ ● y $Y_{Ar/ARA}^G$ ■) según la Ec. 4.30, en la fermentación del hidrolizado a presión con *H. polymorpha* (FHP-pH2), a 45°C, $pH_0 = 4,5$, y con una concentración inicial de inóculo de $0,27\ g\ dm^{-3}$.

Tabla 4.39
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADO A PRESIÓN CON *H. polymorpha*.
Rendimientos globales en arabitól ($Y_{Ar/AT}^G$ y $Y_{Ar/ARA}^G$) e instantáneo en etanol ($Y_{E/AT}$)
Experimento FHP-pH2, $T=45^\circ C$, $pH_0 = 4,5$ y condiciones de microaeración

$Y_{Ar/AT}^G$ $g\ g^{-1}$	$Y_{Ar/ARA}^G$ $g\ g^{-1}$	t , h	$Y_{E/AT}$ $g\ g^{-1}$
0,020	0,121	189,0	0,022

No obstante, si se comparan estos valores con los obtenidos durante la fermentación de azúcares sintéticos con la misma levadura y en las mismas condiciones de operación, utilizando D ó L-arabinosa como sustrato (Exptos. FS1T5-pH2 y FS2T5-pH2) se obtuvo un valor de $Y_{Ar/AT}^G$, $0,06\ g\ g^{-1}$, superior al determinado en este experimento de fermentación de hidrolizado a presión para $Y_{Ar/AT}^G$, Tabla 4.39.

El valor obtenido para $Y_{AT/ARA}^G$ en la fermentación de hidrolizado a presión con *H. polymorpha* a 45°C, $pH_o = 4,5$ y en condiciones de microaeración, $0,12 \text{ g g}^{-1}$, es superior al rendimiento global determinado por Escalante *et al.* (1990b), $0,064 \text{ g g}^{-1}$, en la fermentación de 30 g dm^{-3} de D-glucosa con *H. polymorpha* a 45°C y $pH = 4,8$; este grupo de investigación utiliza fermentadores de 2 dm^3 de capacidad con una velocidad de agitación de 1.000 rpm e introduciendo aire esterilizado ($1,0 \text{ v/v/min}$), y no explica el mecanismo de formación de arabitol partiendo de una hexosa como es D-glucosa.

De la misma forma que para el arabitol, el rendimiento instantáneo en etanol basado en el consumo neto de azúcares totales ($Y_{E/AT}$), se puede definir según la Ec. 4.40,

$$Y_{E/AT} = \frac{d(E - E_o)}{d(AT_o - AT)} \quad [4.40]$$

de tal forma que si $Y_{E/AT}$ permanece constante a lo largo del experimento, una representación de los valores de $(E - E_o)$ a distintos tiempos frente a $(AT_o - AT)$ debería conducir a una recta de pendiente $Y_{E/AT}^G$. Lógicamente, no se considera la concentración inicial de etanol puesto que a $t = 0 \text{ h}$, $E_o = 0$.

En este caso, no ha sido posible el ajuste de los valores de etanol frente al consumo neto de azúcares totales con lo que únicamente se ha podido determinar el rendimiento instantáneo, siendo máximo tras 189 h de cultivo ($Y_{E/AT} = 0,02 \text{ g g}^{-1}$), Tabla 4.39.

En un estudio previo donde se llevó a cabo la fermentación de hidrolizados de tallos de girasol con *H. polymorpha* en fermentadores discontinuos tipo mezcla perfecta, a 30°C y una velocidad de agitación de 500 rpm (Martínez *et al.*, 2012), se obtuvo un rendimiento global en etanol, $0,14 \text{ g g}^{-1}$, muy superior al obtenido en este experimento.

4.3.2 Influencia de la concentración de inóculo y del pH inicial del cultivo

En el proceso SFS, tanto los enzimas como la levadura actúan de forma simultánea; efectivamente, la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico existente en suspensión en el hidrolizado pretratado, a partir del cual se obtienen azúcares (oligosacáridos y monosacáridos) en disolución, es paralela a la generación de bioproductos mediante la fermentación de los monómeros con *H. polymorpha*. En general, esto lleva como consecuencia que no se observe un comportamiento característico en cuanto al consumo de sustrato ya que a la vez que se genera por parte de la hidrólisis, se consume durante la

fermentación. En definitiva, este comportamiento determina la imposibilidad de ajustar todo el intervalo de tiempo mediante ecuaciones empíricas de mayor o menor complejidad y por tanto la dificultad de evaluar el consumo de sustrato y determinar de forma cuantitativa sus parámetros

En esta serie experimental se llevó a cabo la sacarificación y fermentación del hidrolizado (sólido y líquido) con los enzimas, celulasa y β -glucosidasa, usando la levadura *H. polymorpha*, a 45°C, y en condiciones de microaeración (entrada de aire sólo por el vórtice de agitación, 500 rpm). En este caso, se modificó la concentración de inóculo inicial dentro del reactor ($[I]_{Bo}$) desde 0,11 hasta 0,36 g dm⁻³ para cada una de los valores de pH_o (3,5, 4,5 y 5,5), con el fin de estudiar el efecto de ambas variables en el bioproceso.

Los resultados experimentales obtenidos en cuanto a evolución del *pH*, consumo de sustrato, y formación de bioproductos en el transcurso del proceso SFS se han indicado en las Tablas D.1 a D.13 y se han representado en las Figuras D.1 a D.26 del Anexo D.

4.3.2.1 Evaluación del crecimiento celular

El contaje celular se llevó a cabo en los procesos SFS con una concentración inicial de inóculo de 0,15 y 0,36 g dm⁻³. Una vez obtenidos los datos del número de células por unidad de volumen en cada muestra en el proceso SFS a lo largo del tiempo, *N*, según la Ec. 3.24, una representación de $\ln(N/N_0)$ versus *t*, Fig. 4.61, permite obtener, tras su ajuste lineal, un valor de μ_m , según Ec. 4.32, Tabla 4.40.

Durante los procesos de SFS llevados a cabo a 45°C y *pH* constante, se observa que la velocidad específica máxima de crecimiento en general disminuye con el incremento de la concentración inicial de inóculo. En efecto, a pH_o = 4,5 y $[I]_{Bo}$ = 0,15 g dm⁻³ (Expto. SFS3-pH2a), el valor de μ_m , 0,042 h⁻¹, fue superior al alcanzado cuando la concentración de inóculo aumentó a 0,36 g dm⁻³, Expto. SFS4-pH2, Tabla 4.40. Sólo cuando el proceso se llevó a cabo a pH_o = 3,5 se observó un aumento de μ_m al incrementar el valor de $[I]_{Bo}$ (Tabla 4.40). Por otra parte, en general, cuando la concentración inicial de inóculo se mantuvo constante, al aumentar el pH inicial del cultivo, no se apreció un comportamiento definido. Esto es, durante los procesos de SFS llevados a cabo a 45°C, con una concentración inicial de inóculo de 0,15 g dm⁻³, el valor de μ_m se mantuvo en torno a 0,04 h⁻¹, al modificar el pH_o en el rango de 3,5 a 5,5 (Exptos. SFS3-pH1, SFS3-pH2a, SFS3-pH3), Fig. 4.61.

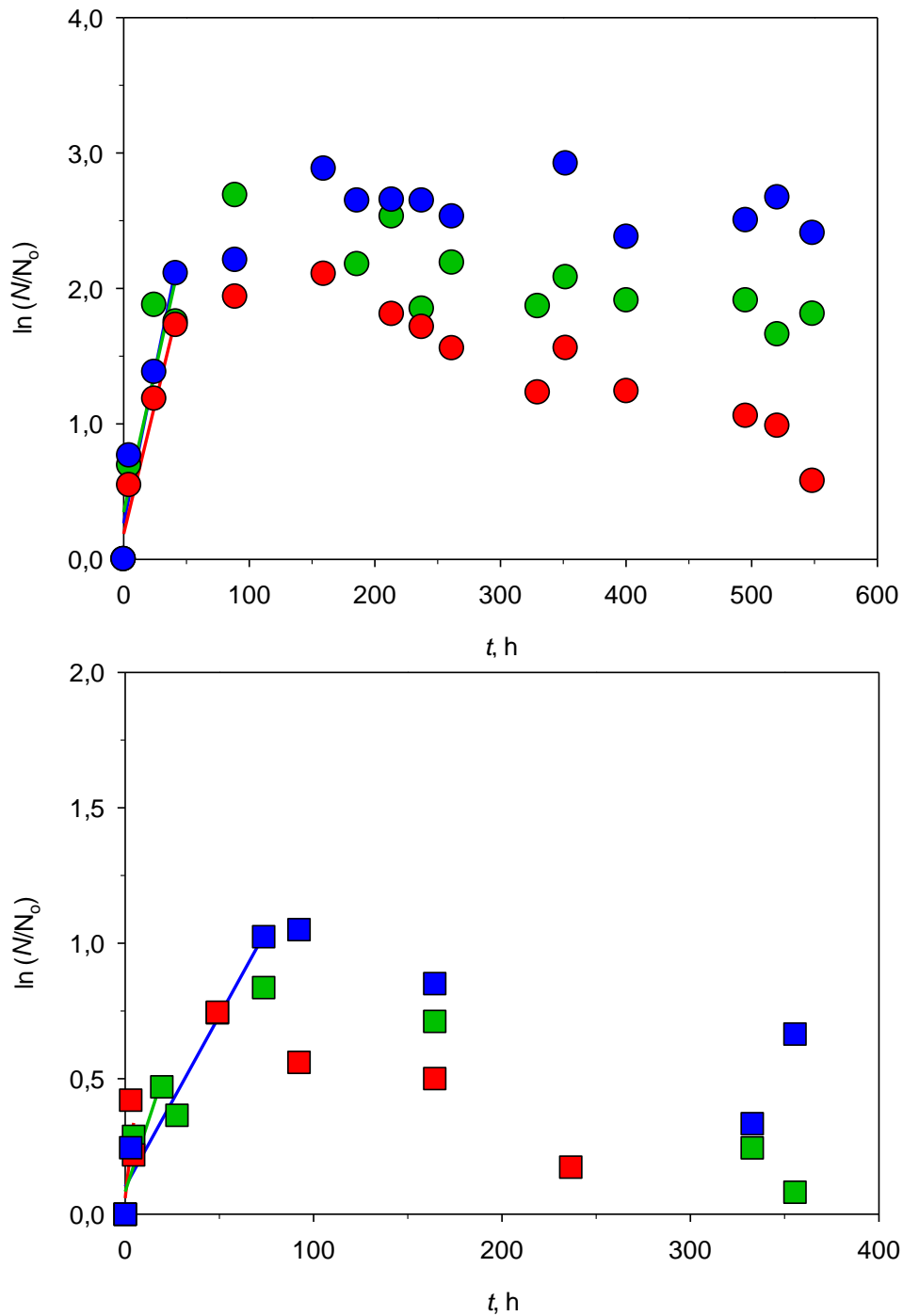


Figura 4.61 Curvas de crecimiento en función del número de células. Determinación de las velocidades específicas máxima de crecimiento según la Ec. 4.32 en los experimentos SFS con *H. polymorpha*, a 45°C y en condiciones de microaeración, variando el pH_0 de 3,5 (rojo), 4,5 (verde) a 5,5 (azul). Concentración inicial de inóculo de $0,15 \text{ g dm}^{-3}$ (círculo) y $0,36 \text{ g dm}^{-3}$ (cuadrado).

Tabla 4.40
 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *H. polymorpha*
 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE INÓCULO ($[I]_{Bo}$) Y DEL pH_o DE CULTIVO
 Velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m)
 Condiciones de microaeración y $T = 45^\circ C$

pH_o	$[I]_{Bo}$ g dm ⁻³	Expto.	μ_m h ⁻¹	r^2
3,5	0,15	SFS3-pH1	0,038	0,955
	0,36	SFS4-pH1	0,062	0,451
4,5	0,15	SFS3-pH2a	0,042	0,789
	0,36	SFS4-pH2	0,021	0,827
5,5	0,15	SFS3-pH3	0,045	0,934
	0,36	SFS4-pH3	0,013	0,962

En los procesos SFS con *H. polymorpha* a 45°C se alcanzaron valores de velocidad específica máxima de crecimiento inferiores a los obtenidos en el caso de fermentación de pentosas utilizando la misma levadura. Efectivamente, mientras que el valor máximo de μ_m determinado durante el proceso SFS no superó el valor de 0,05 h⁻¹, utilizando una concentración inicial de inóculo de 0,15 g dm⁻³ y un $pH_o = 4,5$ y 5,5 (Exptos.SFS3-pH2a y SFS3-pH3), en la fermentación con *H. polymorpha* a la misma temperatura, el valor mínimo de μ_m alcanzado, 0,12 h⁻¹, utilizando 25 g dm⁻³ de D-arabinosa y un $pH_o = 3,5$ (FS1T5-pH1), fue superior. Este hecho indica que en estos procesos de SFS, correspondientes a esta serie, existe inhibición por sustrato.

De igual forma, los valores alcanzados de velocidad específica máxima de crecimiento en esta serie, Tabla 4.40, son considerablemente inferiores a los obtenidos en trabajos previos a esta investigación, donde el pH_o también fue modificado a temperatura constante. En efecto, en la fermentación de D-xilosa pura con *H. polymorpha* a 30°C, se alcanzó un valor de la μ_m en torno a 0,38, 0,43 y 0,41 h⁻¹, tras modificar el pH_o de 3,5, 4,5 a 5,5, respectivamente (Sánchez *et al.*, 1998). En este caso también se operó con un biorreactor discontinuo, tipo mezcla perfecta, y condiciones de aeración por vórtice (500 rpm).

4.3.2.2 Consumo de sustrato

En la sacarificación y fermentación simultánea, la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico y la generación de bioproductos mediante la fermentación de monómeros con *H. polymorpha* se produce al mismo tiempo. Esta generación simultánea tanto de azúcares como de bioproductos provocó un comportamiento no característico en cuanto al consumo de sustrato y por tanto no fue posible ajustar su evolución, mediante ecuaciones empíricas de mayor o menor complejidad, a lo largo de todo el intervalo de tiempo. De igual forma, por la misma razón, no se pudo determinar la velocidad volumétrica de consumo de sustrato (Q_s^D).

En general, se observa que, a pH_0 constante, las concentraciones máximas alcanzadas de los monosacáridos disminuyen a medida que aumenta la concentración inicial de inóculo ($[I]_{Bo}$), Tablas 4.41 a 4.43. En efecto, en condiciones microaeróbicas, manteniendo las condiciones de temperatura y pH inicial en el biorreactor durante el proceso SFS (45°C y $pH_0 = 3,5$), la concentración de azúcares totales disminuyó desde 35,2 a 10,8 g dm⁻³ cuando se incrementó la, concentración de inóculo inicial desde 0,11 a 0,36 g dm⁻³, Tabla 4.41. De igual forma ocurre a $pH_0 = 4,5$ y 5,5 (Tablas 4.42 y 4.43).

Por otro lado, a 45°C, en condiciones de microaeración y una concentración inicial de inóculo constante, la modificación del pH inicial (3,5, 4,5 y 5,5) no provocó una variación considerable en las concentraciones máximas alcanzadas de los monosacáridos. Efectivamente, a 45°C y $[I]_{Bo} = 0,36$ g dm⁻³ la concentración máxima en azúcares totales se mantuvo constante, próximo a 11,0 g dm⁻³ ante la modificación del pH_0 del medio desde 3,5 a 5,5, Tablas 4.41 a 4.43.

En todas las condiciones de operación, manteniendo 45°C y microaeración, el monosacárido encontrado en mayor concentración fue D-glucosa. En concreto, utilizando una concentración inicial de inóculo de 0,11 g dm⁻³ y un $pH_0 = 5,5$, la concentración máxima alcanzada de D-glucosa fue 26,5 g dm⁻³ tras 18,5 h de proceso SFS. En lo que se refiere a arabinosa, se determinaron unas concentraciones máximas inferiores a 1,7 g dm⁻³ (cultivo realizado a $pH_0 = 3,5$ y $[I]_{Bo} = 0,11$ g dm⁻³).

Tabla 4.41
 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *H. polymorpha*
 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE INÓCULO ($[I]_{Bo}$) Y DEL pH_o DE CULTIVO
 Concentración máxima y mínima de los monosacáridos. Máxima diferencia de concentración
 Condiciones de microaeración, $T = 45^{\circ}C$ y $pH_o = 3,5$

$[I]_{Bo}$, g dm ⁻³	Expto.	Monosacáridos	t, h	C_{max} , g dm ⁻³	t, h	C_{min} , g dm ⁻³	ΔC , g dm ⁻³	Ω , %
0,11	SFS1-pH1	AT	18,5	35,17	164,0	10,28	24,90	70,78
		D-GLU	18,5	24,27	164,0	5,98	18,29	75,35
		D-XIL	18,5	6,9	164,0	2,50	4,40	63,76
		ARA	18,5	1,72	164,0	0,73	0,99	57,33
		D-FRU	210,0	1,30	164,0	0,24	1,06	81,46
		D-GAL	18,5	0,73	164,0	0,38	0,35	47,47
		D-MAN	210,0	0,82	352,5	0,41	0,41	50,12
0,13	SFS2-pH1	AT	103,8	17,52	0,0	4,39	13,13	74,95
		D-GLU	103,8	11,27	0,0	2,17	9,10	80,76
		D-XIL	103,8	3,85	0,0	1,21	2,64	68,64
		ARA	34,3	0,98	0,0	0,59	0,39	39,47
		D-FRU	103,8	0,73	0,0	0,00	0,73	100,00
		D-GAL	34,3	0,46	0,0	0,29	0,17	37,64
		D-MAN	34,3	0,42	0,0	0,13	0,29	68,48
0,15	SFS3-pH1	AT	329,8	18,07	598,5	7,56	10,51	58,15
		D-GLU	329,8	11,69	0,0	3,86	7,84	67,00
		D-XIL	329,8	3,47	598,5	0,75	2,71	78,24
		ARA	329,8	0,99	598,5	0,49	0,50	50,20
		D-FRU	329,8	1,02	598,5	0,30	0,72	70,88
		D-GAL	213,5	0,43	598,5	0,22	0,21	48,25
		D-MAN	329,8	0,48	598,5	0,25	0,23	47,62
0,36	SFS4-pH1	AT	92,3	10,80	164,3	5,57	5,23	48,41
		D-GLU	92,3	6,51	0,0	3,03	3,48	53,41
		D-XIL	92,3	2,36	164,3	1,11	1,24	52,78
		ARA	0,0	1,00	164,3	0,53	0,47	46,69
		D-GAL	92,3	0,40	389,3	0,24	0,16	40,40
		D-MAN	92,3	0,33	389,3	0,22	0,11	32,42
		D-FRU	0,0	0,34	389,3	0,10	0,24	71,64

Tabla 4.42

SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *H. polymorpha*
 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE INÓCULO ($[I]_{Bo}$) Y DEL pH_o DE CULTIVO
 Concentración máxima y mínima de los monosacáridos. Máxima diferencia de concentración
 Condiciones de microaeración, $T = 45^\circ\text{C}$ y $pH_o = 4,5$

$[I]_{Bo}$, g dm ⁻³	Expto.	Monosacáridos	t, h	C_{max} , g dm ⁻³	t, h	C_{min} , g dm ⁻³	ΔC , g dm ⁻³	Ω , %
0,11	SFS1-pH2	AT	18,5	35,80	352,5	12,27	23,53	65,72
		D-GLU	114,0	25,11	0,0	7,71	17,40	69,29
		D-XIL	18,5	6,69	352,5	2,00	4,68	70,07
		ARA	18,5	1,67	352,5	0,77	0,90	53,90
		D-FRU	305,0	1,45	352,5	0,22	1,23	84,59
		D-GAL	18,5	0,75	352,5	0,35	0,40	53,52
		D-MAN	18,5	0,82	352,5	0,32	0,51	61,53
0,13	SFS2-pH2	AT	367,8	21,30	0,0	6,49	14,81	69,53
		D-GLU	367,8	13,81	0,0	3,12	10,69	77,40
		D-XIL	367,8	4,68	0,0	1,86	2,81	60,13
		ARA	103,8	0,99	0,0	0,73	0,27	26,76
		D-FRU	367,8	0,96	0,0	0,13	0,83	86,55
		D-MAN	367,8	0,49	0,0	0,31	0,18	36,50
		D-GAL	103,8	0,48	0,0	0,34	0,14	29,29
0,15	SFS3-pH2a	AT	159,3	16,40	598,5	7,76	8,64	52,67
		D-GLU	159,3	10,64	0,0	4,57	6,07	57,03
		D-XIL	159,3	3,31	598,5	1,42	1,89	57,04
		ARA	0,0	0,94	598,5	0,52	0,42	45,05
		D-FRU	159,3	0,64	495,3	0,24	0,40	62,11
		D-MAN	213,5	0,45	495,3	0,26	0,19	42,22
		D-GAL	159,3	0,45	598,5	0,24	0,21	47,02
	SFS3-pH2b	AT	140,0	19,45	453,5	1,33	18,12	93,17
		D-GLU	140,0	13,59	453,5	0,00	13,59	100,00
		D-XIL	187,0	3,44	453,5	0,80	2,64	76,75
		ARA	140,0	1,28	453,5	0,35	0,93	72,79
		D-FRU	90,5	1,23	453,5	0,00	1,23	100,00
		D-GAL	259,0	0,58	453,5	0,18	0,40	68,79
		D-MAN	187,0	0,52	453,5	0,00	0,52	100,00
0,36	SFS4-pH2	AT	49,0	10,67	389,3	5,31	5,36	50,26
		D-GLU	49,0	6,36	0,0	2,96	3,40	53,46
		D-XIL	49,0	2,35	389,3	1,15	1,20	51,15
		ARA	49,0	0,93	389,3	0,48	0,45	48,70
		D-GAL	49,0	0,36	389,3	0,20	0,16	43,65
		D-MAN	49,0	0,33	389,3	0,20	0,13	39,39
		D-FRU	49,0	0,34	164,3	0,00	0,34	100,00

Tabla 4.43
 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *H. polymorpha*
 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE INÓCULO ($[I]_{Bo}$) Y DEL pH_o DE CULTIVO
 Concentración máxima y mínima de los monosacáridos. Máxima diferencia de concentración
 Condiciones de microaeración, $T = 45^{\circ}C$ y $pH_o = 5,5$

$[I]_{Bo}$, g dm ⁻³	Expto.	Monosacáridos	t, h	C_{max} , g dm ⁻³	t, h	C_{min} , g dm ⁻³	ΔC , g dm ⁻³	Ω , %
0,11	SFS1-pH3	AT	18,5	37,66	352,5	3,60	34,06	90,43
		D-GLU	18,5	26,48	352,5	0,00	26,48	100,00
		D-XIL	18,5	7,18	352,5	2,50	4,69	65,21
		ARA	18,5	1,71	352,5	0,77	0,93	54,60
		D-FRU	18,5	1,03	281,5	0,00	1,03	100,00
		D-GAL	18,5	0,75	352,5	0,33	0,42	56,08
		D-MAN	114,0	0,75	352,5	0,00	0,75	100,00
0,13	SFS2-pH3	AT	34,3	18,61	367,8	6,03	12,59	67,61
		D-GLU	34,3	11,37	367,8	0,35	11,02	96,91
		D-XIL	34,3	4,16	0,0	1,77	2,39	57,40
		ARA	34,3	1,30	0,0	0,72	0,58	44,35
		D-FRU	34,3	0,80	367,8	0,08	0,73	90,51
		D-GAL	34,3	0,52	0,0	0,35	0,18	33,91
		D-MAN	103,8	0,48	367,8	0,12	0,36	75,68
0,15	SFS3-pH3	AT	329,8	19,07	0,0	8,22	10,85	56,89
		D-GLU	329,8	12,19	0,0	3,78	8,41	68,98
		D-XIL	329,8	3,95	598,5	2,02	1,94	49,03
		ARA	159,3	0,96	598,5	0,61	0,34	35,84
		D-FRU	329,8	0,97	88,8	0,34	0,63	65,12
		D-GAL	329,8	0,47	598,5	0,27	0,19	41,08
		D-MAN	329,8	0,54	598,5	0,29	0,25	46,83
0,36	SFS4-pH3	AT	92,3	10,69	164,3	5,45	5,24	48,99
		D-GLU	92,3	6,40	0,0	3,01	3,39	52,99
		D-XIL	92,3	2,35	164,3	1,23	1,12	47,64
		ARA	0,0	0,98	164,3	0,59	0,40	40,22
		D-GAL	92,3	0,37	389,3	0,23	0,14	37,77
		D-MAN	92,3	0,39	389,3	0,21	0,19	47,70
		D-FRU	92,3	0,29	164,3	0,00	0,29	100,00

Con el fin estudiar la presencia de monosacáridos en el medio durante el proceso SFS enfocados a un correcto desarrollo del bioproceso, se ha empleado un parámetro, Ω , definido como la máxima diferencia de concentración de un monosacárido concreto (ΔC) con respecto a su concentración máxima alcanzada en un determinado momento (C_{max}), Ec. 4.41.

$$\Omega = \frac{\Delta C}{C_{\max}} 100 \quad [4.41]$$

siendo ΔC la diferencia entre la concentración máxima (C_{\max}) y mínima (C_{\min}) de dicho monosacárido.

Cuanto menor sea este porcentaje, significará un mejor desarrollo del proceso de sacarificación y fermentación simultánea ya que disminuiría la presencia de azúcares en el medio. El valor mínimo se alcanzó en el caso de D y L-arabinosa, 26,8%, durante el proceso SFS realizado a $pH_0 = 4,5$ y con una concentración inicial en el medio de $0,13 \text{ g dm}^{-3}$ (Expto. SFS2-pH2), Tabla 4.42. No obstante, cuando Ω fue referido a azúcares totales, el porcentaje mínimo, 48,4%, se alcanzó con un valor de pH inicial de 3,5 y $[I]_{B_0} = 0,36 \text{ g dm}^{-3}$ (Expto. SFS4-pH1), Tabla 4.41.

En general, se observa que conforme se aumenta la concentración de inóculo, el valor del parámetro Ω es menor, hecho fácilmente justificable considerando que al haber mayor concentración de biomasa en el medio el consumo de los azúcares es más rápido. Este parámetro presenta elevados valores, prácticamente en todos los casos, superiores al 30,0%, lo que quiere decir que existe un desajuste entre el proceso de hidrólisis enzimática y el bioproceso de fermentación. Es decir, la velocidad de hidrólisis (en relación a la generación de azúcares) es más elevada que el consumo de estos azúcares en el proceso de fermentación. Lógicamente, este hecho indica que se debe operar con una concentración de inóculo superior a la utilizada en esta investigación.

En relación al pH inicial, se detecta que a $pH_0 = 4,5$ el parámetro Ω presenta mayor número de porcentajes menores en los procesos de SFS llevados a cabo, lo que podría indicar que los procesos de hidrólisis y de fermentación están más acoplados.

4.3.2.2 Formación de bioproductos

Los bioproductos mayoritarios formados durante la sacarificación y fermentación simultánea con *H. polymorpha* han sido arabitol, xilitol y etanol. La formación de bioproductos ha sido estudiada a través de la determinación de los siguientes parámetros: productividades volumétricas en arabitol (Q_{Ar}), xilitol (Q_{Xi}) e instantánea en etanol (Q_E^*). De igual forma, se han determinado el rendimiento máximo, referido al sólido seco inicial sometido al pretratamiento a presión, en arabitol ($Y_{Ar/S}$), xilitol ($Y_{Xi/S}$) y etanol ($Y_{E/S}$).

➤ Productividad volumétrica en arabitol

La velocidad de producción de arabitol por unidad de volumen, dAr/dt , se obtiene a partir de la representación de la concentración de arabitol *versus* t , observándose que estos datos experimentales se ajustan de forma aceptable a una ecuación lineal, Fig. 4.62. En definitiva, Q_{Ar} se obtendría de manera sencilla como la pendiente resultante de representar Ar vs t (Fig. 4.62), Tabla 4.44. Sólo en el caso del experimento de sacarificación y fermentación simultánea con *H. polymorpha* a 45°C, $pH_0 = 3,5$ y partiendo de una concentración inicial de inóculo en el biorreactor de $0,36 \text{ g dm}^{-3}$ (Expto. SFS4pH1), no se pudo determinar Q_{Ar} ya que la concentración de arabitol en el medio disminuía a lo largo del tiempo.

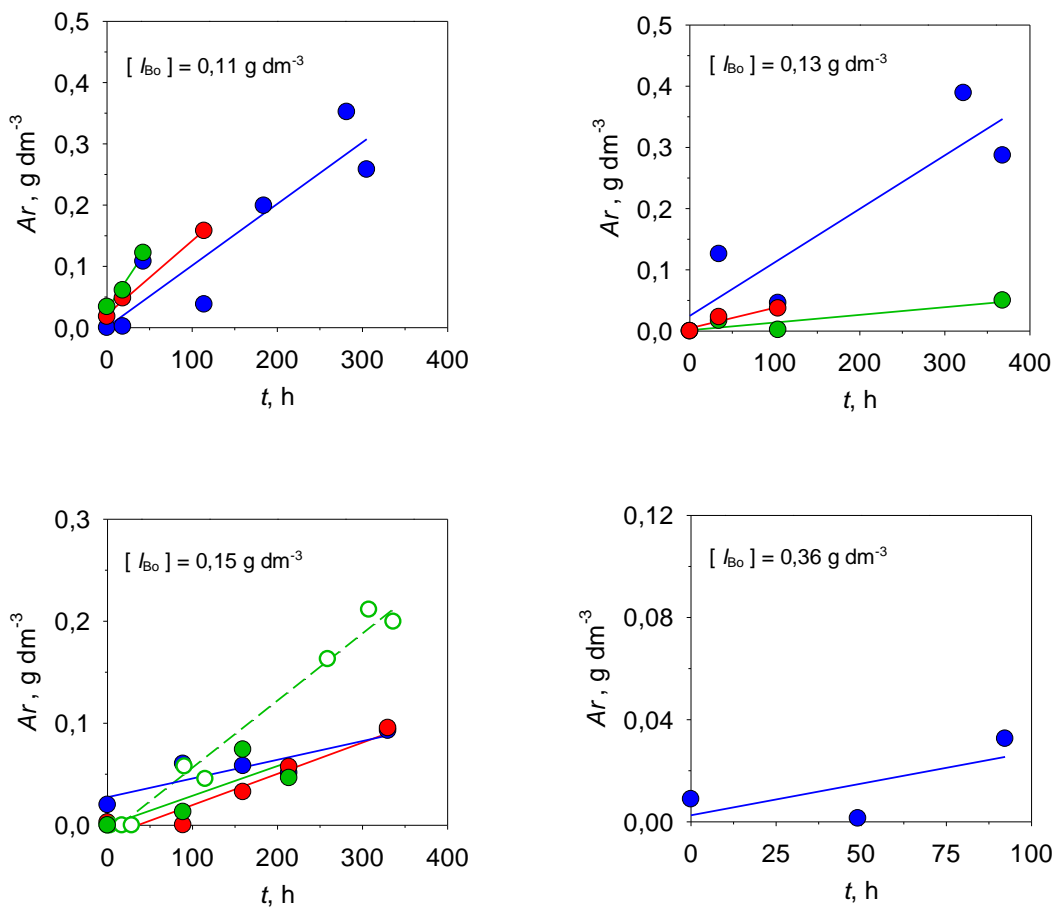


Figura 4.62 Ajuste de la concentración de arabitol frente al tiempo en los experimentos de SFS con *H. polymorpha*, a 45°C y en condiciones de microaeración, modificando el pH_0 desde 3,5 (rojo), 4,5 (verde) a 5,5 (azul). Variación de $[I_{B0}]$ desde 0,11, 0,13, 0,15 hasta $0,36 \text{ g dm}^{-3}$.

En general, se aprecia que en los cultivos realizados a igual pH_0 , Q_{Ar} disminuye con el incremento de la concentración de inóculo inicial. En efecto, en los experimentos microaeróbicos de SFS con *H. polymorpha* realizados a 45°C, $pH_0=5,5$ y $[I]_{Bo} = 0,11 \text{ g dm}^{-3}$, se alcanzó una productividad volumétrica en arabitol, $1,0 \text{ mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, superior a la determinada tras aumentar la concentración de inóculo inicial a $0,36 \text{ g dm}^{-3}$, Tabla 4.44. Por otro lado, si lo que se mantiene constante durante el proceso SFS es $[I]_{Bo}$, la variación del pH_0 conduce a un comportamiento no definido en cuanto a los valores de Q_{Ar} , Fig. 4.62.

Tabla 4.44
SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *H. polymorpha*
EFECTO DE $[I]_{Bo}$ Y DEL pH_0 DE CULTIVO

Productividad volumétrica en arabitol (Q_{Ar}), xilitol (Q_{Xi}) y máxima instantánea en etanol (Q_E^*)
Condiciones de microaeración, $T = 45^\circ\text{C}$

pH_0	$[I]_{Bo}$ g dm^{-3}	Expto.	Q_{Ar} $\text{mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$	Q_{Xi} $\text{mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$	t , h	Q_E^* $\text{mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$
3,5	0,11	SFS1-pH1	1,2	7,0	—	0,0
	0,13	SFS2-pH1	0,3	—	—	0,0
	0,15	SFS3-pH1	0,3	—	237,5	0,1
4,5	0,11	SFS1-pH2	2,1	27,7	305,0	0,0
	0,13	SFS2-pH2	0,1	—	—	0,0
	0,15	SFS3-pH2a	0,3	—	—	0,0
		SFS3-pH2b	0,7	—	307,5	25,8
5,5	0,11	SFS1-pH3	1,0	—	210,0	19,1
	0,13	SFS2-pH3	0,9	—	367,8	26,9
	0,15	SFS3-pH3	0,2	—	159,3	0,3
	0,36	SFS4-pH3	0,3	5,0	389,3	0,9

En general, la productividad volumétrica alcanzada en arabitol durante los procesos SFS fue inferior a la obtenida en la fermentación de pentosas con *H. polymorpha*, bajo las mismas condiciones de operación (45°C y microaeración). No obstante, durante la sacarificación y fermentación simultánea con *H. polymorpha*, $[I]_{Bo} = 0,11 \text{ g dm}^{-3}$ y $pH_0 = 4,5$, se alcanzó un valor de Q_{Ar} , $2,1 \text{ mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, similar a la obtenida en el proceso de fermentación de L-arabinosa en las mismas condiciones de operación (Expto. FS2T5-pH2).

En un estudio sobre la producción de arabitol mediante la fermentación de D-glucosa con *H. polymorpha*, a pH constante (4,8), 45°C y 1.000 rpm (Escalante *et al.*, 1990b), se alcanzó

una productividad volumétrica en arabitol de $0,357 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ tras 42 h de fermentación, valor muy superior a las obtenidas en esta serie de experimental de sacarificación y fermentación simultánea con *H. polymorpha*, Tabla 4.44.

➤ Productividad volumétrica en xilitol

Como en el caso del arabitol, Q_{x_i} se obtendría tras representar X_i vs t , como la pendiente resultante del ajuste lineal (Fig. 4.63), Tabla 4.44.

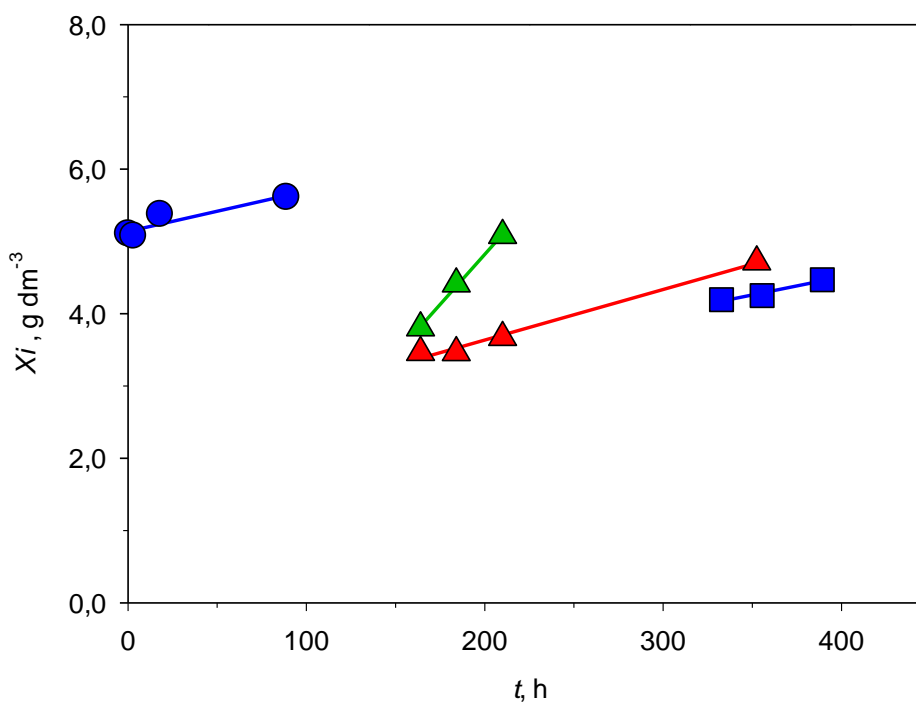


Figura 4.63 Ajuste de la concentración de X_i frente al tiempo en los experimentos de SFS con *H. polymorpha*, a 45°C y en condiciones de microaeración, modificando el pH_0 desde 3,5 (rojo), 4,5 (verde) a 5,5 (azul). $[I]_{B_0} = 0,11 \text{ g dm}^{-3}$ (Δ), Exptos. SFS1-pH1 y SFS1-pH2; $0,15 \text{ g dm}^{-3}$ (\circ), Expto. SFS3-pH3; $0,36 \text{ g dm}^{-3}$ (\square) Expto. SFS4-pH3.

En esta serie experimental, en general, no se ha podido determinar Q_{x_i} ya que, excepto en los experimentos realizados con $[I]_{B_0} = 0,11 \text{ g dm}^{-3}$ a $\text{pH}_0 = 3,5$ y $4,5$ respectivamente, así como $[I]_{B_0} = 0,36 \text{ g dm}^{-3}$ y $5,5$ de pH_0 se produjo un consumo del xilitol producido en el bioproceso y de forma simultánea a su generación. Este hecho es fácilmente justificable si se considera la ruta metabólica de producción de etanol establecida para levaduras no tradicionales donde el xilitol es un producto intermedio (Apartado 2.6.3). De forma que si experimentalmente se detecta disminución de la concentración de xilitol con el tiempo

(consumo del mismo por la levadura) paralelamente se observa incremento de la concentración de etanol, circunstancia que se ha puesto claramente de manifiesto en algunos procesos de esta serie, Fig. 4.64.

En la fermentación de mezclas de D-glucosa y D-xilosa con *C. tropicalis* a 30°C utilizando un biorreactor discontinuo tipo tanque agitado, en condiciones de microaeración por vórtice (500 rpm) y sin aeración adicional, a $pH = 5,0$, y partiendo de una concentración total inicial de sustrato de 25 g dm^{-3} (Sánchez *et al.*, 2008), se alcanzó una productividad volumétrica en xilitol inferior a la determinada en esta serie experimental de SFS, Tabla 4.44, siendo $19,0 \text{ mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ el valor máximo alcanzado en dicha investigación, con una concentración inicial de D-xilosa y D-glucosa de 5 y 20 g dm^{-3} , respectivamente.

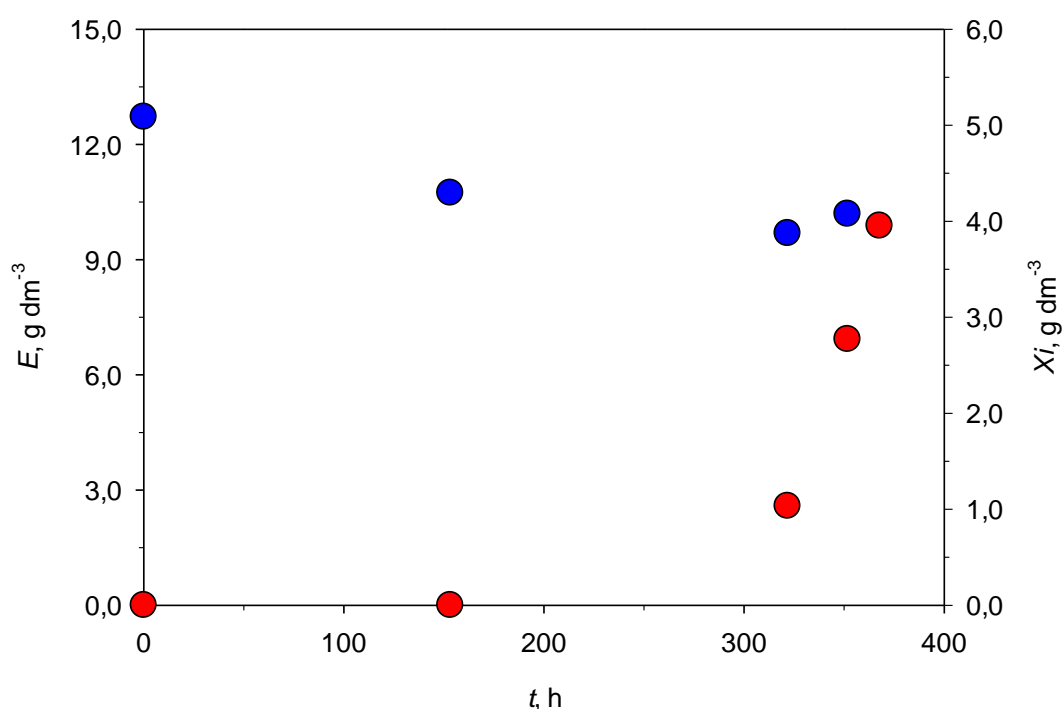


Figura 4.64 Evolución de la concentración de X_i (●) y E (●) frente al tiempo en los experimentos de SFS con *H. polymorpha*, a 45°C, en condiciones de microaeración, $pH_0 = 5,5$ y $[I_{b0}] = 0,13 \text{ g dm}^{-3}$ (Expto. SFS2-pH3).

Durante la fermentación de D-xilosa con *H. polymorpha* a pH_0 constante (4,5), se alcanzó una productividad volumétrica en xilitol de $179,0$ y $68,0 \text{ mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ cuando la temperatura de operación fue 40 y 50°C, respectivamente (Exptos. F-S3 y FS3-T6); este valor de Q_{X_i} es muy superior al obtenido en los experimentos de SFS, Tabla 4.44.

➤ Productividad volumétrica instantánea máxima en etanol

En estos experimentos de sacarificación y fermentación simultánea con *H. polymorpha*, en condiciones microaeróbicas a 45°C, donde se modificó tanto el pH inicial del medio (3,5, 4,5 y 5,5) como la concentración de inóculo en un rango de 0,11 – 0,36 g dm⁻³, se ha determinado la velocidad instantánea de producción de etanol por unidad de volumen, Q_E^* . En cada uno de los experimentos SFS, se seleccionó el valor máximo de Q_E^* , Tabla 4.44.

En general, fijada la concentración de inóculo inicial dentro del biorreactor, se observa un incremento de Q_E^* conforme se aumenta el pH₀ del medio. Efectivamente, cuando $[I]_{Bo} = 0,13 \text{ g dm}^{-3}$, la productividad volumétrica instantánea máxima en etanol pasó de ser nula hasta 26,9 mg dm⁻³ h⁻¹ cuando el pH₀ se incrementó hasta 5,5 (Expto. SFS2-pH3), Tabla 4.44. No obstante, cuando el pH inicial permanece constante, una variación de la concentración de inóculo inicial en el medio no manifiesta una tendencia definida por parte de Q_E^* .

Estos valores determinados para la productividad volumétrica instantánea máxima en general son inferiores a los obtenidos utilizando *S. cerevisiae*. En efecto, durante un estudio previo de sacarificación y fermentación simultánea de material lignocelulósico procedente de poda del olivar con *S. cerevisiae*, utilizando matraces Erlenmeyer de 125 cm³, a 40°C y pH 4,8, (Cuevas *et al.*, 2010), se alcanzó un valor superior, 130 mg dm⁻³ h⁻¹, tras 12 h de fermentación, con unas condiciones de pretratamiento próximas a las empleadas en esta investigación (210°C y una disolución de ácido sulfúrico 0,05 M).

➤ Rendimiento máximo en arabitol

Este parámetro, $Y_{Ar/S}$, se determina a partir de la concentración máxima en arabitol obtenida experimentalmente, en las muestras procedentes de los experimentos SFS con *H. polymorpha*, a 45°C y en condiciones de microaeración, y referido al sólido seco inicial sometido al pretratamiento a presión, según la Ec. 4.42.

$$Y_{Ar/S} = \frac{\text{kg arabitol en muestrade SFS}}{\text{kg residuoseco inicial}} 100 \quad [4.42]$$

4. Resultados y discusión

En general, a pH inicial constante, no se observa un comportamiento definido ó característico en cuanto a $Y_{Ar/S}$ ante un incremento de la concentración del inóculo inicial. No obstante, cuando la $[I]_{Bo}$ fue constante, en general el rendimiento máximo en arabitol aumentó conforme se incrementó el valor del pH inicial en el biorreactor, Tabla 4.45. De hecho, las condiciones de operación en las cuales se alcanzó el máximo valor en $Y_{Ar/S}$, 0,69%, fue $[I]_{Bo} = 0,13 \text{ g dm}^{-3}$ y $pH_o = 5,5$, tras 321,8 h de proceso SFS (Expto. SFS2-pH3).

Tabla 4.45
SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *H. polymorpha*
EFECTO DE $[I]_{Bo}$ Y DEL pH_o DE CULTIVO

Rendimiento máximo en arabitol ($Y_{Ar/S}$), xilitol ($Y_{Xi/S}$) y etanol ($Y_{E/S}$)
Condiciones de microaeración, $T = 45^\circ\text{C}$

pH_o	$[I]_{Bo}$, g dm^{-3}	Expto.	t, h	$Y_{Ar/S}$, %	t, h	$Y_{Xi/S}$, %	t, h	$Y_{E/S}$, %
3,5	0,11	SFS1-pH1	114,0	0,21	352,5	6,39	*	0,00
	0,13	SFS2-pH1	103,8	0,07	0,0	8,50	*	0,00
	0,15	SFS3-pH1	329,8	0,18	159,3	10,91	237,5	0,05
	0,36	SFS4-pH1	0,0	0,02	236,5	9,42	236,5	0,01
4,5	0,11	SFS1-pH2	42,5	0,16	210,0	6,82	305,0	0,03
	0,13	SFS2-pH2	367,8	0,09	0,0	8,32	*	0,00
	0,15	SFS3-pH2a	159,3	0,14	159,3	10,88	*	0,00
		SFS3-pH2b	307,5	0,40	28,5	11,13	307,5	14,91
	0,36	SFS4-pH2	*	0,00	236,5	9,20	*	0,00
5,5	0,11	SFS1-pH3	281,5	0,44	184,0	3,93	210,0	5,04
	0,13	SFS2-pH3	321,8	0,69	0,0	9,02	367,8	17,52
	0,15	SFS3-pH3	329,8	0,18	88,8	10,67	237,5	0,09
	0,36	SFS4-pH3	92,3	0,06	236,5	9,06	389,3	0,64

(*) A lo largo de todo el intervalo de tiempo del bioproceso.

➤ Rendimiento máximo en xilitol

Al igual que en el caso del arabitol, el rendimiento máximo en xilitol, $Y_{Xi/S}$, se determina según Ec. 4.42 pero aplicado a este bioproducto. En los experimentos de SFS con *H. polymorpha*, a 45°C y manteniendo el pH inicial constante, en general, se aprecia un aumento de $Y_{Xi/S}$ con el incremento de la concentración del inóculo inicial en el biorreactor. En efecto, cuando $pH_o = 5,5$, el rendimiento máximo en xilitol aumentó desde 3,9 a 9,1%, cuando $[I]_{Bo}$ se incrementó en un rango de 0,11 – 0,36 g dm^{-3} (Exptos. SFS4-pH1, SFS4-

pH2 y SFS4-pH3), Tabla 4.45. Por otro lado, cabe destacar el hecho de que cuando $[I]_{Bo}$ se mantiene constante, el valor alcanzado para $Y_{X/S}$ apenas se ve influenciado por la variación del pH inicial. Efectivamente, durante los experimentos microaeróbicos de SFS con *H. polymorpha* a 45°C y $[I]_{Bo} = 0,15 \text{ g dm}^{-3}$, el valor alcanzado para $Y_{X/S}$ (10,9, 10,9 y 9,1), se mantuvo prácticamente constante ante la variación del pH₀ desde 3,5, 4,5 a 5,5, respectivamente (Exptos. SFS3-pH1, SFS3-pH2a y SFS3-pH3), Tabla 4.45. Se alcanzó el rendimiento máximo en xilitol ($Y_{X/S} = 11,13\%$, equivalente a 11,13 k de xilitol por cada 100 kg de biomasa seca) a 45°C, un pH₀ = 4,5 y $[I]_{Bo} = 0,15 \text{ g dm}^{-3}$, siendo este valor de $Y_{X/S}$ superior al obtenido por García J.F. (2007), 4,2%, durante la fermentación realizada sobre un hidrolizado ácido con *C. tropicalis*.

➤ Rendimiento máximo en etanol

Este parámetro, al igual que $Y_{A/S}$ y $Y_{X/S}$, se determina utilizando la Ec. 4.42, aplicada al etanol como bioproducto. En general, a pH inicial constante, no se observa un comportamiento definido ó característico en cuanto a $Y_{E/S}$ ante un incremento de la concentración del inóculo inicial en el biorreactor. No obstante, cuando la $[I]_{Bo}$ fue constante, en general el rendimiento máximo en etanol aumentó conforme se incrementó el valor del pH inicial en el biorreactor, Tabla 4.45. De hecho, las condiciones de operación en las cuales se alcanzó el máximo valor en $Y_{E/S}$, 17,52%, fue $[I]_{Bo} = 0,13 \text{ g dm}^{-3}$ y pH₀ = 5,5, tras 367,8 h de proceso SFS (Expto. SFS2-pH3).

Si se compara estos valores de rendimiento máximo en etanol con los alcanzados en un estudio previo de sacarificación y fermentación simultánea de material lignocelulósico procedente de poda del olivar con *S. cerevisiae*, a 40°C y pH 4,8, (Cuevas *et al.*, 2010), se observa que bajo unas condiciones de pretratamiento próximas a las empleadas en esta investigación (210°C y una disolución de ácido sulfúrico 0,05 M) se alcanzó un valor de $Y_{E/S}$, 6,6%, en general inferior a los determinados en esta serie experimental, Tabla 4.45.

4.3.3 Compuestos antioxidantes o inhibidores

En lo que se refiere a la concentración de compuestos fenólicos totales, se determinó a tiempo final de proceso, sólo para los experimentos llevados a cabo con una $[I]_{Bo}$ de 0,13, 0,15 y 0,36 g dm⁻³, y un pH₀ de 3,5, 4,5 y 5,5, Tabla 4.46.

Tabla 4.46
SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *H. polymorpha*
EFECTO DE $[I]_{Bo}$ Y DEL pH₀ DE CULTIVO
Concentración de compuestos fenólicos totales (CFT) existentes tras el proceso SFS
Condiciones de microaeración, $T = 45^{\circ}\text{C}$

pH ₀	$[I]_{Bo}$, g dm ⁻³	Expto.	CFT g dm ⁻³	σ
3,5	0,13	SFS2-pH1	1,95	0,02
	0,15	SFS3-pH1	1,60	0,03
	0,36	SFS4-pH1	1,83	0,03
4,5	0,13	SFS2-pH2	1,82	0,01
	0,15	SFS3-pH2a	1,64	0,02
	0,36	SFS4-pH2	1,54	0,03
5,5	0,13	SFS2-pH3	1,92	0,05
	0,15	SFS3-pH3	1,60	0,03
	0,36	SFS4-pH3	1,67	0,03

Con el fin de poder estudiar otros compuestos con efecto inhibitorio en el proceso de sacarificación y fermentación simultánea con *H. polymorpha*, se llevó a cabo una determinación tanto de la concentración de ácido acético como del índice de inhibidores en las muestras extraídas del biorreactor a diferentes tiempos de proceso, Anexo D.

En estos experimentos de sacarificación y fermentación simultánea con *H. polymorpha* a 45°C, en general se observa que el ácido acético disminuye a lo largo del tiempo, pudiéndose considerar que es consumido por la propia levadura. No obstante, cuando el pH₀ = 5,5, el contenido en este compuesto aumentó conforme a la evolución del bioproceso (Exptos. SFS1-pH3, SFS2-pH3, SFS3-pH3, Anexo D), excepto cuando $[I]_{Bo} = 0,36$ g dm⁻³ que se mantuvo constante e igual a 0,0 g dm⁻³ (Expto. SFS4-pH3, Anexo D). El máximo valor en Ac, 3,68 g dm⁻³, se alcanzó durante el proceso SFS con *H. polymorpha* a 45°C, pH₀ = 5,5 y con una $[I]_{Bo} = 0,13$ g dm⁻³ (Expto. SFS2-pH3).

En cuanto al índice de inhibidores, independientemente de la concentración de inóculo inicial así como del pH₀, I_i disminuye a lo largo del bioproceso de SFS con *H. polymorpha*, Anexo D. Una representación de I_i frente al tiempo se ajusta de forma a una ecuación lineal,

Fig. 4.65. A título de ejemplo para cada uno de los pH₀ de trabajo el ajuste condujo a las siguientes expresiones:

- Para pH₀ = 3,5 $I_i = -0,215 t + 178,48$ $r^2 = 0,993$

- Para pH₀ = 4,5 $I_i = -0,194 t + 153,27$ $r^2 = 0,995$

- Para pH₀ = 5,5 $I_i = -0,215 t + 166,90$ $r^2 = 0,979$

En todos los casos estas ecuaciones presentan pendiente negativa en concordancia con la disminución de la concentración de estos compuestos con el tiempo; además el valor de estas pendientes es muy próximo. Cuando se mantiene constante $[I]_{B_0}$, el contenido en inhibidores fue superior cuando pH₀ fue 3,5, mientras que los valores menores en contenido de inhibidores se obtuvieron con un valor 4,5 de pH inicial, Fig. 4.65.

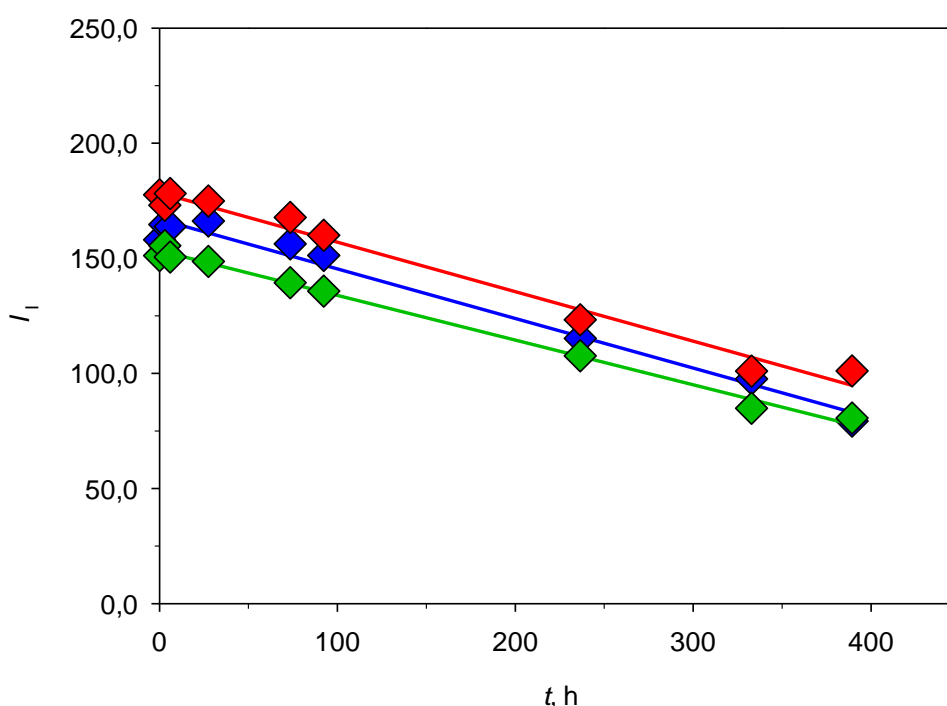


Figura 4.65 Evolución del índice de inhibidores vs tiempo en los experimentos de SFS con *H. polymorpha*, a 45°C, en condiciones de microaeración, $[I]_{B_0} = 0,36 \text{ g dm}^{-3}$ y modificando el pH₀ de 3,5 (♦), 4,5 (◆) a 5,5 (◆), Exptos SFS4-pH1, SFS4-pH2 y SFS4-pH3.

4.3.4 Caracterización del residuo sólido tras la sacarificación y fermentación simultánea

Una vez finalizado el proceso de sacarificación y fermentación simultánea, se filtró el contenido del biorreactor mediante un embudo büchner con el fin de retener la fase sólida

4. Resultados y discusión

en el papel de filtro. Transcurridos un mínimo de 72 h para asegurar su secado, el residuo sólido se caracterizó según su contenido en *HMV*, *CEL*, *HEM*, *LAI*, *CEN* y *EXT*, en base seca, tal y como se indica en el apartado 3.8, Tabla 4.47. Las determinaciones se realizaron a partir de los residuos secos procedentes de los experimentos SFS donde $[I]_{Bo}$ fue más elevada, 0,15 y 0,36 g dm⁻³, y con pH₀ en el rango de 3,5 a 5,5 (Exptos. SFS3-pH1, SFS3-pH2a, SFS3-pH3, SFS4-pH1, SFS4-pH2, SFS4-pH3). En todos los casos la caracterización se llevó a cabo por duplicado, calculándose así su desviación estándar.

Tabla 4.47
SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *H. polymorpha*
EFECTO DE $[I]_{Bo}$ Y DEL pH₀ DE CULTIVO
Caracterización del residuo separado tras el experimento de SFS con *H. polymorpha*
Condiciones microaeróbicas, T = 45°C

Parámetro	Material de poda del olivo*	Residuo tras el pretratamiento de hidrólisis a presión**	$[I]_{Bo}$	0,15	0,36
			g dm ⁻³		
			pH	VM	VM
<i>HMV</i> , %	7,24 ± 0,02	5,68 ± 0,02	3,5	9,28 ± 0,03	7,48 ± 0,22
			4,5	7,97 ± 0,05	7,09 ± 0,02
			5,5	9,07 ± 0,08	6,65 ± 0,09
<i>HOL</i> , %	53,54 ± 0,49	36,07 ± 0,01	3,5	1,40 ± 0,09	4,97 ± 0,15
			4,5	5,75 ± 0,57	10,56 ± 0,17
			5,5	0,89 ± 0,08	0,87 ± 0,01
<i>CEL</i> , %	29,85 ± 0,80	35,06 ± 0,05	3,5	0,21 ± 0,04	3,33 ± 0,18
			4,5	2,38 ± 0,18	6,68 ± 0,17
			5,5	0,13 ± 0,11	0,16 ± 0,05
<i>HEM</i> , %	23,69 ± 0,31	1,01 ± 0,06	3,5	1,19 ± 0,04	1,64 ± 0,34
			4,5	3,37 ± 0,38	3,88 ± 0,00
			5,5	0,76 ± 0,19	0,70 ± 0,06
<i>LAI</i> , %	15,58 ± 0,43	42,97 ± 0,01	3,5	51,70 ± 0,29	49,63 ± 0,40
			4,5	49,74 ± 0,74	46,69 ± 0,19
			5,5	53,49 ± 0,34	53,09 ± 0,01
<i>CEN</i> , %	2,80 ± 0,20	2,00 ± 0,09	3,5	3,93 ± 0,02	5,08 ± 0,19
			4,5	4,57 ± 0,03	5,26 ± 0,07
			5,5	6,76 ± 0,03	8,33 ± 0,08
<i>EXT</i> , %	20,32 ± 0,27	13,28 ± 0,06	3,5	33,68 ± 0,15	32,84 ± 0,16
			4,5	31,97 ± 0,16	30,40 ± 0,07
			5,5	29,79 ± 0,37	31,06 ± 0,14

(*) Caracterización del material de poda del olivo determinado anteriormente y expuesto en la Tabla 4.1.

(**) Caracterización del residuo una vez separado del hidrolizado tras la finalización del pretratamiento a presión, calculado con anterioridad y mostrado en Tabla 4.8.

En general, se observa una clara disminución del contenido celulósico así como hemicelulósico (holocelulósico) tras someter el residuo procedente del pretratamiento a presión a un proceso de sacarificación y fermentación simultánea con *H. polymorpha*. Por otro lado, lógicamente, el porcentaje referente a la fracción *LAI* aumenta ligeramente tras el proceso SFS.

En general, cuando el pH_0 permanece constante, un aumento de $[I]_{B_0}$ provoca una modificación en la composición del residuo sólido final, detectándose un incremento en el contenido en *CEL*, *HEM*, *LAI*, *CEN* y *EXT*. Es la fracción celulósica quien se ve claramente más influenciada por dicha variación, repercutiendo por tanto en el contenido holocelulósico; efectivamente, a $pH_0 = 4,5$, la fracción celulósica se incrementó desde 2,4 a 6,7% cuando la concentración de inóculo inicial aumentó de 0,15 a 0,36 g dm⁻³, Tabla 4.47.

Por otra parte, si se mantiene constante la concentración inicial de inóculo, $[I]_{B_0}$, se observa un incremento en los porcentajes de las fracciones *HOL*, *CEL*, y *HEM* con el aumento del pH_0 desde 3,5 a 4,5, para disminuir posteriormente a $pH_0 = 5,5$. En efecto, con una concentración de inóculo inicial constante de 0,15 g dm⁻³, la fracción holocelulósica aumentó de 1,4 a 6,6% tras la modificación del pH_0 desde 3,5 a 4,5, siendo un porcentaje menor el determinado a $pH_0 = 5,5$ (0,89%), Tabla 4.47. Por otro lado, el porcentaje referente a la fracción *CEN* aumenta con el incremento del pH_0 cuando se mantuvo la concentración de inóculo inicial constante.

4.4 BIBLIOGRAFÍA

- Aiba S., Humphrey A.E., Millis N.F. (1973). Kinetics. En: Biochemical Engineering, Academic Press (2ª Ed), Nueva York, pp. 93-127.
- Bailey J.E., Ollis D.F. (1977). Kinetics of substrate utilization, product yield and biomass production in cell cultures. En: Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw-Hill, Nueva York, pp. 334-410.
- Bennett C.O., Myers J.E. (1973). Molecular Diffusion and Diffusivity. En: Momentum, Heat, and Mass Transfer, McGraw-Hill (2ª Ed.), Nueva York, pp 556-568.
- Bravo V., Camacho F., Sánchez S., Castro E. (1995). Influence of the concentrations of D-xylose and yeast extract on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **79**(6), 566-571.
- Camacho F., Bravo V., Sánchez S., Castro M. (1989). The influence of temperature, pH and aeration on the ethanolic fermentation of glucose by *Pachysolen tannophilus*. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **54**(5), 1244-1256.
- Coulson J.M., Richardson J.F. (1981). Partículas sólidas. En: Ingeniería Química, Vol. 2, Operaciones Básicas, Reverté, Barcelona, pp. 1-60.
- Cuevas M. (2007). Hidrólisis enzimática del hueso de aceituna. Fermentación de hidrolizados con levaduras. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén, Jaén.
- Cuevas M., Sánchez S., Bravo V., García J.F., Baeza J., Parra C., Freer J. (2010). Determination of optimal pre-treatment conditions for ethanol production from olive-pruning debris by simultaneous saccharification and fermentation. *Fuel* **89**, 2891-2896.
- Cuevas M., Saleh M., García-Martín J.F., Sánchez S. (2015). Influence of solid loading on D-xylose production through dilute sulphuric acid hydrolysis of olive stones. *Grasas y Aceites* **66**(3).
- De Bari I., Viola E., Barisano D., Cardinale M., Nanna F., Zimbardi F., Cardinale G., Braccio G. (2002). Ethanol production at flask and pilot scale from concentrated slurries of steam exploded aspen. *Industrial and Engineering Chemical Research* **41**(7), 1745-1753.
- Detroy R.W., Cunningham R.L., Herman A.I. (1982). Fermentation of wheat straw hemicelluloses to ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* **12**, 81-89.

- Du Preez J.C., Bosch M., Prior B.A. (1986). Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature, and substrate concentration. *Enzyme and Microbial Technolog.* **8**, 360-364.
- Escalante J., Caminal G., de Mas C. (1990a). Biomass production by a thermotolerant yeast: *Hansenula polymorpha*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **48**, 61-70.
- Escalante J., Caminal G., Figueredo M., de Mas C. (1990b). Production of arabitol from glucose by *Hansenula polymorpha*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **70**(4), 228-231.
- Feliu J.A., González G., de Mas C. (1990). SCP production by *Hansenula polymorpha* from xylose. *Process Biochemistry International* **25**, 136-140.
- Fonseca C., Spéncer-Martins I., Hahn-Hägerdal B. (2007). L-Arabinose metabolism in *Candida arabinofermentans* PYCC 5603^T and *Pichia guilliermondii* PYYCC 3012: influence of sugar and oxygen on product formation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**(2), 303-310.
- García J.F. (2007). Aprovechamiento de residuo de poda de olivo. Hidrólisis ácida y fermentación con *Candida tropicalis*. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén, Jaén.
- García J.F., Sánchez S., Bravo V., Cuevas M. (2010). Autohidrólisis y post-hidrólisis ácida del residuo de poda de olivo. *Afinidad* **67**(548), 14-19.
- Hansen H., Hollenberg C.P. (1996). *Hansenula polymorpha* (*Pichia augusta*). En: *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*, K. Wolf (Ed.), Springer, Berlin, pp. 293-311.
- Jeffries T.W. (1982). A comparison of *Candida tropicalis* and *Pachysolen tannophilus* for conversion of xylose to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* **12**, 103-110.
- Martínez M.L., Sánchez S., Bravo V. (2012). Production of xylitol and ethanol by *Hansenula polymorpha* from hydrolysates of sunflower stalks with phosphoric acid. *Industrial Crops and Products* **40**, 160-166.
- McGinnis G.D., Wilson W.W., Mullen C.E. (1983). Biomass pretreatment with water and highpressure oxygen. The wet-oxidation process. *Industrial and Engineering Chemistry Product Research Development* **22**, 352-357.

- Moya A.J. (1997). Hidrólisis y fermentación del residuo de poda del olivo. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén. Jaén.
- Oliva J.M., Sáez F., Ballesteros I., González A., Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros M. (2003). Effect of Lignocellulosic Degradation Compounds from Steam Explosion Pretreatment on Ethanol Fermentation by Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **105**(1), 141-153.
- Quintero R. (1981). Crecimiento microbiano. En: Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones, Alhambra Mexicana (1ª Ed), México, pp. 27-38.
- Rizzi M., Klein C., Shulze C., Bui-Thanh N., Dellweg H. (1989). Xylose fermentation by yeast. 5. Use of ATP balances for modeling oxygen-limited growth and fermentation of yeast *Pichia stipitis* with xylose as carbon source. *Biotechnology and Bioengineering* **34**, 509-514.
- Ryabova O.B., Chmil O.M., Sibirny A.A. (2003). Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Research* **4**(2), 157-164.
- Saleh M. (2014). Tratamiento a presión e hidrólisis del hueso de aceituna. Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen tannophilus*. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén, Jaén.
- Saleh M., Cuevas M., García J.F., Sánchez S. (2014). Valorization of olive stones for xylitol and ethanol production from dilute acid pretreatment via enzymatic hydrolysis and fermentation by *Pachysolen tannophilus*. *Biochemical Engineering Journal* **90**, 286-293.
- Sánchez S., Bravo V., Castro E., Moya A.J., Camacho F. (1997). The influence of pH and aeration rate on the fermentation of D-xylose by *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology* **21**, 355-360.
- Sánchez S., Bravo V., Castro E., Moya A.J., Camacho F. (1998). The production of xylitol from D-xylose by fermentation with *Hansenula polymorpha*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **50**(5), 608–611.
- Sánchez S., Bravo V., Castro E., Moya A.J., Camacho F. (2002a). The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xilose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **77**, 641-648.

- Sánchez S., Bravo V., Moya A.J., Castro E., Camacho F. (2004). Influence of temperatura on the fermentation of D-xylose by *Pachysonen tannophilus* to produce ethanol and xilitol. *Process Biochemistry* **39**(6), 673-679.
- Sánchez S., Bravo V., Moya A.J., Moya M., Romero I., Torrero R., San Miguel M.P. (2002b). Aprovechamiento del residuo de poda del olivar. *Ingeniería Química* **391**, 194-202.
- Sánchez S., Bravo V., García J.F., Cruz N., Cuevas M. (2008). Fermentation of D-glucose and D-xylose mixtures by *Candida tropicalis* NBRC 0618 for xylitol production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**, 709-716.
- Slininger P.J., Bolen P.L., Kurtzam C.P. (1987). *Pachysolen tannophilus*: properties and process considerations for ethanol production from D-xylose. *Enzyme Microbial and Technology* **9**, 5-16.
- Wyman C.E., Spindler D.D., Grohmann K. (1992). Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. *Biomass and Bioenergy* **3**(5), 301–307.

5

CONCLUSIONES

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

1. En esta investigación se utilizó un material de poda de olivo sin hoja, triturado y tamizado (tamaño de partícula de 0,300 a 0,425 mm), con un contenido inicial celulósico, hemicelulósico, así como de lignina ácido insoluble en torno a 29,9, 23,7 y 15,6%, respectivamente, que indica un porcentaje elevado de la fracción holocelulósica y con ello un alto potencial de azúcares fermentables.
2. El material lignocelulósico se sometió a un pretratamiento de hidrólisis ácida a presión en un reactor discontinuo a 250 rpm, con temperatura máxima de 200°C, una relación sólido/líquido de 1/6 (p/V), y una concentración de ácido sulfúrico de 0,05 M. Al final del proceso, en el residuo sólido separado del hidrolizado se observó una disminución elevada del contenido hemicelulósico ($HEM = 1,01\%$), apreciándose un claro efecto de las disoluciones ácidas sobre la fracción hemicelulósica, facilitando el posterior ataque enzimático en el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS). En lo que respecta a las conversiones fraccionales determinadas, X_{CEL} , X_{HEM} , y X_{LAI} , la hemicelulósica es prácticamente completa ($X_{HEM} = 98,5\%$), la fracción celulósica fue transformada en un porcentaje elevado, próximo al 58%, mientras que la lignina permaneció inalterada a pesar de ser un tratamiento ácido a presión.

En este pretratamiento se determinó un factor de severidad ($\log R_0$) de $3,52 \pm 0,13$, generándose concentraciones de D-glucosa, D-xilosa y D/L-arabinosa de 14,3, 8,4 y 2,6 $g\ dm^{-3}$, respectivamente; estas concentraciones se corresponden con un rendimiento de hidrólisis elevado, 29 kg de azúcares reductores totales por cada 100 kg de poda de olivar seca. En lo que se refiere a los rendimientos en D-xilosa (Y_{XIL}) y D/L-arabinosa (Y_{ARA}), se alcanzaron unos valores de 5,8 y 1,8%, respectivamente.

3. En los hidrolizado líquido pretratado se determinó la concentración de compuestos fenólicos mediante HPLC-MS, no alcanzándose, en general, valores muy altos, lo que indica que la degradación de la lignina se ha producido en muy poca extensión o ha permanecido inalterada a pesar del pretratamiento ácido a presión (resultado acorde con la baja conversión fraccional obtenida en lignina). Se observa que los dos

compuestos fenólicos en mayor concentración fueron hidroxitirosol y vanilina, 141,5 y 55,3 mg dm⁻³, respectivamente.

4. En la fermentación de D-xilosa, D y L-arabinosa con *H. polymorpha* (25 g dm⁻³ del monosacárido en medio líquido) variando la temperatura (35 – 50°C), el pH (3,5 – 5,5), y el nivel de aeración (microaeróbico y anaeróbico), se ha puesto de manifiesto la capacidad de esta levadura no tradicional para fermentar D-xilosa, así como D y L-arabinosa. Este proceso metabólico se invirtió en la generación de biomasa, xilitol, arabitol, y bajas concentraciones de etanol, así como ácido acético.

4.1 El período de crecimiento exponencial es de escasa duración. En general, se alcanzaron velocidades específicas máximas de crecimiento (μ_m) superiores cuando la pentosa utilizada fue D-xilosa frente a las obtenidas con D/L-arabinosa; el valor máximo de μ_m usando D-xilosa, 0,18 h⁻¹, se alcanzó con microaeración, a 50°C y pH₀ = 4,5; en estas condiciones y sustituyendo el monosacárido por D y L-arabinosa, el valor de μ_m fue inferior, 0,15 y 0,08 h⁻¹, respectivamente, lo que indica que *H. polymorpha* metaboliza de forma adecuada D y L-arabinosa aunque con más dificultad que D-xilosa. Sin embargo, en la fase de desaceleración del crecimiento, se observa un amplio intervalo donde la biomasa presenta un incremento lineal con el tiempo. En este período, la productividad en biomasa no presenta una tendencia definida con respecto a la naturaleza del sustrato.

4.2 La velocidad específica de consumo de sustrato (q_{ART}^D) fue ligeramente superior cuando la pentosa fue D-arabinosa frente a L-arabinosa. En relación a las condiciones de operación, q_{ART}^D fue levemente superior con microaeración, no siguiendo una tendencia definida ante la variación del pH₀ del cultivo, pero sí un ligero aumento con el incremento de la temperatura transcurrido el mismo tiempo de cultivo. Cabe destacar que, independientemente de las condiciones de aeración, fuente de carbono y energía, y temperatura, los valores de q_{ART}^D tienden a aproximarse a medida que avanza el tiempo de cultivo, comportamiento justificable si se considera que se está en la fase final de consumo de sustrato.

4.3 Se alcanzó rendimientos en biomasa ($Y_{X/ART}^G$) superiores utilizando L-arabinosa frente a D-arabinosa, y menor en ambos casos cuando el sustrato usado fue D-xilosa. Por otro lado, en medio anaeróbico $Y_{X/ART}^G$ fue inferior frente a un medio microaeróbico, a la vez que disminuyó su valor con el incremento del pH inicial del medio ó de la

temperatura. En condiciones de microaeración, el máximo valor obtenido con D-arabinosa fue $0,29 \text{ g g}^{-1}$ (a 35°C y $\text{pH}=3,5$), utilizando L-arabinosa, $0,30 \text{ g g}^{-1}$ (a 35°C y $\text{pH}=4,5$) y finalmente con D-xilosa $0,18 \text{ g g}^{-1}$ (a 30°C y $\text{pH}=4,5$).

4.4 Las velocidades específicas de formación de arabitol, q_{Ar}^D , y xilitol, q_{Xi}^D , disminuyen a con el tiempo de cultivo independientemente de las condiciones de proceso. El máximo valor alcanzado de q_{Ar}^D y q_{Xi}^D , utilizando D-arabinosa y D-xilosa como sustrato, respectivamente, fue $0,08 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ tras $t = 4 \text{ h}$ a 50°C , $\text{pH}_0 = 4,5$ y en condiciones de microaeración, en ambos casos. Cuando la pentosa fue L-arabinosa, el máximo de q_{Ar}^D , $0,03 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, se alcanzó tras 10 h de fermentación microaeróbica, a 40°C y $\text{pH}_0 = 4,5$.

4.5 En relación a los rendimientos globales en bioproductos, utilizando D-arabinosa, los mayores rendimientos en arabitol ($Y_{Ar/ART}^G$), $0,14 \text{ g g}^{-1}$, se obtuvieron con microaeración, a 35°C y $\text{pH}_0 = 4,5$; modificado el sustrato a L-arabinosa, el mayor rendimiento en arabitol, $0,11 \text{ g g}^{-1}$, se alcanzó en condiciones microaeróbicas, 40°C y $\text{pH}_0 = 3,5$. En la producción de xilitol el rendimiento ($Y_{Xi/ART}^G$) fue $0,17 \text{ g g}^{-1}$ (condiciones anaeróbicas, 30°C y $\text{pH}_0=4,5$) usando D-xilosa como sustrato. En todos los experimentos, los rendimientos en etanol fueron muy bajos, inferiores a $0,02 \text{ g g}^{-1}$.

5. En la fermentación microaeróbica del hidrolizado líquido, con una concentración inicial de inóculo de $0,27 \text{ g dm}^{-3}$, a 45°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, los valores de la velocidad específica máxima de crecimiento en biomasa, consumo de sustrato, y formación de arabitol fueron inferiores a los obtenidos en la fermentación de pentosas, manteniendo las condiciones de operación y tras el mismo tiempo de cultivo. Se alcanzó un bajo rendimiento global en arabitol, $0,02 \text{ g g}^{-1}$ basado en el consumo de azúcares totales ($Y_{Ar/AT}^G$), y $0,12 \text{ g g}^{-1}$ si se considera el consumo de D ó L-arabinosa ($Y_{Ar/ARA}^G$). Se detectó una fuerte inhibición provocada por la presencia en el hidrolizado de ácido acético, furfural, 5-(hidroximetil)-2-furaldehído y compuestos fenólicos. Este efecto fue evaluado mediante el parámetro índice de inhibición, cuyo valor fue disminuyendo en el transcurso del proceso de fermentación, observándose paralelamente que la concentración de ácido acético, tras alcanzar un valor máximo, disminuyó con el tiempo, lo que indica que este compuesto fue usado como sustrato por la levadura.

6. En los procesos de sacarificación y fermentación simultáneos se alcanzaron valores de μ_m inferiores a los determinados en la fermentación de azúcares puros en las mismas condiciones, indicando que existe inhibición por sustrato.

6.1 La productividad volumétrica alcanzada en arabitol, Q_{Ar} , en general fue inferior a la obtenida en la fermentación de pentosas bajo las mismas condiciones de operación, oscilando en un rango de 0,1 – 2,1 mg dm⁻³ h⁻¹. En esta serie experimental, se produjo un consumo del xilitol producido en el bioproceso y de forma simultánea a su generación. Este hecho es fácilmente justificable si se considera la ruta metabólica de producción de etanol establecida para levaduras no tradicionales donde el xilitol es un producto intermedio. De forma que si experimentalmente se detecta disminución de la concentración de xilitol con el tiempo (consumo del mismo por la levadura) paralelamente se observa incremento de la concentración de etanol.

6.2 En general, durante los procesos de SFS con *H. polymorpha* se alcanzaron unos rendimientos máximos en xilitol superiores a los obtenidos en arabitol y etanol. A 45°C, un pH_o = 4,5 y utilizando una concentración inicial del inóculo de 0,15 g dm⁻³, se determinó el valor más alto del rendimientos en xilitol ($Y_{X/S} = 11,13\%$).

7. Considerando los objetivos planteados al inicio de la Tesis Doctoral y analizando el proceso global de tratamiento de la biomasa (pretratamiento ácido a presión, fermentación de pentosas, sacarificación y fermentación simultánea), se deduce que *H. polymorpha*, levadura no tradicional termotolerante, presenta una alta capacidad de fermentar pentosas, incluidas D y L-arabinosa, y transformar los hidrolizados procedentes de tratamientos ácidos a presión en bioproductos, fundamentalmente xilitol, mediante un proceso de sacarificación y fermentación simultánea. En las condiciones más favorable, partiendo de un hidrolizado de astillas de poda de olivar (sin hojas) obtenido a 200°C (con $t_h = 0$ s), mediante un proceso SFS a 45°C, pH_o =4,5, y utilizando los enzimas celulasa [EC 3.2.1.4] y β -glucosidasa [EC 3.2.1.21] (a una concentración y actividad de 20 UPF celulasa / g sólido seco y 10 UI β -glucosidasa / g sólido seco) se alcanzaron rendimientos de 11,1 kg de xilitol por 100 kg de poda seca.

6

NOMENCLATURA

<i>A</i>	Absorbancia a diferentes longitudes de onda, nm.
<i>A_{AcBo}</i>	Absorbancia inicial del blanco para la medida de ácido acético a una longitud de onda de 340 nm, según Ec. 3.27.
<i>A_{AcB1}</i>	Absorbancia del blanco al comienzo de la reacción para la medida de ácido acético a una longitud de onda de 340 nm, según Ec. 3.27.
<i>A_{AcB2}</i>	Absorbancia del blanco al final de la reacción para la medida de ácido acético a una longitud de onda de 340 nm, según Ec. 3.27.
<i>A_{Ac0}</i>	Absorbancia inicial de la muestra a $t = 0$ min para la medida de ácido acético a una longitud de onda de 340 nm, según Ec. 3.27.
<i>A_{Ac1}</i>	Absorbancia de la muestra al comienzo de la reacción para la medida de ácido acético a una longitud de onda de 340 nm, según Ec. 3.27.
<i>A_{Ac2}</i>	Absorbancia de la muestra al final de la reacción para la medida de ácido acético a una longitud de onda de 340 nm según Ec. 3.27.
<i>A_{EB1}</i>	Absorbancia del blanco al comienzo de la reacción para la medida de etanol a una longitud de onda de 340 nm, según Ec. 3.34.
<i>A_{EB2}</i>	Absorbancia del blanco al final de la reacción para la medida de etanol a una longitud de onda de 340 nm, según Ec. 3.34.
<i>A_{E1}</i>	Absorbancia de la muestra al comienzo de la reacción para la medida de etanol a una longitud de onda de 340 nm, según Ec. 3.34.
<i>A_{E2}</i>	Absorbancia de la muestra al final de la reacción para la medida de etanol a una longitud de onda de 340 nm, según Ec. 3.34.
<i>A_{XiB1}</i>	Absorbancia del blanco al comienzo de la reacción para la medida de xilitol a una longitud de onda de 492 nm, según Ec. 3.37.
<i>A_{XiB2}</i>	Absorbancia del blanco al final de la reacción para la medida de xilitol a una longitud de onda de 492 nm, según Ec. 3.37.
<i>A_{Xi1}</i>	Absorbancia de la muestra al comienzo de la reacción para la medida de xilitol a una longitud de onda de 492 nm, según Ec. 3.37.
<i>A_{Xi2}</i>	Absorbancia de la muestra al final de la reacción para la medida de xilitol a una longitud de onda de 492 nm, según Ec. 3.37.
<i>A₂₈₀</i>	Absorbancia de la muestra a una longitud de onda de $\lambda=280$ nm.
<i>A₆₂₀</i>	Absorbancia de la muestra a una longitud de onda de $\lambda=620$ nm.
<i>A₆₄₀</i>	Absorbancia de la muestra a una longitud de onda de $\lambda=640$ nm.
<i>A₇₂₅</i>	Absorbancia de la muestra a una longitud de onda de $\lambda=725$ nm.
<i>A</i>	Parámetro empírico en la Ec. 4.35.
<i>a</i>	Pendiente de la ecuación lineal que representa el aumento de la temperatura respecto del tiempo en la zona de calentamiento, durante el tratamiento ácido a presión (Ec. 3.3), °C min ⁻¹ .
<i>a'</i>	Constante de la función polinómica que representa el descenso exponencial de la temperatura respecto del tiempo en la zona de enfriamiento durante el tratamiento ácido a presión (Ec. 3.4), °C min ⁻² .
<i>Ac</i>	Concentración de ácido acético, g dm ⁻³ .

ACS	Enzima acetil-CoA sintetasa.
ADH	Enzima alcohol deshidrogenasa.
AFEX	'Ammonia fiber explosion'
Al-DH	Enzima aldehído deshidrogenasa.
AMP	Adenosín-monofosfato.
A_r	Concentración de arabitol, g dm ⁻³ .
A_{r_0}	Concentración inicial de arabitol, g dm ⁻³ .
ARA	Concentración de D y L-arabinosa, g dm ⁻³ .
ARA_0	Concentración inicial de D y L-arabinosa, g dm ⁻³ .
ART	Concentración en azúcares reductores totales obtenido a partir del método de Miller, g dm ⁻³ .
ART_0	Concentración inicial en azúcares reductores totales obtenido a partir del método de Miller, g dm ⁻³ .
ASTM	'American Society of Testing and Materials'.
AT	Concentración de azúcares totales, g dm ⁻³ .
AT_0	Concentración inicial de azúcares totales, g dm ⁻³ .
ATCC	'American Type Culture Collection'. Rockville, EU.
ATP	Adenosín-5-trifosfato.
B	Parámetro empírico en la Ec. 4.35.
$B_{Ci [C1...C4]}$	Diferentes concentraciones del blanco en celulasa, de menor a mayor, en la determinación de la actividad del enzima celulasa.
b	Ordenada en el origen de la Ec. 3.3, °C.
b'	Constante empírica en la Ec. 3.4, °C min ⁻¹ .
BLANCO _G	Muestra del blanco para disoluciones de D-glucosa en medida de actividad de celulasa.
BLANCO _N	Muestra del blanco para las disoluciones de 4-nitrofenol en la medida de la actividad de β-glucosidasa.
BLANCO _{βG}	Muestra del blanco para las disoluciones del enzima β-glucosidasa en la medida de la actividad de β-glucosidasa.
C_{max}	Máxima concentración del monosacárido durante el proceso SFS con <i>H. polymorpha</i> a 45°C, g dm ⁻³ .
C_{min}	Mínima concentración del monosacárido durante el proceso SFS con <i>H. polymorpha</i> a 45°C, g dm ⁻³ .
$C_i [1...4]$	Disoluciones finales del enzima celulasa, de menor a mayor, obtenidas a partir de las disoluciones C_i en disolución tampón de citrato sódico (0,05M y pH = 4,8), en la determinación de la actividad de celulasa.
$C_{i [1...4]}$	Disoluciones del enzima celulasa en disolución tampón de citrato sódico (0,05M y pH = 4,8), de menor a mayor concentración, en la determinación de la actividad de celulasa.

c'	Constante empírica en la Ec. 3.4, °C.
<i>CEL</i>	Celulosa, %.
<i>CEN</i>	Cenizas, %.
<i>CFT</i>	Compuestos fenólicos totales, mg dm ⁻³ .
CoA	Coenzima A.
CODEX	Calidad farmacopea y alimentaria. Productos y disoluciones que satisfacen los requisitos de pureza de los productos usados en el sector farmacéutico (exigencias de farmacopeas) y alimentario.
CS	Enzima citrato sintasa.
d	Diámetro, mm.
DNS	Reactivo 3,5 dinitrosalicílico.
D-ARA ₀	Concentración inicial de D-arabinosa, g dm ⁻³ .
<i>D-GAL</i>	Concentración de D-galactosa, g dm ⁻³ .
D-GAL ₀	Concentración inicial de D-galactosa, g dm ⁻³ .
<i>D-GLU</i>	Concentración de D-glucosa, g dm ⁻³ .
D-GLU ₀	Concentración inicial de D-glucosa, g dm ⁻³ .
<i>D-MAN</i>	Concentración de D-manosa, g dm ⁻³ .
D-MAN ₀	Concentración inicial de D-manosa, g dm ⁻³ .
<i>D-FRU</i>	Concentración de D-fructosa, g dm ⁻³ .
D-FRU ₀	Concentración de D-fructosa, g dm ⁻³ .
<i>D-XIL</i>	Concentración de D-xilosa, g dm ⁻³ .
D-XIL ₀	Concentración inicial de D-xilosa, g dm ⁻³ .
<i>E</i>	Concentración de etanol, g dm ⁻³ .
E _a	Energía de activación aparente, kJ mol ⁻¹ .
E _M	Concentración máxima de etanol alcanzable a partir del rendimiento de Gay-Lussac, g dm ⁻³ .
E ₀	Concentración inicial de etanol, g dm ⁻³ .
EST	Fase estacionaria del crecimiento celular.
EXP	Fase exponencial del crecimiento celular.
<i>EXT</i>	Extractos, %.
<i>F</i> _{dilución}	Factor de dilución.
<i>F</i> _{evaporación}	Factor de evaporación.
<i>FAD</i>	Fibra Ácido Detergente, %.
FCR	Reactivo de Folin-Ciocalteu.
<i>FND</i>	Fibra Neutro Detergente, %.
<i>FSC</i>	Factor de severidad combinado.

Gi [1...4]	Disoluciones finales de diferentes concentraciones de D-glucosa, de menor a mayor, obtenidas a partir de las disoluciones Gi en disolución tampón de citrato sódico (0,05M y $pH = 4,8$), en la determinación de la actividad del enzima celulasa.
Gi [1...4]	Disoluciones de diferentes concentraciones de D-glucosa en disolución tampón de citrato sódico (0,05M y $pH = 4,8$), de menor a mayor, en la determinación de la actividad del enzima celulasa.
βG_i [1...10]	Disoluciones de diferentes concentraciones de enzima β -glucosidasa, de menor a mayor, en la determinación de la actividad del enzima β -glucosidasa.
HMV	Humedad y Materia Volátil, %.
HEM	Hemicelulosa, %.
I_i	Índice de inhibición.
INT	Cloruro de iodotetrazolio de fórmula $C_{19}H_{13}ICIN_5O_2$.
INT-formazán	$C_{19}H_{14}IN_5O_2$.
K	Paso de luz de cubeta, cm.
LAI	Lignina Ácido Insoluble, %.
LCD	'Liquid Crystal Display', referido a pantallas ó monitores.
LIN	Fase lineal del crecimiento celular.
L-ARA _o	Concentración inicial de arabinosa, $g\ dm^{-3}$.
L-MDH	Enzima L-malato deshidrogenasa.
m_{at}	Masa de agua evaporada del Erlenmeyer tras un tiempo de fermentación, g.
m_c	Peso del crisol sin muestra, g.
m_{CEN}	Peso crisol y residuo calcinado ó ceniza, g.
m_{et}	Peso del Erlenmeyer a tiempo t de fermentación, g.
m_{eo}	Peso total del Erlenmeyer al inicio de la fermentación ($t = 0$), g.
m_f	Peso del crisol y muestra de material lignocelulósico seca (sin humedad), g.
m_{FAD}	Peso de la placa porosa y la fracción insoluble (FAD), g.
m_{FND}	Peso de la placa porosa y la fracción insoluble (FND), g.
m_{LAI}	Peso de la placa porosa con lana de vidrio y la fracción insoluble (lignina), g.
m_p	Peso de la placa porosa vacía, g.
m_{pl}	Peso de la placa porosa vacía con lana de vidrio, g.
m_s	Masa de material lignocelulósico seco o de humedad conocida, g.
m_o	Masa inicial de muestra húmeda de material lignocelulósico, g.
N	Concentración mediante contaje celular, $n^\circ\ células\ dm^{-3}$.
$N_{células}$	Número total de células tras contaje celular en cámara de Neubauer.
N_o	Concentración inicial por contaje celular, $n^\circ\ células\ dm^{-3}$.

Ni [1...5]	Disoluciones de diferentes concentraciones de 4-nitrofenol, de menor a mayor, en la determinación de la actividad del enzima β -glucosidasa.
NAD	Dinucleótido nicotinamida-adenina.
NADH	Dinucleótido nicotinamida-adenina en forma reducida.
nkat	Actividad enzimática definida en Ec. 3.2, nanomol s^{-1} .
P_b	Productividad volumétrica en biomasa, $\text{g dm}^{-3} \text{h}^{-1}$.
PA	Reactivo especialmente indicado para aplicaciones analíticas generales.
PA-ACS	Reactivo indicado para aplicaciones analíticas generales y que cumple con las normas de 'American Chemical Society' específicas para él.
PA-ACS-ISO	Reactivo indicado para aplicaciones analíticas generales y que cumplen no sólo las normas de 'American Chemical Society' específicas para él, sino también las de la 'International Standard Organization'.
pH ₀	Valor del pH a tiempo cero.
PM	Peso molecular, g mol^{-1} .
PM _{Ac}	Peso molecular del ácido acético, g mol^{-1} .
PM _E	Peso molecular del etanol, g mol^{-1} .
PM _{Xi}	Peso molecular del xilitol, g mol^{-1} .
PRS	Productos de pureza apta como auxiliar en análisis químico.
PRS-CODEX	Producto de pureza apta como auxiliar en análisis químico y que además satisface los requisitos de pureza de los productos químicos usados en el sector farmacéutico (exigencias de farmacopea).
Psi	Unidad de medida de presión que equivale a 6,894 kPa.
p/p	Relación peso/peso, %.
p/V	Relación peso/volumen, %.
Q_{Ar}	Productividad volumétrica en arabitol, $\text{g arabitol dm}^{-3} \text{h}^{-1}$.
Q_{Ar}^*	Productividad volumétrica instantánea en arabitol, $\text{g arabitol dm}^{-3} \text{h}^{-1}$.
Q_E	Productividad volumétrica en etanol, $\text{g etanol dm}^{-3} \text{h}^{-1}$.
Q_E^*	Productividad volumétrica instantánea en etanol, $\text{g etanol dm}^{-3} \text{h}^{-1}$.
Q_S^D	Velocidad volumétrica de consumo de sustrato, según el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos, $\text{g sustrato dm}^{-3} \text{h}^{-1}$.
Q_{Xi}	Productividad volumétrica en xilitol, $\text{g xilitol dm}^{-3} \text{h}^{-1}$.
Q_{Xi}^*	Productividad volumétrica instantánea en xilitol, $\text{g xilitol dm}^{-3} \text{h}^{-1}$.
Q	Ordenada en el origen en la Ec. 4.16, g dm^{-3} .
q_{Ar}	Velocidad específica de formación de arabitol según el método integral de tratamientos de datos cinéticos, $\text{g arabitol (g biomasa)}^{-1} \text{h}^{-1}$.
q_{Ar}^D	Velocidad específica de formación de arabitol, según el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos, $\text{g arabitol (g biomasa)}^{-1} \text{h}^{-1}$.

q_{ART}	Velocidad específica de consumo de sustrato (<i>ART</i>) según el método integral de tratamiento de datos cinéticos, g sustrato (g biomasa) ⁻¹ h ⁻¹ .
q_{ART}^D	Velocidad específica de consumo de sustrato (<i>ART</i>), según el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos, g sustrato (g biomasa) ⁻¹ h ⁻¹ .
q_{AT}	Velocidad específica de consumo de azúcares totales por el método integral de tratamiento de datos cinéticos, g azúcares totales (g biomasa) ⁻¹ h ⁻¹ .
q_{AT}^D	Velocidad específica de consumo de azúcares totales según el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos, g azúcares totales (g biomasa) ⁻¹ h ⁻¹ .
q_E	Velocidad específica de formación de etanol según el método integral de tratamientos de datos cinéticos, g etanol (g biomasa) ⁻¹ h ⁻¹ .
q_E^D	Velocidad específica de formación de etanol, según el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos, g etanol (g biomasa) ⁻¹ h ⁻¹ .
q_s	Velocidad específica de consumo de sustrato, según el método integral de tratamiento de datos cinéticos, g sustrato (g biomasa) ⁻¹ h ⁻¹ .
q_s^D	Velocidad específica de consumo de sustrato, según el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos, g sustrato (g biomasa) ⁻¹ h ⁻¹ .
q_X	Velocidad específica de formación de xilitol según el método integral de tratamientos de datos cinéticos, g xilitol (g biomasa) ⁻¹ h ⁻¹ .
q_X^D	Velocidad específica de formación de xilitol, según el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos, g xilitol (g biomasa) ⁻¹ h ⁻¹ .
R_o	Severidad global del proceso, según Ec. 3.7.
$(R_o)_{calen}$	Severidad en zona de calentamiento durante el tratamiento de hidrólisis ácida a presión, según Ec. 3.11.
$(R_o)_{enfr}$	Severidad en zona de calentamiento durante el tratamiento de hidrólisis ácida a presión, según Ec. 3.12.
R	Constante universal de los gases, 8,31434 J mol ⁻¹ K ⁻¹ .
r	Constante empírica en la Ec. 3.25, g dm ⁻³ .
S	Factor de severidad que equivale a log R_o , según Ec. 3.8.
s	Constante empírica en la Ec. 3.25, g dm ⁻³ .
SDH	Enzima sorbitol deshidrogenasa.
SR	Sólido Recuperado, %.
SFS	Sacarificación y fermentación simultánea.
S/L	Relación sólido/líquido.
T	Temperatura, °C.
T_{max}	Temperatura máxima del tratamiento ácido a presión, °C.
T_r	Temperatura base para un tiempo inicial en el tratamiento hidrotérmico por debajo de la cual no existen alteraciones significativas en la estructura de los polisacáridos de esta biomasa, 100°C.
t	Tiempo, min, h.

6. Nomenclatura

t_h	Tiempo de operación del tratamiento ácido a presión a T_{max} , min.
t_0	Tiempo inicial del pretratamiento a ácido a presión, donde $T=100^\circ\text{C}$, min.
t_1	Tiempo transcurrido en el reactor de hidrólisis ácida a presión hasta que se alcanza la temperatura máxima de 200°C , min.
t_2	Tiempo transcurrido en el reactor de hidrólisis ácida a presión hasta que se enfría a 100°C , min.
TAPPI	'Technical Association of the Pulp and Paper Industry'.
U	Unidad de actividad enzimática. Es la cantidad de enzima que en una reacción enzimática cataliza la conversión de $1\ \mu\text{mol}$ de sustrato por minuto. $60\ 10^6\ \text{U}$ equivale a 1 katal (unidad del SI para la actividad catalítica).
UPF	Unidad de papel de filtro para la actividad enzimática.
$V_{extraído}$	Volumen de muestra extraída del biorreactor en Ec. 3.15, cm^3 .
V_F	Volumen total final resultante en la cubeta para la determinación de la concentración de ácido acético, etanol ó xilitol, cm^3 .
V_I	Volumen de inóculo introducido en el biorreactor según Ec. 3.14, cm^3 .
V_m	Volumen de muestra introducida en la cubeta para la determinación de la concentración de ácido acético, etanol ó xilitol, cm^3 .
V_0	Volumen total inicial en el biorreactor según Ec. 3.14, cm^3 .
$V_{SE,t}$	Volumen en el biorreactor a un tiempo t sin tener en cuenta la evaporación, en Ec. 3.32, cm^3 .
V_t	Volumen en el biorreactor a un tiempo t en Ec. 3.32, cm^3 .
V/V	Relación volumen/volumen, %.
V_{agit}	Velocidad de agitación, rpm.
V_C	Velocidad de calentamiento, $^\circ\text{C}\ \text{min}^{-1}$.
V_E	Velocidad de enfriamiento, $^\circ\text{C}\ \text{min}^{-1}$.
V_{evap}	Velocidad de evaporación en el biorreactor en Ec. 3.15, $\text{cm}^3\ \text{h}^{-1}$.
VM	Valor medio.
$v/v/\text{min}$	Velocidad de aeración, volumen de aire por volumen de medio y por minuto.
w	Constante definida en la hidrólisis para cada tipo de biomasa y sus fracciones, en función de la constante de los gases, la temperatura base considerada y la energía de activación aparente (Ec. 3.5), K.
X_{CEL}	Conversión fraccional referida a la celulosa, %.
X_{HEM}	Conversión fraccional referida a la hemicelulosa, %.
X_i	Concentración de xilitol, $\text{g}\ \text{dm}^{-3}$.
X_{LAI}	Conversión fraccional referida a la lignina ácido detergente, %.
x	Concentración en biomasa, $\text{g}\ \text{dm}^{-3}$.
x_0	Concentración de biomasa al inicio del experimento, $\text{g}\ \text{dm}^{-3}$.
x_1	Concentración de biomasa al inicio de la fase exponencial, $\text{g}\ \text{dm}^{-3}$.

Y_{ARA}	Rendimiento en D/L-arabinosa, $g\ g^{-1}$.
Y_{ART}	Rendimiento en azúcares reductores totales, $g\ g^{-1}$.
$Y_{Ar/ARA}$	Rendimiento instantáneo en arabitol, basado en el consumo de arabinosa, g arabitol $(g\ arabinosa)^{-1}$.
$Y_{Ar/ARA}^G$	Rendimiento global en arabitol, basado en el consumo de arabinosa, g arabitol $(g\ arabinosa)^{-1}$.
$Y_{Ar/ART}$	Rendimiento instantáneo en arabitol, basado en el consumo de azúcares reductores totales, g arabitol $(g\ sustrato)^{-1}$.
$Y_{Ar/ART}^G$	Rendimiento global en arabitol, basado en el consumo de azúcares reductores totales, g arabitol $(g\ sustrato)^{-1}$.
$Y_{Ar/S}$	Rendimiento máximo en arabitol referido al material lignocelulósico seco inicial utilizado para la etapa previa de pretratamiento de hidrólisis a presión, g arabitol $(g\ material\ lignocelulósico\ seco\ inicial)^{-1}$.
$Y_{Ar/AT}$	Rendimiento instantáneos en arabitol, basado en el consumo de azúcares totales, g arabitol $(g\ azúcares\ totales)^{-1}$.
$Y_{Ar/AT}^G$	Rendimiento global en arabitol, basado en el consumo de azúcares totales, g arabitol $(g\ azúcares\ totales)^{-1}$.
$Y_{Ar/x}$	Productividad instantánea en arabitol, g arabitol $(g\ biomasa)^{-1}$.
$Y_{Ar/x}^G$	Productividad global en arabitol, g arabitol $(g\ biomasa)^{-1}$.
$Y_{E/AT}$	Rendimiento instantáneo en etanol, basado en el consumo de azúcares totales, g etanol $(g\ azúcares\ totales)^{-1}$.
$Y_{E/AT}^G$	Rendimiento global en etanol, basado en el consumo de azúcares totales, g etanol $(g\ azúcares\ totales)^{-1}$.
$Y_{E/S}$	Rendimiento máximo en etanol referido al material lignocelulósico seco inicial utilizado para la etapa previa de pretratamiento de hidrólisis a presión, g etanol $(g\ material\ lignocelulósico\ seco\ inicial)^{-1}$.
$Y_{E/x}$	Productividad instantánea en etanol, g etanol $(g\ biomasa)^{-1}$.
$Y_{E/x}^G$	Productividad global en etanol, g etanol $(g\ biomasa)^{-1}$.
Y_{GAL}	Rendimiento en D-galactosa, $g\ g^{-1}$.
Y_{GLU}	Rendimiento en D-glucosa, $g\ g^{-1}$.
Y_{MAN}	Rendimiento en D-manosa, $g\ g^{-1}$.
Y_{XIL}	Rendimiento en D-xilosa, $g\ g^{-1}$.
$Y_{Xi/ART}$	Rendimiento instantáneo en xilitol, basado en el consumo de azúcares reductores totales, g xilitol $(g\ sustrato)^{-1}$.
$Y_{Xi/ART}^G$	Rendimiento global en xilitol, basado en el consumo de azúcares reductores totales, g xilitol $(g\ sustrato)^{-1}$.
$Y_{Xi/S}$	Rendimiento máximo en xilitol referido al material lignocelulósico seco inicial utilizado para la etapa previa de pretratamiento de hidrólisis a presión, g xilitol $(g\ material\ lignocelulósico\ seco\ inicial)^{-1}$.
$Y_{Xi/x}$	Productividad instantánea en xilitol, g xilitol $(g\ biomasa)^{-1}$.

6. Nomenclatura

$Y_{X/x}^G$	Productividad global en xilitol, g xilitol (g biomasa) ⁻¹ .
$Y_{x/ART}$	Rendimiento instantáneo en biomasa, basado en el consumo de azúcares reductores totales, g biomasa (g sustrato) ⁻¹ .
$Y_{x/ART}^G$	Rendimiento global en biomasa, basado en el consumo de azúcares reductores totales, g biomasa (g sustrato) ⁻¹ .
$Y_{x/AT}$	Rendimiento instantáneo en biomasa, basado en el consumo de azúcares totales, g biomasa (g azúcares totales) ⁻¹ .
$Y_{x/AT}^G$	Rendimiento global en biomasa, basado en el consumo de azúcares totales, g biomasa (g azúcares totales) ⁻¹ .
Z	Ordenada en el origen en la Ec. 4.15.
Z'	Ordenada en el origen en la Ec. 4.32.
[H]	Concentración de celulosa correspondiente a 2 mg de D-glucosa por 0,5 cm ³ de disolución de citrato sódico 0,05 M a pH 4,8, g dm ⁻³ .
[I]	Concentración de suspensión celular, según el valor de la absorbancia a $\lambda = 620$ nm, antes de ser inoculada al biorreactor, g dm ⁻³ , según Ec. 3.14.
[I] _{Bo}	Concentración inicial de inóculo en el biorreactor, g dm ⁻³ .

LETRAS GRIEGAS

α	Parámetro empírico definido en la Ec. 4.19.
β	Parámetros empírico definido en la Ec. 4.19.
ΔA_{Ac}	Variación de absorbancia con respecto al blanco en la determinación de ácido acético en la Ec. 3.26.
ΔA_E	Variación de absorbancia con respecto al blanco en la determinación de etanol en la Ec. 3.33.
ΔA_{Xi}	Variación de absorbancia con respecto al blanco en la determinación de xilitol en la Ec. 3.36.
ΔC	Máxima diferencia de concentración ($C_{max} - C_{min}$) indicada en la Ec. 4.41, g dm ⁻³ .
ΔV	Variación del volumen en el interior del biorreactor de tanque agitado, según Ec. 3.15, cm ³ .
ϵ_{Ac}	Coefficiente de absorción del NADH a 340 nm, equivalente a 6,3 dm ³ mM ⁻¹ cm ⁻¹ , utilizado en la Ec. 3.26.
ϵ_E	Coefficiente de absorción del NADH a 340 nm, equivalente a 6,3 dm ³ mM ⁻¹ cm ⁻¹ , utilizado en la Ec. 3.33.
ϵ_{Xi}	Coefficiente de absorción del INT-formazán a 492 nm, equivalente a 19,9 dm ³ mM ⁻¹ cm ⁻¹ , utilizado en la Ec. 3.36.
λ	Longitud de onda, nm.
μ	Velocidad específica de crecimiento, h ⁻¹ .
μ_m	Velocidad específica máxima de crecimiento, h ⁻¹ .

Ω Máxima diferencia de concentración de un monosacárido concreto con respecto a su concentración máxima alcanzada en un determinado momento según Ec. 4.41, %.

SERIES EXPERIMENTALES

➤ Hidrólisis ácida a presión (ácido sulfúrico 0,05 M, relación S/L =1/6)

A.i [i = 1...15] Pretratamiento ácido a presión con ácido sulfúrico 0,05 M, relación S/L 1/6, $T_{\max} = 200^{\circ}\text{C}$, 250 rpm, y $t_h = 0$ min.

➤ Fermentación de pentosas con *H. polymorpha*

F-Si [i = 1, 2, 3] Fermentación microaeróbica de 25 g dm⁻³ de D ó L-arabinosa, ó D-xilosa, a 40°C y pH₀ = 4,5.

FSi-M [i = 1, 3] Fermentación microaeróbica de 25 g dm⁻³ de D y D-xilosa, a 30°C y pH₀ = 4,5.

FSi-A [i = 1, 3] Fermentación de 25 g dm⁻³ de D-arabinosa ó D-xilosa, en condiciones anaeróbicas, a 30°C y pH₀ = 4,5.

FS1T3-pHi [i = 1, 2, 3] Fermentación microaeróbica de 25 g dm⁻³ de D-arabinosa, a 35°C y pH₀ = 3,5, 4,5 y 5,5.

FS1T4-pHi [i = 1, 3] Fermentación microaeróbica de 25 g dm⁻³ de D-arabinosa, a 40°C y pH₀ = 3,5 y 5,5.

FS1T5-pHi [i = 1, 2, 3] Fermentación microaeróbica de 25 g dm⁻³ de D-arabinosa, a 45°C y pH₀ = 3,5, 4,5 y 5,5.

FS2T3-pHi [i = 1, 2, 3] Fermentación microaeróbica de 25 g dm⁻³ de L-arabinosa, a 35°C y pH₀ = 3,5, 4,5 y 5,5.

FS2T4-pHi [i = 1, 3] Fermentación microaeróbica de 25 g dm⁻³ de L-arabinosa, a 40°C y pH₀ = 3,5 y 5,5.

FS2T5-pHi [i = 1, 2, 3] Fermentación microaeróbica de 25 g dm⁻³ de L-arabinosa, a 45°C y pH₀ = 3,5, 4,5 y 5,5.

FS1-Ti [i = 1, 6] Fermentación microaeróbica de 25 g dm⁻³ de D-arabinosa, a pH₀ = 4,5 y una temperatura de 25 y 50°C.

FS2-Ti [i = 1] Fermentación microaeróbica de 25 g dm⁻³ de L-arabinosa, a 50°C y pH₀ = 4,5.

➤ Fermentación del hidrolizado a presión con *H. polymorpha*.

FHP-pH2 Fermentación microaeróbica del hidrolizado líquido obtenido del pretratamiento ácido a presión, a 45°C, pH₀ = 4,5, 500 rpm y $[I]_{B_0} = 0,27$ g dm⁻³.

➤ Sacarificación y fermentación simultánea con *H. polymorpha*

SFS1-pHi [i = 1, 2, 3] Sacarificación y fermentación simultánea microaeróbica, $[I]_{B_0} = 0,11$ g dm⁻³, a 45°C y pH₀ = 3,5, 4,5 y 5,5.

6. Nomenclatura

SFS2-pHi	[i = 1, 2, 3]	Sacarificación y fermentación simultánea microaeróbica, [/] _{B0} = 0,13 g dm ⁻³ , a 45°C y pH ₀ = 3,5, 4,5 y 5,5.
SFS3-pHi	[i = 1, 2, 3]	Sacarificación y fermentación simultánea microaeróbica, [/] _{B0} = 0,15 g dm ⁻³ , a 45°C y pH ₀ = 3,5, 4,5 y 5,5.
SFS4-pHi	[i = 1, 2, 3]	Sacarificación y fermentación simultánea microaeróbica, [/] _{B0} = 0,36 g dm ⁻³ , a 45°C y pH ₀ = 3,5, 4,5 y 5,5.

7

ANEXOS

ANEXO A. HIDRÓLISIS A PRESIÓN CON ÁCIDO SULFÚRICO

En este apartado se presentan los datos de temperaturas, presiones y tiempos de proceso para todos los tratamientos de hidrólisis ácida a presión. También se muestran las gráficas de T frente a t , así como los cálculos de las velocidades y factores de severidad.

Tabla A.1
Hidrólisis ácida a presión. Ácido sulfúrico 0,05 M, y relación S/L=1/6

t , min	T , °C	P , kPa	t , min	T , °C	P , kPa
0,0	100	103,5	25,0	105	1331,1
2,0	112	165,5	25,5	100	951,8
3,0	118	193,1	26,0	93	641,4
4,0	124	241,4	27,0	86	213,8
5,0	130	282,8	28,0	80	117,3
6,0	135	344,9	29,0	75	89,7
7,0	141	372,4	30,0	72	69,0
8,0	146	455,2	31,0	69	62,1
9,0	151	503,5	32,0	67	48,3
10,0	157	600,1	33,0	66	48,3
11,0	163	675,9	34,0	64	48,3
12,0	166	751,8	35,0	62	48,3
13,0	171	862,1	36,0	60	34,5
14,0	177	979,4	37,0	58	34,5
15,0	182	1096,6	38,0	56	34,5
16,0	188	1262,2	39,0	56	34,5
17,0	193	1407,0	41,0	59	27,6
18,0	198	1613,9	42,0	60	34,5
19,0	200	1724,3	43,0	57	34,5
20,0	177	103,5	44,0	54	27,6
21,0	158	165,5	49,0	43	34,5
22,0	155	193,1	54,0	36	34,5
23,0	153	241,4	59,0	30	27,6
24,0	124	282,8	62,0	29	27,6

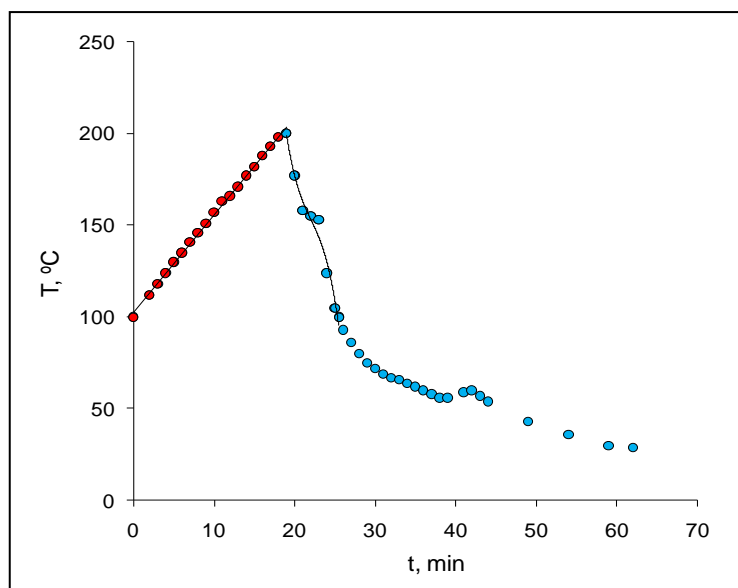


Figura A.1 Evolución de la temperatura con el tiempo de operación en el proceso de hidrólisis ácido a presión ($T_{\max} = 200^{\circ}\text{C}$, $t_h = 0$ min).

<u>Región de calentamiento</u> $T(t) = a t + b$	
$a = v_C = 5,30 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$	$r^2 = 0,998$
$b = 102,6^{\circ}\text{C}$	
<u>Región de enfriamiento</u> $T(t) = a' t^3 + b' t^2 + c' t + d'$	
$a' = -0,64 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-3}$	$r^2 = 0,976$
$b' = 42,39 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-2}$	
$c' = -944,3 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$	
$d' = 7229 \text{ }^{\circ}\text{C}$	
$v_E = dT/dt = -1,92 t^2 + 84,78 t - 944,3 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$	
$R_0 = 3799,65$	$\log R_0 = 3,58$ $FSC = 2,28$

Tabla A.2
Hidrólisis ácida a presión. Ácido sulfúrico 0,05 M, y relación S/L=1/6

<i>t</i> , min	<i>T</i> , °C	<i>P</i> , kPa	<i>t</i> , min	<i>T</i> , °C	<i>P</i> , kPa
0,0	100	62,1	21,0	192	772,5
1,0	105	89,7	22,0	149	193,1
2,0	109	124,2	23,0	124	124,2
3,0	112	151,7	24,0	107	82,8
4,0	118	165,5	24,5	100	69,0
5,0	122	193,1	25,0	97	48,3
6,0	128	262,1	26,0	82	27,6
7,0	133	303,5	27,0	76	34,5
8,0	139	358,7	28,0	72	27,6
9,0	144	427,6	29,0	69	34,5
10,0	149	475,9	30,0	66	27,6
11,0	154	544,9	31,0	64	20,7
12,0	159	620,7	32,5	61	20,7
13,0	164	689,7	33,0	60	13,8
14,0	169	813,9	34,0	59	13,8
15,0	174	910,4	35,0	58	13,8
16,0	179	1034,6	36,0	56	13,8
17,0	186	1172,5	41,0	53	0,00
18,0	191	1310,5	46,0	40	0,00
19,0	196	1441,5	51,0	33	0,00
20,0	200	1600,1	56,0	29	0,00

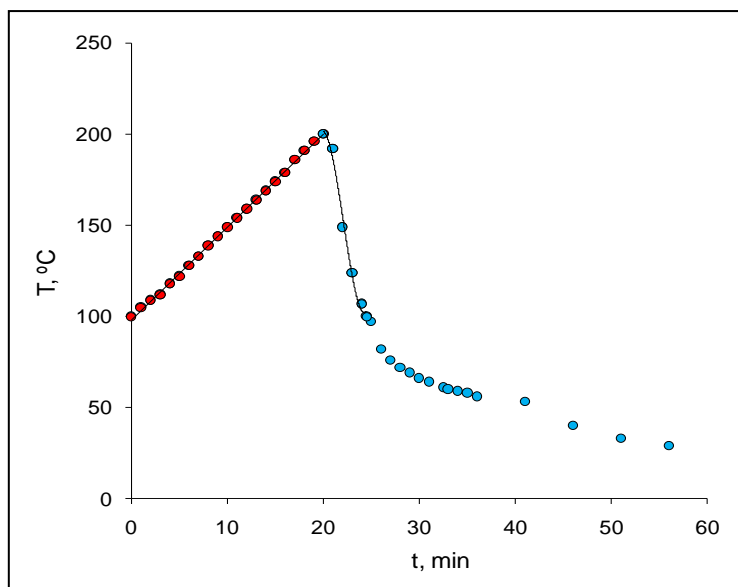


Figura A.2 Evolución de la temperatura con el tiempo de operación en el proceso de hidrólisis ácido a presión ($T_{\max} = 200^{\circ}\text{C}$, $t_h = 0$ min).

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

$$a = v_C = 5,10 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1} \quad r^2 = 0,999$$

$$b = 98,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Región de enfriamiento $T(t) = a' t^3 + b' t^2 + c' t + d'$

$$a' = 2,36 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-3} \quad r^2 = 0,989$$

$$b' = -156,4 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-2}$$

$$c' = 3424 \text{ }^{\circ}\text{C min}$$

$$d' = -24578 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$v_E = dT/dt = 7,08 t^2 - 312,8 t + 3424 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$R_o = 6450,79 \quad \log R_o = 3,81 \quad FSC = 2,51$$

Tabla A.3
Hidrólisis ácida a presión. Ácido sulfúrico 0,05 M, y relación S/L=1/6

t , min	T , °C	P , kPa	t , min	T , °C	P , kPa
0,0	100,00	0,00	27,0	200,00	1200,1
2,0	111,00	55,2	29,0	180,00	724,2
4,0	117,00	103,5	30,0	174,00	620,7
6,0	126,00	158,6	31,0	168,00	538,0
8,0	133,00	200,0	32,0	152,00	89,7
10,0	139,00	269,0	33,0	143,00	27,6
12,0	147,00	358,7	34,0	122,00	-0,3
14,0	155,00	475,9	35,0	100,00	-0,3
15,0	160,00	538,0	36,0	99,00	-0,3
16,0	164,00	606,9	37,0	98,00	-0,3
17,0	168,00	717,3	41,0	98,00	-0,3
18,0	171,00	765,6	44,0	94,00	-0,3
19,0	175,00	841,4	47,0	85,00	-0,3
20,0	178,00	882,8	48,0	84,00	-0,3
21,0	180,00	924,2	49,0	80,00	-0,3
22,0	183,00	979,4	50,0	76,00	-0,3
23,0	185,00	1041,5	51,0	68,00	-0,3
24,0	187,00	1096,6	53,0	62,00	-0,3
25,0	189,00	1131,1	54,0	56,00	-0,3
26,0	191,00	1193,2	56,0	52,00	-0,3

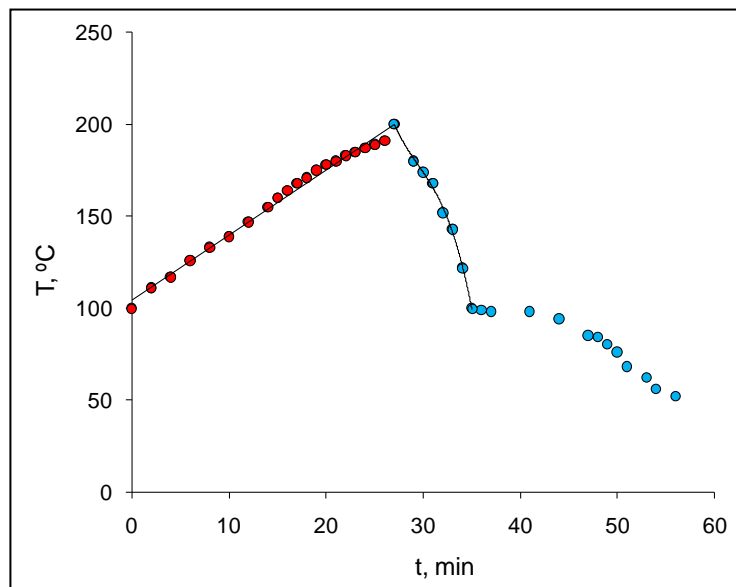


Figura A.3 Evolución de la temperatura con el tiempo de operación en el proceso de hidrólisis ácida a presión ($T_{\max} = 200^{\circ}\text{C}$, $t_h = 0$ min).

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

$$a = v_C = 3,55 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1} \quad r^2 = 0,992$$

$$b = 104,28 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Región de enfriamiento $T(t) = a' t^3 + b' t^2 + c' t + d'$

$$a' = -0,21 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-2} \quad r^2 = 0,997$$

$$b' = 18,39 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$c' = -548,94 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$d' = 5714,05$$

$$v_E = dT/dt = -0,63 t^2 + 36,78 t - 548,94 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$R_o = 4998,96 \quad \log R_o = 3,70 \quad \text{FSC} = 2,40$$

Tabla A.4
Hidrólisis ácida a presión. Ácido sulfúrico 0,05 M, y relación S/L=1/6

t, min	T, °C	P, kPa	t, min	T, °C	P, kPa
0,0	100	1,0	21,0	131	137,9
1,0	103	1,2	22,0	123	103,5
2,0	108	158,6	23,0	100	89,7
3,0	114	200,0	24,0	89	62,1
4,0	119	220,7	25,0	87	62,1
5,0	124	275,9	26,0	79	48,3
6,0	130	296,6	27,0	74	48,3
7,0	135	358,6	28,0	72	48,3
8,0	141	406,9	29,0	73	48,3
9,0	146	482,8	30,0	70	48,3
10,0	151	565,6	31,0	67	48,3
11,0	158	689,7	32,0	66	34,5
12,0	164	758,7	33,0	60	34,5
13,0	170	875,9	34,0	59	27,6
14,0	174	965,6	35,0	57	27,6
15,0	180	1117,3	36,0	56	27,6
16,0	185	1276,0	37,0	54	27,6
17,0	191	1413,9	40,0	53	0,00
18,0	200	1579,4	45,0	45	0,00
19,0	177	1331,1	50,0	37	0,00
20,0	154	641,4	55,0	31	0,00

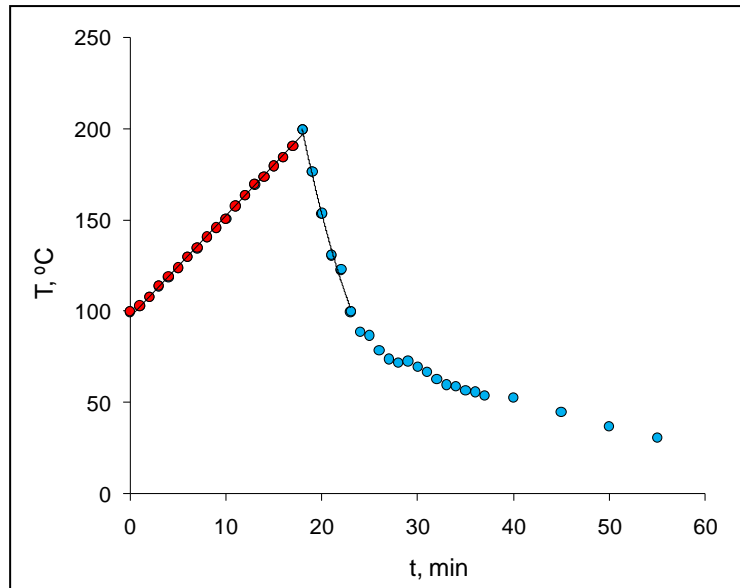


Figura A.4 Evolución de la temperatura con el tiempo de operación en el proceso de hidrólisis ácida a presión ($T_{\max} = 200^{\circ}\text{C}$, $t_h = 0$ min).

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

$$a = v_C = 5,54 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1} \quad r^2 = 0,998$$

$$b = 97,16 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Región de enfriamiento $T(t) = a' t^2 + b' t + c'$

$$a' = 1,07 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-2} \quad r^2 = 0,992$$

$$b' = -63,50 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$c' = 995,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$v_E = dT/dt = 2,14 t - 63,50 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$R_o = 2434,22 \quad \log R_o = 3,39 \quad FSC = 2,09$$

Tabla A.5
Hidrólisis ácida a presión. Ácido sulfúrico 0,05 M, y relación S/L=1/6

t, min	T, °C	P, kPa	t, min	T, °C	P, kPa
0,0	100	96,6	26,0	75	48,3
1,0	102	117,3	27,0	72	41,4
2,0	107	158,6	28,0	70	41,4
3,0	112	172,4	29,0	68	27,6
4,0	118	206,9	30,0	67	27,6
5,0	123	241,4	31,0	65	27,6
6,0	129	289,7	32,0	64	27,6
7,0	135	358,7	33,0	64	27,6
8,0	141	406,9	34,0	62	34,5
9,0	146	475,9	36,0	61	34,5
10,0	151	544,9	37,0	60	34,5
11,0	157	613,8	38,0	59	34,5
12,0	162	710,4	39,0	57	34,5
13,0	168	820,8	44,0	54	13,8
14,0	173	917,3	46,0	51	13,8
15,0	179	1055,3	47,0	49	13,8
16,0	184	1200,1	48,0	46	13,8
17,0	189	1344,9	50,0	43	0,0
18,0	200	1538,1	51,0	41	0,0
19,0	184	965,6	52,0	38	0,0
20,0	165	227,6	53,0	36	0,0
21,	138	131,0	55,0	35	0,0
22,0	121	103,5	56,0	33	0,0
23,0	100	82,8	58,0	30	0,0
24,0	93	55,2	61,0	28	0,0
25,0	84	55,2			

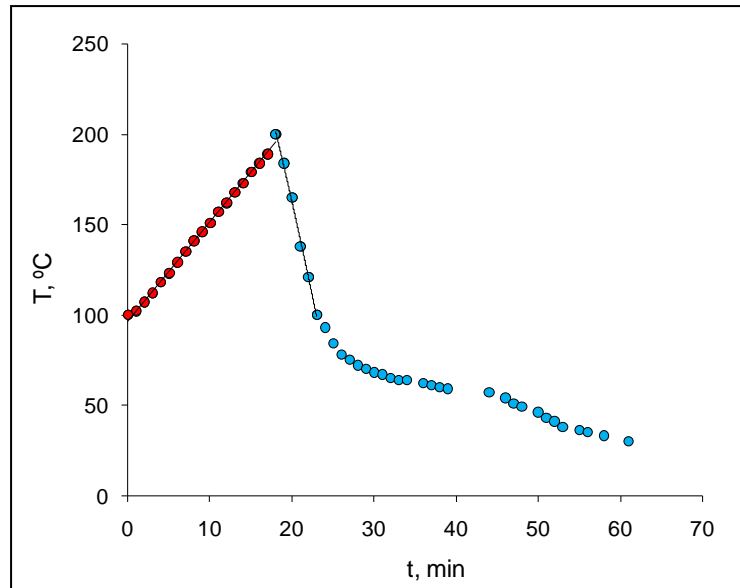


Figura A.5 Evolución de la temperatura con el tiempo de operación en el proceso de hidrólisis ácida a presión ($T_{\max} = 200^{\circ}\text{C}$, $t_h = 0$ min).

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

$$a = v_C = 5,52 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1} \quad r^2 = 0,997$$

$$b = 96,44 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Región de enfriamiento $T(t) = a' t^2 + b' t + c'$

$$a' = -0,30 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-2} \quad r^2 = 0,996$$

$$b' = -8,01 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$c' = 444 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$v_E = dT/dt = -0,60 t - 8,01 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$R_o = 2575,09 \quad \log R_o = 3,41 \quad FSC = 2,11$$

Tabla A.6
Hidrólisis ácida a presión. Ácido sulfúrico 0,05 M, y relación S/L=1/6

t, min	T, °C	P, kPa	t, min	T, °C	P, kPa
0,0	100	103,5	22,0	106	82,8
1,0	104	117,3	22,5	100	69,0
2,0	109	137,9	23,0	93	55,2
3,0	114	172,4	24,0	86	48,3
4,0	119	206,9	25,0	78	48,3
5,0	125	241,4	26,0	75	41,4
6,0	130	303,5	28,0	71	34,5
7,0	135	358,7	30,0	70	34,5
8,0	141	413,8	31,0	69	27,6
9,0	147	482,8	32,0	69	27,6
10,0	153	572,5	34,0	69	27,6
11,0	158	634,5	35,0	69	27,6
12,0	164	744,9	37,0	68	27,6
13,0	170	848,3	40,0	68	27,6
14,0	175	979,4	42,0	66	27,6
15,0	180	1117,3	44,0	63	27,6
16,0	185	1276,0	46,0	61	27,6
17,0	192	1489,8	52,0	63	0,0
18,0	200	1613,9	54,0	60	0,0
19,0	157	558,7	57,0	50	0,0
20,0	151	165,5	60,0	41	0,0
21,0	127	117,3	62,0	37	0,0

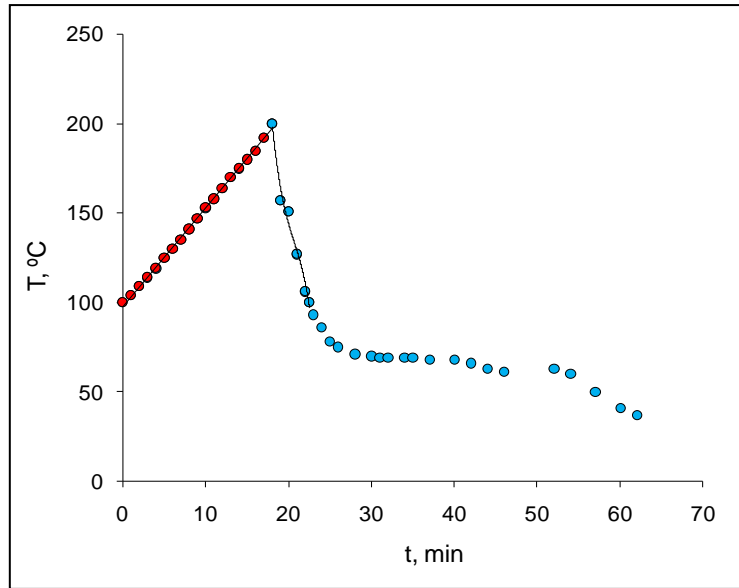


Figura A.6 Evolución de la temperatura con el tiempo de operación en el proceso de hidrólisis ácida a presión ($T_{\max} = 200^{\circ}\text{C}$, $t_h = 0$ min).

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

$$a = v_C = 5,53 \text{ }^{\circ}\text{Cmin}^{-1} \quad r^2 = 0,998$$

$$b = 97,65 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Región de enfriamiento $T(t) = a' t^3 + b' t^2 + c' t + d'$

$$a' = -1,45 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-2} \quad r^2 = 0,980$$

$$b' = 89,57 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$c' = -1861 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$d' = 13132$$

$$v_E = dT/dt = -4,35 t^2 + 179,14 t - 1861 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$R_o = 2275,14 \quad \log R_o = 3,36 \quad \text{FSC} = 2,06$$

Tabla A.7
Hidrólisis ácida a presión. Ácido sulfúrico 0,05 M, y relación S/L=1/6

t, min	T, °C	P, kPa	t, min	T, °C	P, kPa
0,0	100	193,1	31,0	90	0,0
3,0	115	248,3	33,0	85	0,0
4,0	122	310,4	34,0	82	0,0
5,0	127	379,3	36,0	80	0,0
6,0	133	455,2	38,0	77	0,0
7,0	138	517,3	40,0	73	0,0
8,0	144	579,4	41,0	72	0,0
9,0	150	689,7	42,0	71	0,0
10,0	156	793,2	43,0	69	0,0
11,0	161	910,4	46,0	67	0,0
12,0	167	1027,7	47,0	65	0,0
13,0	174	1179,4	48,0	64	0,0
14,0	179	1331,1	49,0	63	0,0
15,0	184	1469,1	50,0	62	0,0
16,0	189	1648,4	51,0	62	0,0
17,0	200	1738,1	52,0	61	0,0
18,0	175	248,3	53,0	60	0,0
19,0	147	110,4	54,0	59	0,0
20,0	133	82,8	55,0	58	0,0
21,0	120	62,1	56,0	57	0,0
22,0	116	48,3	57,0	57	0,0
23,0	114	48,3	59,0	55	0,0
24,0	108	27,6	60,0	55	0,0
25,0	105	27,6	61,0	54	0,0
26,0	102	27,6	67,0	43	0,0
27,0	100	20,7	70,0	32	0,0
28,0	96	20,7	71,0	29	0,0
29,0	95	13,8			

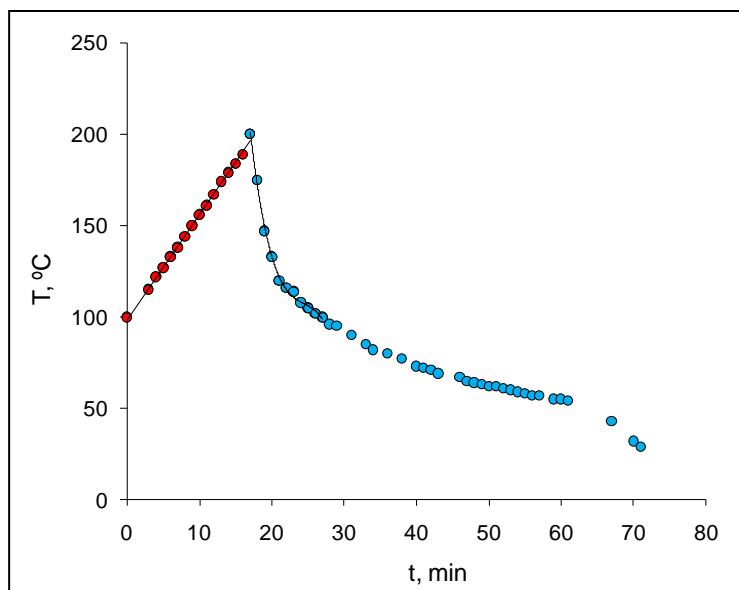


Figura A.7 Evolución de la temperatura con el tiempo de operación en el proceso de hidrólisis ácida a presión ($T_{\max} = 200^{\circ}\text{C}$, $t_h = 0$ min).

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

$$a = v_c = 5,77 \text{ }^{\circ}\text{Cmin}^{-1} \quad r^2 = 0,998$$

$$b = 98,37 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Región de enfriamiento $T(t) = a' t^3 + b' t^2 + c' t + d'$

$$a' = -0,19 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-2} \quad r^2 = 0,996$$

$$b' = 13,94 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$c' = -343 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$d' = 2936$$

$$v_E = dT/dt = -0,57 t^2 + 27,88 t - 343 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$R_o = 2371,63 \quad \log R_o = 3,38 \quad FSC = 2,08$$

Tabla A.8
Hidrólisis ácida a presión. Ácido sulfúrico 0,05 M, y relación S/L=1/6

t , min	T , °C	P , kPa	t , min	T , °C	P , kPa
0,0	100	131,0	26,0	90	27,6
1,0	101	186,2	27,0	87	20,7
2,0	102	200,0	28,0	84	20,7
3,0	105	269,0	29,0	81	20,7
4,0	111	289,7	30,0	78	13,8
5,0	120	338,0	32,0	74	13,8
6,0	128	413,8	33,0	71	0,0
7,0	134	455,2	34,0	69	0,0
8,0	141	544,9	35,0	68	0,0
9,0	147	613,8	36,0	66	0,0
10,0	153	710,4	37,0	64	0,0
11,0	159	800,1	38,0	62	0,0
12,0	164	917,3	39,0	61	0,0
13,0	170	1055,3	40,0	59	0,0
14,0	175	1207,0	41,0	58	0,0
15,0	180	1351,8	42,0	57	0,0
16,0	185	1531,2	43,0	56	0,0
17,0	192	1703,6	44,0	54	0,0
18,0	196	1841,5	45,0	53	0,0
19,0	200	1855,3	46,0	52	0,0
20,0	171	1144,9	47,0	51	0,0
21,0	138	269,0	48,0	50	0,0
22,0	124	82,8	52,0	49	0,0
23,0	116	48,3	54,0	38	0,0
24,0	105	41,4	55,0	33	0,0
24,5	100	27,6	66,0	29	0,0
25,0	96	27,6	67,0	26	0,0

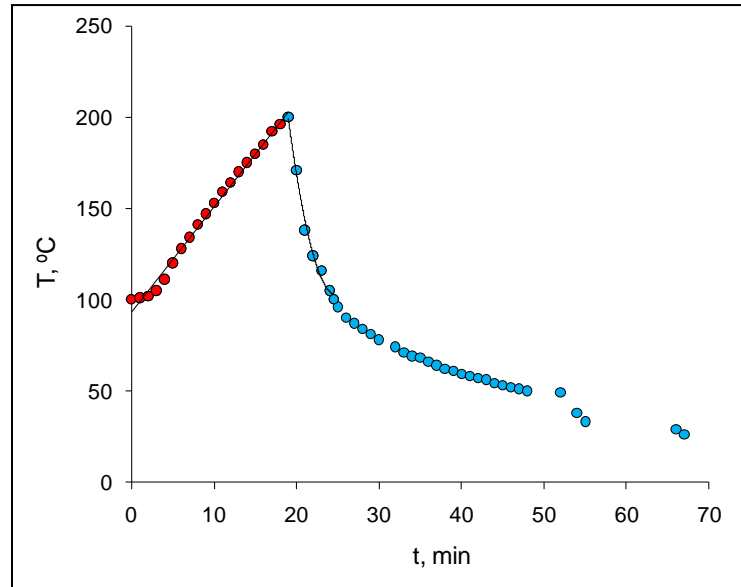


Figura A.8 Evolución de la temperatura con el tiempo de operación en el proceso de hidrólisis ácido a presión ($T_{\max} = 200^{\circ}\text{C}$, $t_h = 0$ min).

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

$$a = v_C = 5,76 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1} \quad r^2 = 0,993$$

$$b = 93,41 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Región de enfriamiento $T(t) = a' t^2 + b' t + c'$

$$a' = 2,97 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-2} \quad r^2 = 0,991$$

$$b' = -146,8 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$c' = 1917 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$v_E = dT/dt = 5,94 t - 146,8 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$R_o = 3182,30 \quad \log R_o = 3,50 \quad FSC = 2,20$$

Tabla A.9
Hidrólisis ácida a presión. Ácido sulfúrico 0,05 M, y relación S/L=1/6

t, min	T, °C	P, kPa	t, min	T, °C	P, kPa
0,0	100	124,2	27,0	95	34,5
1,00	101	158,6	29,0	88	20,7
2,0	102	193,1	30,0	84	20,7
3,5	105	255,2	31,0	82	13,8
4,0	116	275,9	32,0	80	13,8
5,0	124	358,7	33,0	77	13,8
6,0	131	427,6	34,0	76	13,8
7,0	137	517,3	35,0	73	13,8
8,0	142	565,6	36,0	71	13,8
9,0	148	648,3	37,0	69	0,0
10,0	154	751,8	38,0	67	0,0
11,0	159	827,7	39,5	65	0,0
12,0	165	944,9	40,0	64	0,0
13,0	170	1062,2	41,0	63	0,0
14,0	175	1207,0	42,0	61	0,0
15,0	180	1331,1	43,0	60	0,0
16,0	185	1455,3	44,0	59	0,0
17,0	190	1600,1	45,0	57	0,0
18,0	194	1724,3	46,0	56	0,0
19,0	200	1820,8	47,0	55	0,0
20,0	166	282,8	48,0	54	0,0
21,0	138	103,5	49,0	53	0,0
22,0	125	82,8	50,0	51	0,0
23,0	119	55,2	55,0	42	0,0
24,0	111	48,3	57,0	32	0,0
25,0	106	48,3	58,0	28	0,0
26,0	100	41,4			

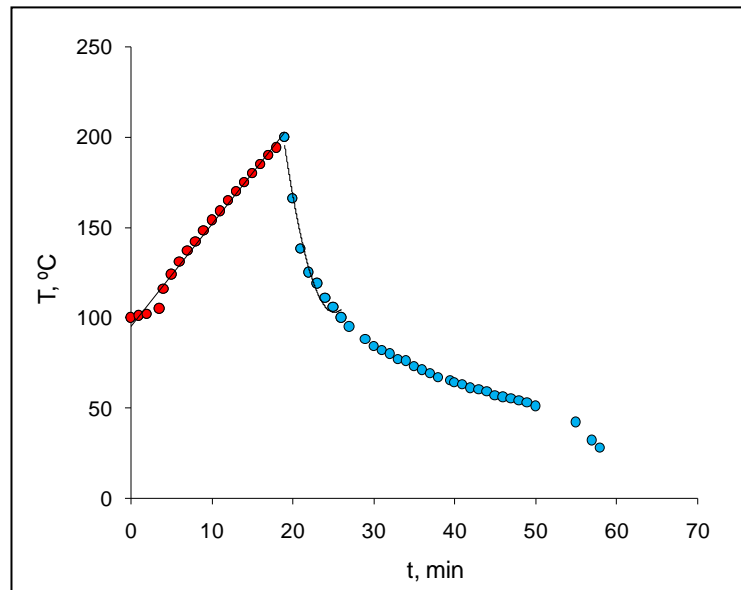


Figura A.9 Evolución de la temperatura con el tiempo de operación en el proceso de hidrólisis ácido a presión ($T_{\max} = 200^{\circ}\text{C}$, $t_h = 0$ min).

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

$$a = v_C = 5,64 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1} \quad r^2 = 0,990$$

$$b = 95,18 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Región de enfriamiento $T(t) = a' t^2 + b' t + c'$

$$a' = 2,41 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-2} \quad r^2 = 0,981$$

$$b' = -121,4 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$c' = 1632 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$v_E = dT/dt = 4,82 t - 121,4 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$R_o = 3084,62 \quad \log R_o = 3,49 \quad FSC = 2,19$$

Tabla A.10
Hidrólisis ácida a presión. Ácido sulfúrico 0,05 M, y relación S/L=1/6

t, min	T, °C	P, kPa	t, min	T, °C	P, kPa
0,0	100	34,5	25,0	111	20,7
2,0	110	103,5	25,5	100	20,7
4,0	121	200,0	26,0	87	20,7
6,0	133	296,6	28,0	83	13,8
7,0	136	338,0	29,0	80	13,8
8,0	143	393,1	31,0	76	13,8
9,0	146	420,7	32,0	74	13,8
10,0	152	469,00	33,0	73	13,8
11,0	158	565,6	34,0	72	13,8
12,0	162	641,4	35,0	70	0,0
13,0	165	675,9	36,0	70	0,0
14,0	171	827,7	37,0	69	0,0
15,0	173	855,2	38,0	68	0,0
16,0	178	993,2	40,0	67	0,0
17,0	181	1055,3	42,0	66	0,0
18,0	188	1255,3	44,0	66	0,0
19,0	190	1303,6	49,0	64	0,0
20,0	193	1400,1	54,0	62	0,0
21,0	197	1517,4	59,0	59	0,0
22,0	200	1531,2	64,0	48	0,0
23,0	176	351,8	69,0	32	0,0
24,0	143	20,7	71,0	27	0,0

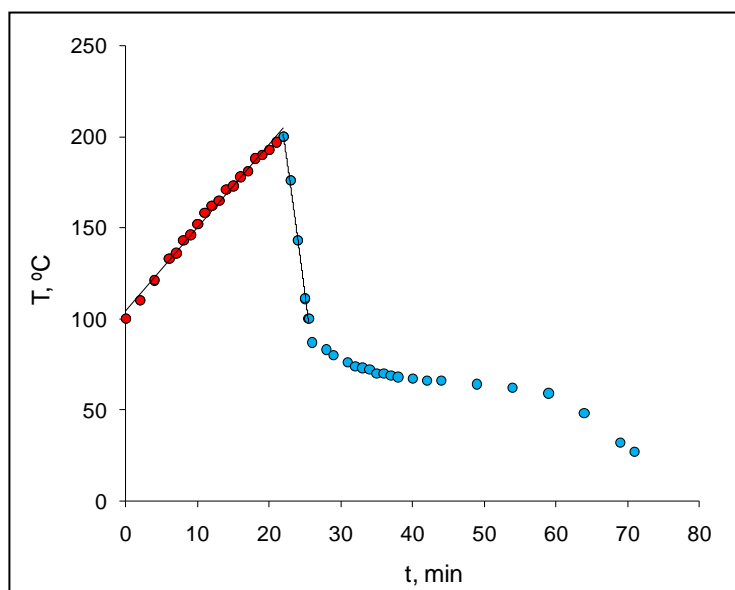


Figura A.10 Evolución de la temperatura con el tiempo de operación en el proceso de hidrólisis ácida a presión ($T_{\max} = 200^{\circ}\text{C}$, $t_h = 0$ min).

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

$$a = v_C = 4,55 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1} \quad r^2 = 0,992$$

$$b = 104,3 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Región de enfriamiento $T(t) = a' t^2 + b' t + c'$

$$a' = -0,604 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-2} \quad r^2 = 0,997$$

$$b' = -0,79 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$c' = 510,9 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$v_E = dT/dt = -1,208 t - 0,79 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$R_o = 4418,57 \quad \log R_o = 3,65 \quad FSC = 2,35$$

Tabla A.11
Hidrólisis ácida a presión. Ácido sulfúrico 0,05 M, y relación S/L=1/6

<i>t</i> , min	<i>T</i> , °C	<i>P</i> , kPa	<i>t</i> , min	<i>T</i> , °C	<i>P</i> , kPa
0,0	100	158,6	37,0	71	20,7
2,0	111	227,6	38,0	71	13,8
5,0	132	365,6	39,0	71	13,8
6,0	141	441,4	41,0	70	13,8
7,0	145	475,9	43,0	70	6,9
8,0	149	517,3	44,0	69	6,9
10,0	159	613,8	46,0	69	6,9
12,0	167	724,2	47,0	68	6,9
13,0	171	786,3	48,0	68	0,0
14,0	175	855,2	51,0	67	0,0
15,0	178	938,00	52,0	67	0,0
16,0	182	1034,6	53,0	66	0,0
17,0	186	1172,5	54,0	66	0,0
18,0	189	1262,2	55,0	65	0,0
19,0	193	1344,9	56,0	65	0,0
20,0	196	1448,4	57,0	65	0,0
21,0	200	1510,5	58,0	64	0,0
22,0	175	179,3	59,0	64	0,0
23,0	130	89,7	61,0	63	0,0
24,0	106	55,2	63,0	62	0,0
24,5	100	48,3	65,0	61	0,0
25,0	94	48,3	66,0	61	0,0
26,0	86	34,5	67,0	61	0,0
27,0	83	34,5	68,0	60	0,0
28,0	81	34,5	69,0	60	0,0
29,0	80	34,5	70,0	59	0,0
30,0	78	34,5	73,0	58	0,0
31,0	77	27,6	78,0	51	0,0
32,0	76	27,6	81,0	41	0,0
33,0	74	27,6	83,0	33	0,0
34,0	73	27,6	85,0	27	0,0
36,0	72	20,7			

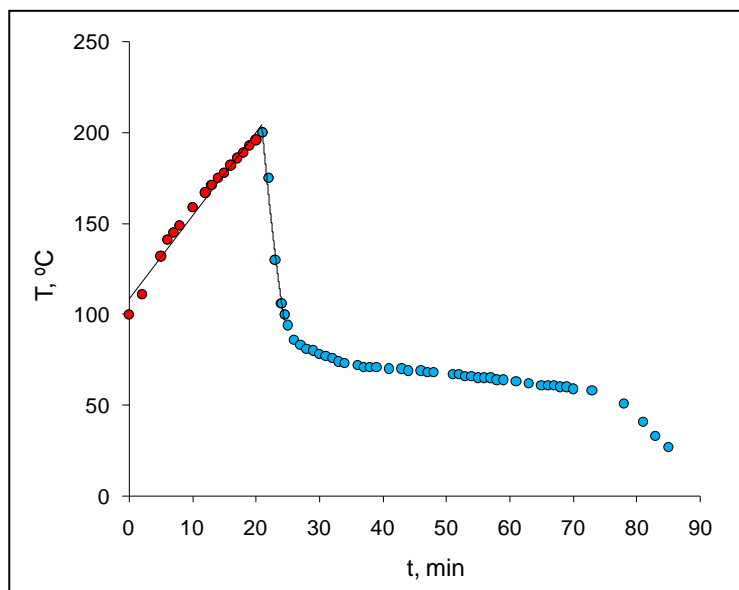


Figura A.11 Evolución de la temperatura con el tiempo de operación en el proceso de hidrólisis ácido a presión ($T_{\max} = 200^{\circ}\text{C}$, $t_h = 0$ min).

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

$$a = v_C = 4,57 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1} \quad r^2 = 0,980$$

$$b = 108,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Región de enfriamiento $T(t) = a' t^2 + b' t + c'$

$$a' = 2,34 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-2} \quad r^2 = 0,984$$

$$b' = -136,6 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$c' = 2042 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$v_E = dT/dt = 4,68 t - 136,6 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$R_o = 4389,85 \quad \log R_o = 3,64 \quad FSC = 2,34$$

Tabla A.12
Hidrólisis ácida a presión. Ácido sulfúrico 0,05 M, y relación S/L=1/6

<i>t</i> , min	<i>T</i> , °C	<i>P</i> , kPa	<i>t</i> , min	<i>T</i> , °C	<i>P</i> , kPa
0,0	100	165,5	28,0	76	27,6
1,0	113	220,7	33,0	70	27,6
2,0	118	262,1	34,0	69	27,6
3,0	125	303,5	35,0	69	20,7
4,0	132	413,8	36,0	68	20,7
5,0	137	441,4	38,0	67	13,8
6,0	143	524,2	39,0	67	13,8
7,0	148	593,2	40,0	66	6,9
8,0	153	655,2	41,0	66	6,9
9,0	159	738,0	42,0	66	6,9
10,0	164	807,0	43,0	66	6,9
11,0	169	882,8	44,0	65	6,9
12,0	174	979,4	45,0	65	0,0
13,0	179	1055,3	46,0	64	0,0
14,0	183	1207,0	48,0	63	0,0
15,0	187	1282,9	49,0	63	0,0
16,0	191	1372,5	50,0	62	0,0
17,0	194	1441,5	51,0	62	0,0
18,0	200	1538,1	52,0	61	0,0
19,0	183	227,6	53,0	61	0,0
20,0	132	117,3	54,0	60	0,0
21,0	100	41,4	55,0	60	0,0
22,0	91	41,4	56,0	59	0,0
23,0	87	34,5	62,0	46	0,0
24,0	83	34,5	63,0	37	0,0
26,0	79	34,5	65,0	30	0,0
27,0	78	27,6			

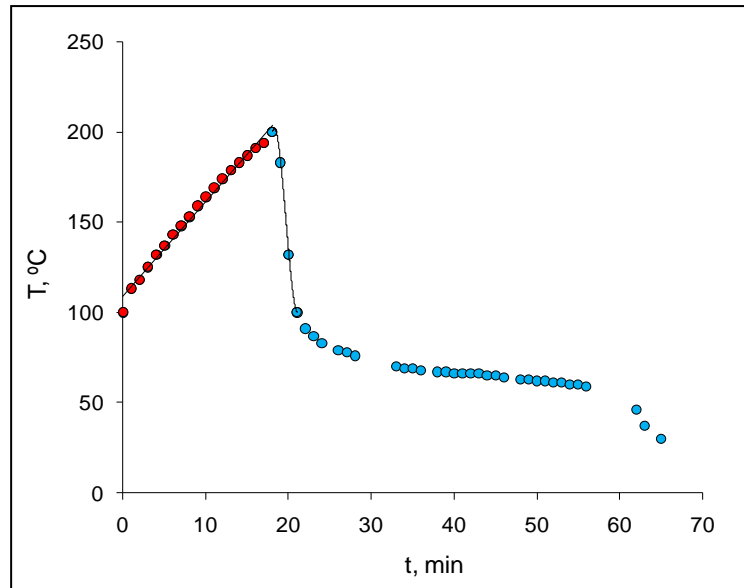


Figura A.12 Evolución de la temperatura con el tiempo de operación en el proceso de hidrólisis ácido a presión ($T_{\max} = 200^{\circ}\text{C}$, $t_h = 0$ min).

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

$$a = v_c = 5,26 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1} \quad r^2 = 0,989$$

$$b = 108,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Región de enfriamiento $T(t) = a' t^3 + b' t^2 + c' t + d'$

$$a' = 8,83 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-2} \quad r^2 = 1,000$$

$$b' = -520,5 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$c' = 10170 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$d' = -65728$$

$$v_E = dT/dt = 26,49 t^2 - 1041 t + 10170 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$R_o = 3418,73 \quad \log R_o = 3,53 \quad FSC = 2,23$$

Tabla A.13
Hidrólisis ácida a presión. Ácido sulfúrico 0,05 M, y relación S/L=1/6

t , min	T , °C	P , kPa	t , min	T , °C	P , kPa
0,0	100	158,6	22,0	107	27,6
1,0	108	206,9	23,0	100	27,6
2,0	114	227,6	24,0	93	27,6
3,0	116	248,3	25,0	90	27,6
4,0	122	303,5	26,0	88	27,6
5,0	128	365,6	27,0	85	27,6
6,0	133	434,5	28,0	83	20,7
7,0	138	496,6	29,0	80	20,7
8,0	145	606,9	30,0	78	20,7
9,0	149	669,0	32,0	75	20,7
10,0	155	779,4	33,0	73	13,8
11,0	162	910,4	34,0	72	13,8
12,0	168	1055,3	35,0	70	13,8
13,0	174	1213,9	36,0	68	13,8
14,0	180	1372,5	37,0	67	13,8
15,0	186	1579,4	38,0	66	13,8
16,0	193	1758,8	39,0	64	0,0
17,0	200	1889,8	40,0	63	0,0
18,0	183	344,9	44,0	57	0,0
19,0	145	103,5	47,0	39	0,0
20,0	125	48,3	49,0	32	0,0
21,0	116	41,4	50,0	29	0,0

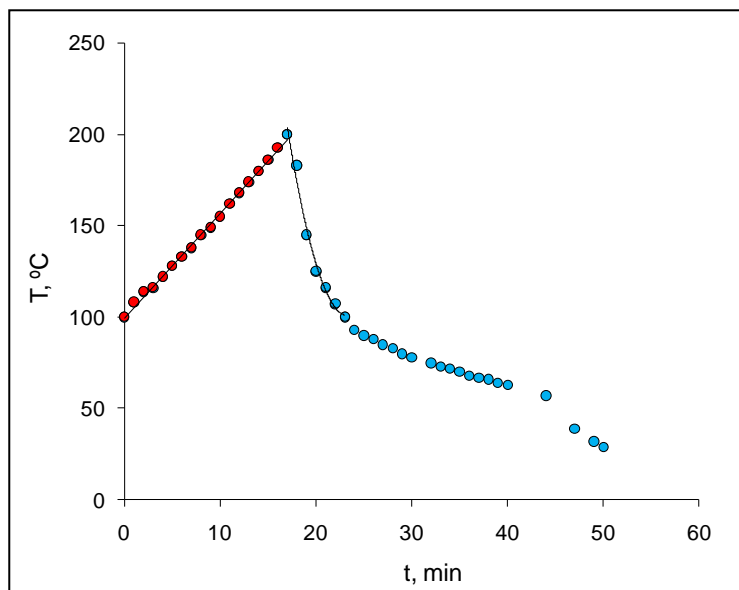


Figura A.13 Evolución de la temperatura con el tiempo de operación en el proceso de hidrólisis ácido a presión ($T_{\max} = 200^{\circ}\text{C}$, $t_h = 0$ min).

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

$$a = v_C = 5,74 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1} \quad r^2 = 0,997$$

$$b = 99,59 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Región de enfriamiento $T(t) = a' t^2 + b' t + c'$

$$a' = 2,58 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-2} \quad r^2 = 0,985$$

$$b' = -120,5 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$c' = 1506 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$v_E = dT/dt = 5,16 t - 120,5 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$R_o = 2493,88 \quad \log R_o = 3,40 \quad FSC = 2,10$$

Tabla A.14
Hidrólisis ácida a presión. Ácido sulfúrico 0,05 M, y relación S/L=1/6

t, min	T, °C	P, kPa	t, min	T, °C	P, kPa
0,0	100	117,3	27,0	88	27,6
1,0	107	144,8	28,0	86	27,6
2,0	114	200,0	29,0	85	13,8
3,0	120	227,6	30,0	83	13,8
4,0	128	310,4	31,0	81	13,8
5,0	133	358,7	32,0	79	13,8
6,0	139	469,0	33,0	78	13,8
7,0	146	572,5	34,0	77	13,8
8,0	153	675,9	35,0	75	13,8
9,0	161	786,3	36,0	74	13,8
10,0	168	938,0	37,0	73	13,8
11,0	173	1055,3	38,0	71	13,8
12,0	179	1234,6	39,0	70	0,0
13,0	185	1413,9	40,0	69	0,0
14,0	191	1607,0	41,0	68	0,0
15,0	197	1772,6	42,0	67	0,0
16,0	200	1917,4	43,0	65	0,0
17,0	177	434,5	44,0	65	0,0
18,0	135	89,7	45,0	64	0,0
19,0	124	89,7	49,0	54	0,0
20,0	119	48,3	50,0	46	0,0
21,0	111	41,4	51,0	40	0,0
23,0	100	34,5	52,0	37	0,0
24,0	96	27,6	53,0	34	0,0
25,0	93	27,6	54,0	30	0,0
26,0	90	27,6			

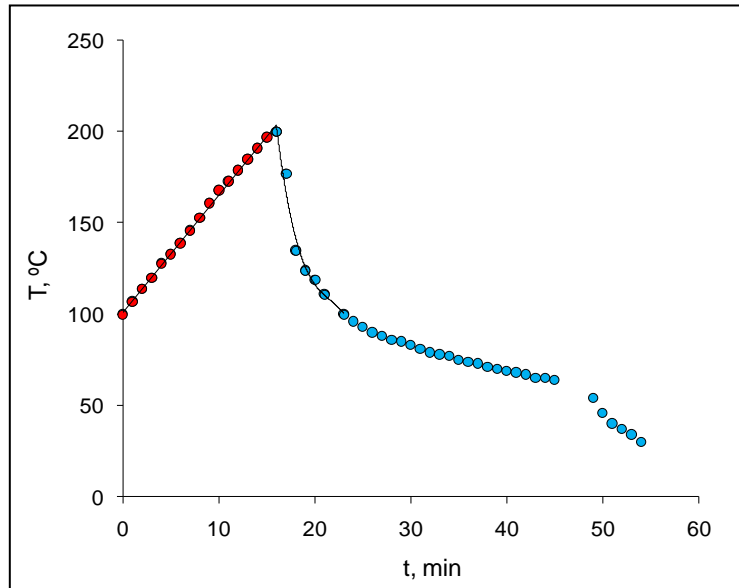


Figura A.14 Evolución de la temperatura con el tiempo de operación en el proceso de hidrólisis ácido a presión ($T_{\max} = 200^{\circ}\text{C}$, $t_h = 0$ min).

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

$$a = v_c = 6,41 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1} \quad r^2 = 0,998$$

$$b = 101,3 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Región de enfriamiento $T(t) = a' t^3 + b' t^2 + c' t + d'$

$$a' = -0,41 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-3} \quad r^2 = 0,978$$

$$b' = 26,41 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-2}$$

$$c' = -574,7 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$d' = 4306 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$v_E = dT/dt = -1,23 t^2 + 52,82 t - 574,7 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$R_o = 3243,54 \quad \log R_o = 3,51 \quad FSC = 2,21$$

Tabla A.15
Hidrólisis ácida a presión. Ácido sulfúrico 0,05 M, y relación S/L=1/6

t, min	T, °C	P, kPa	t, min	T, °C	P, kPa
0,0	100	117,3	24,0	100	34,5
1,0	105	124,2	25,0	97	34,5
2,0	110	144,8	26,0	92	27,6
3,0	115	172,4	27,0	90	27,6
4,0	121	227,6	28,0	87	27,6
5,0	128	303,5	29,0	84	27,6
6,0	135	358,7	30,0	82	27,6
7,0	137	400,0	31,0	80	20,7
8,0	146	517,3	32,0	78	13,8
9,0	150	579,4	33,0	76	13,8
10,0	156	682,8	34,0	74	13,8
11,0	163	827,7	35,0	72	13,8
12,0	169	965,6	36,0	71	13,8
13,0	173	1055,6	37,0	70	13,8
14,0	175	1227,7	38,0	68	13,8
15,0	181	1372,5	39,0	67	6,90
16,0	186	1482,9	40,0	66	0,0
17,0	191	1655,3	41,0	64	0,0
18,0	200	1813,9	46,0	51	0,0
19,0	187	220,7	47,0	45	0,0
20,0	134	96,6	48,0	40	0,0
21,0	122	55,2	49,0	36	0,0
22,0	114	48,3	50,0	32	0,0
23,0	108	48,3			

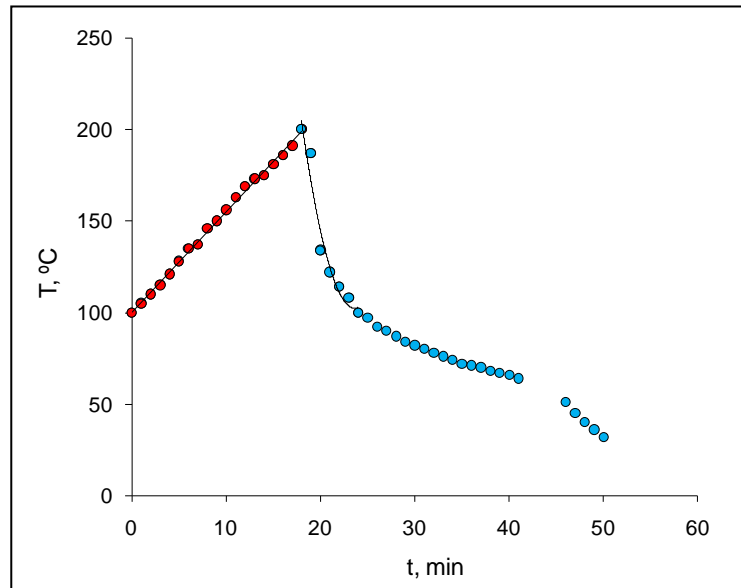


Figura A.15 Evolución de la temperatura con el tiempo de operación en el proceso de hidrólisis ácido a presión ($T_{\max} = 200^{\circ}\text{C}$, $t_h = 0$ min).

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

$$a = v_C = 5,49 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1} \quad r^2 = 0,997$$

$$b = 100,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Región de enfriamiento $T(t) = a' t^2 + b' t + c'$

$$a' = 3,19 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-2} \quad r^2 = 0,955$$

$$b' = -151 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$c' = 1890 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$v_E = dT/dt = 6,38 t - 151 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$$

$$R_o = 2833,28 \quad \log R_o = 3,45 \quad FSC = 2,15$$

ANEXO B. FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON *Hansenula polymorpha*

B.1 Influencia de la naturaleza del sustrato

Fijada la temperatura a 40°C y 4,5 de *pH* inicial, así como las condiciones de microaeración (entrada de aire sólo por el vórtice de agitación), se realizó una serie de experimentos de fermentación con *H. polymorpha*, modificándose únicamente la pentosa a fermentar (D-arabinosa, L-arabinosa y D-xilosa), partiendo de igual concentración inicial en la misma, 25 g dm⁻³. Los procesos de fermentación llevados a cabo con D-arabinosa y L-arabinosa se realizaron como mínimo por duplicado.

Se pretende observar el efecto de la modificación del sustrato en el proceso de fermentación. Toda esta serie experimental se ha realizado utilizando un agitador orbital tal como fue descrito en el apartado de Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.

Los resultados experimentales obtenidos en cuanto a evolución del *pH*, generación de biomasa, consumo de sustrato, y formación de bioproductos durante el transcurso del proceso de fermentación se han indicado en las Tablas B.1 a B.6, y se han representado en las Figuras B.1 a B.6 los mismos parámetros excepto el *pH* y la concentración de etanol; cuando el sustrato es D o L-arabinosa se representa la concentración de arabitol que debe ser el bioproducto de mayor concentración, y cuando el sustrato es D-xilosa en las gráficas se muestra la concentración de xilitol.

En esta serie experimental de naturaleza del sustrato se han realizado 6 experimentos cuya nomenclatura es F-Sn, donde F simboliza fermentación, S sustrato y n es el número que representa a la pentosa fermentada, siendo 1, 2 y 3 los correspondientes a D-arabinosa, L-arabinosa y D-xilosa respectivamente. En caso de experimentos realizados como mínimo por duplicado, se ha finalizado la nomenclatura con letras del alfabeto en serie (a, b, c, etc.).

Tabla B.1
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
Variación del *pH*, y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. F-S1a	$T = 40^{\circ}\text{C}$	$\text{pH}_0 = 4,5$	microaeración	$\text{D-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$			
t, h	pH	$x, \text{g dm}^{-3}$	$\text{ART}, \text{g dm}^{-3}$	$\text{Ac}, \text{g dm}^{-3}$	$E, \text{g dm}^{-3}$	$Xl, \text{g dm}^{-3}$	$\text{Ar}, \text{g dm}^{-3}$
0,0	4,5	0,072	24,750	0,000	0,005		0,000
21,0	6,2	0,665	19,938	0,000	0,006		
45,5	6,3	1,286	18,273	0,000	0,002	0,000	0,159
117,0	6,1	2,030	13,243	0,000	0,011	0,047	
164,5	6,0	2,463	10,086	0,000	0,006	0,047	0,385
189,5	5,9	3,301	4,604	0,000	0,003		1,964
214,0	5,8	3,183	3,355	0,002	0,004	0,035	0,938

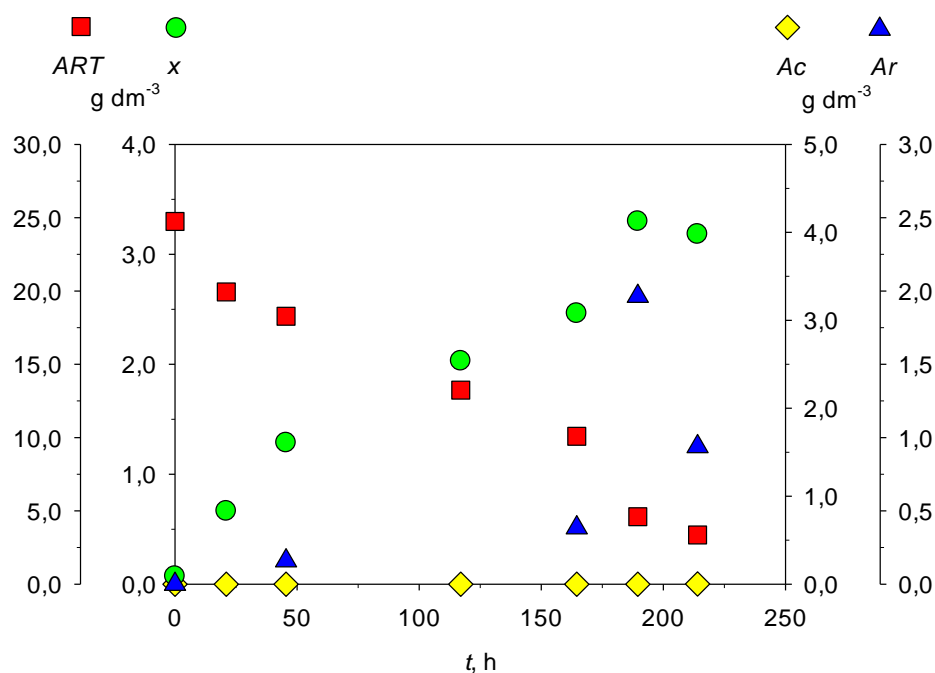


Figura B.1 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación F-S1a con *H. polymorpha*, 40°C y 4,5 de pH , en condiciones de microaeración con $\text{D-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla B.2
 FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
 Variación del pH , y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. F-S1b	$T = 40^{\circ}\text{C}$	$pH_0 = 4,5$	microaeración	$D\text{-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$			
t, h	pH	$x, \text{g dm}^{-3}$	$ART, \text{g dm}^{-3}$	$Ac, \text{g dm}^{-3}$	$E, \text{g dm}^{-3}$	$Xi, \text{g dm}^{-3}$	$Ar, \text{g dm}^{-3}$
0,0	4,5	0,044	24,3363	0,005	0,000		
1,5	4,6	0,048	23,314	0,023	0,000		
17,0	4,8	0,215	22,660	0,000	0,003		
46,0	4,7	0,405	21,044	0,001	0,000	0,009	
92,5	5,6	0,589	18,274	0,001	0,000		
165,0	5,3	1,441		0,004	0,004	0,013	0,044
207,0	6,4	1,075		0,002	0,002	0,010	0,008
332,0	4,7	2,409	11,887	0,020	0,082	0,083	0,862
380,0	4,6	2,398	11,292	0,009	0,003	0,029	0,573
404,0	4,4	2,656	5,978	0,003	0,004		0,075

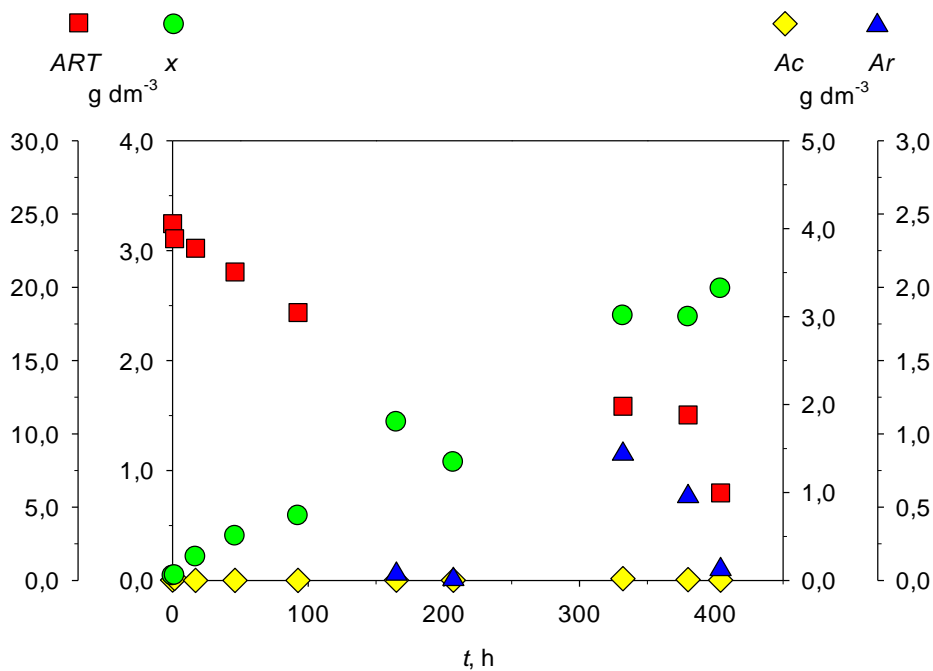


Figura B.2 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación F-S1b, con *H. polymorpha*, 40°C y 4,5 de pH , en condiciones de microaeración con $D\text{-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla B.3
 FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
 Variación del *pH*, y de las concentraciones de biomasa, ácido acético, etanol, xilitol, arabitol y el índice de inhibición

Expto. F-S1c	$T = 40^{\circ}\text{C}$	$\text{pH}_0 = 4,5$	microaeración	$\text{D-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$			
t, h	pH	$x, \text{g dm}^{-3}$	$\text{Ac}, \text{g dm}^{-3}$	l	$E, \text{g dm}^{-3}$	$Xl, \text{g dm}^{-3}$	$\text{Ar}, \text{g dm}^{-3}$
0,0	4,5	0,142		5,250			
1,0	4,5	0,196		6,600			
2,5	4,5	0,202		4,450			
4,0	4,6	0,230		5,800	0,000		
16,5	5,5	0,553	0,000	3,900	0,028	0,001	
28,0	5,6	0,527		4,400	0,000		
46,5	5,8	0,667		6,700	0,000	0,001	
68,0	5,8	1,213	0,000	6,350	0,000	0,007	0,004
137,0	5,4	2,839		5,700		0,002	0,067
153,0	5,3	3,011	0,000	8,300	0,000	0,007	0,161
176,5	5,2	2,925	0,000	8,300	0,000	0,011	0,214

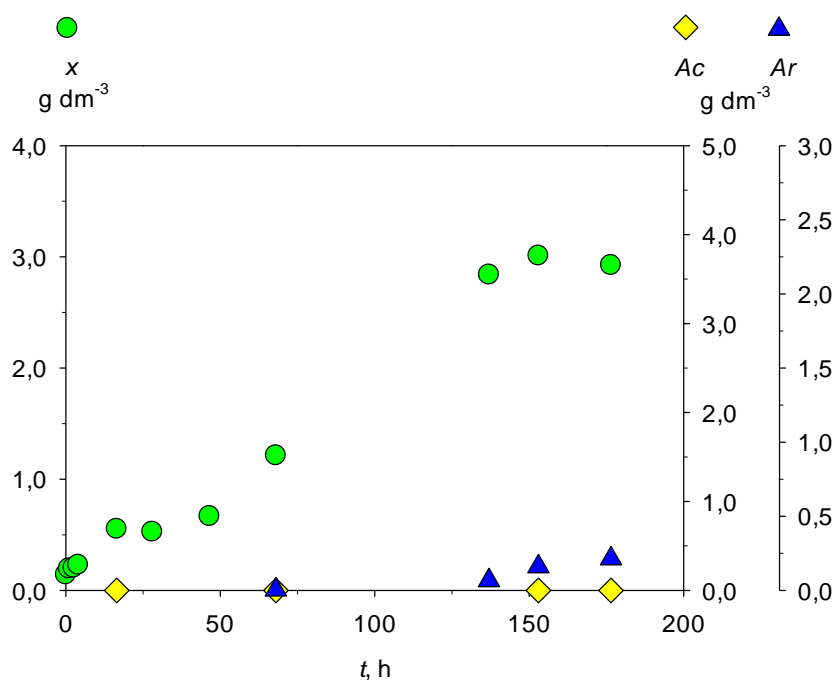


Figura B.3 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación F-S1c, con *H. polymorpha*, 40°C y $4,5$ de pH , en condiciones de microaeración con $\text{D-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla B.4
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS

Variación del pH , y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. F-S2a	$T = 40^{\circ}\text{C}$	$pH_0 = 4,5$	microaeración	$L\text{-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$			
t , h	pH	x , g dm^{-3}	ART , g dm^{-3}	Ac , g dm^{-3}	E , g dm^{-3}	Xi , g dm^{-3}	Ar , g dm^{-3}
0,0	4,5	0,083	24,750	0,000	0,009		0,000
21,0	6,3	0,935	22,068	0,000	0,023		0,100
45,5	6,4	1,484	19,819	0,000	0,004	0,035	0,415
117,0	6,3	2,649	14,918	0,012	0,005	0,082	0,644
164,5	6,3	2,731	13,665	0,000	0,009	0,023	0,304
189,5	6,2	3,430	9,353	0,000	0,004		0,056
214,0	6,0	3,086	9,500	0,000	0,004	0,047	0,504

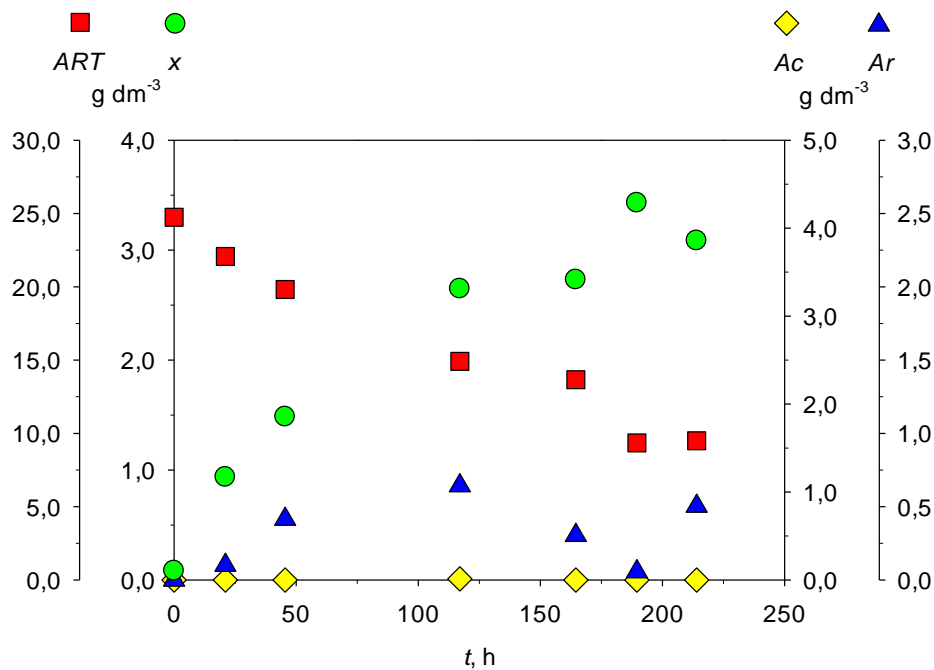


Figura B.4 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación F-S2a, con *H. polymorpha*, 40°C y 4,5 de pH , en condiciones de microaeración con $L\text{-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla B.5
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
Variación del *pH*, y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. F-S2b	$T = 40^{\circ}\text{C}$	$\text{pH}_0 = 4,5$	microaeración	$\text{L-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$			
t, h	pH	$x, \text{g dm}^{-3}$	$\text{ART}, \text{g dm}^{-3}$	$\text{Ac}, \text{g dm}^{-3}$	$E, \text{g dm}^{-3}$	$Xl, \text{g dm}^{-3}$	$\text{Ar}, \text{g dm}^{-3}$
0,0	4,5	0,047	24,336	0,012	0,000		
1,5	4,5	0,047	23,745	0,015	0,000		
3,0	4,6	0,048		0,000	0,001		0,090
18,5	4,7	0,263		0,005	0,033		0,323
47,5	5,2	0,641		0,000	0,005	0,014	0,341
94,0	5,8	0,908	17,955	0,001	0,002		0,471
166,5	6,7	1,024	16,844	0,000	0,000	0,016	0,183
208,5	6,7	1,280		0,008	0,008	0,010	0,231
333,5	6,5	1,871	15,179	0,000	0,000	0,009	0,010
381,5	6,5	1,775	14,465	0,002	0,000		
405,5	6,3	2,215	12,244	0,003	0,000	0,010	0,009

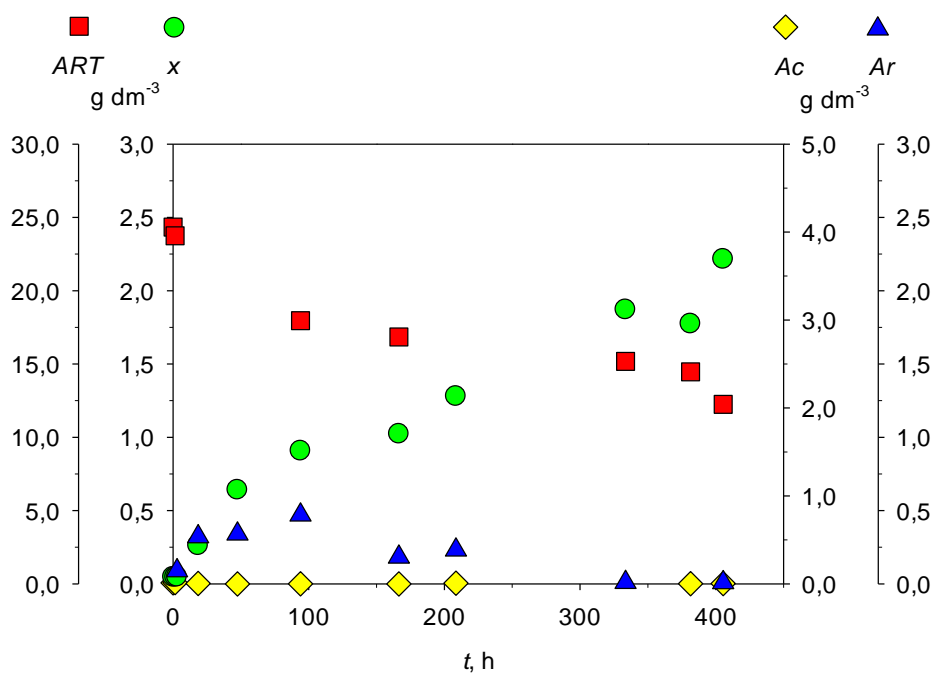


Figura B.5 Variación de la concentración de biomasa (*x*), azúcares reductores totales (*ART*), ácido acético (*Ac*) y arabitol (*Ar*) en el experimento de fermentación F-S2b, con *H. polymorpha*, 40°C y 4,5 de *pH*, en condiciones de microaeración con $\text{L-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla B.6
 FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
 Variación del pH , y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y el índice de inhibición

Expto. F-S3	$T = 40^{\circ}\text{C}$	$pH_0 = 4,5$	microaeración	$D\text{-XIL}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$			
t, h	pH	$x, \text{g dm}^{-3}$	$ART, \text{g dm}^{-3}$	$Ac, \text{g dm}^{-3}$	l_i	$E, \text{g dm}^{-3}$	$X_i, \text{g dm}^{-3}$
0,0	4,5	0,142	23,803		5,250		0,000
1,0	4,4	0,151	23,335		7,800		
2,5	4,4	0,217			7,250		
4,0	4,4	0,273			5,050	0,000	
16,5	4,7	0,613	20,567	0,000	7,400	0,063	0,140
28,0	4,6	0,905	19,309		7,850	0,113	0,770
46,5	4,6	1,243	16,542		7,700		0,875
68,0	4,1	1,884	11,510	0,000	7,600	0,002	
137,0	3,8	1,914	5,723		7,550		
153,0	3,8	2,334	3,710	0,000	7,150	0,000	2,250
176,5	3,8	2,645	3,509	0,000	6,900	0,000	3,568

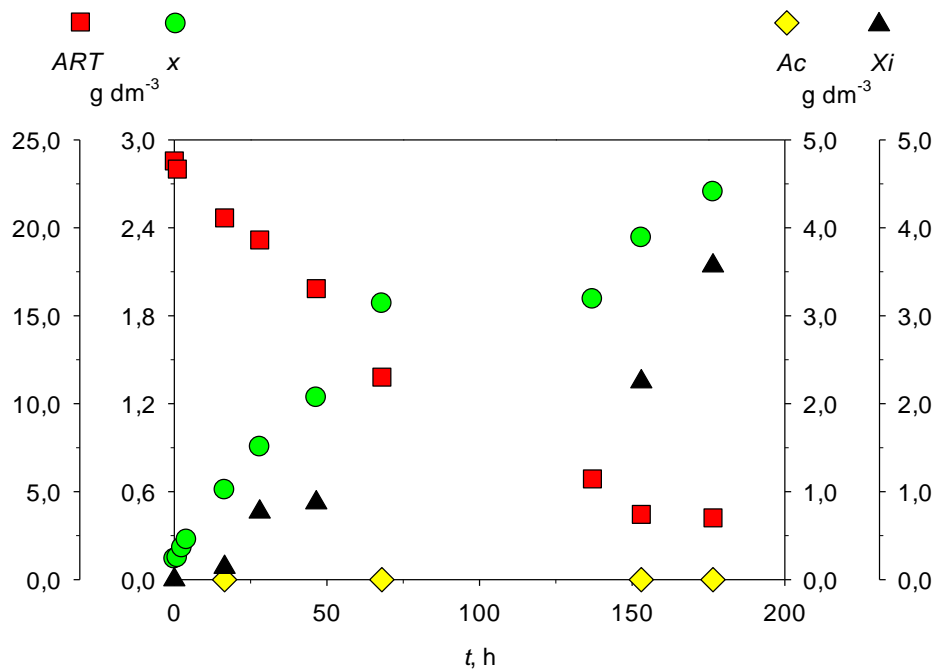


Figura B.6 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y xilitol (X_i) en el experimento de fermentación F-S3, con *H. polymorpha*, 40°C y 4,5 de pH , en condiciones de microaeración con $D\text{-XIL}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$.

B.2 Efecto del nivel de aeración

En las siguientes series experimentales se llevó a cabo la fermentación con *H. polymorpha* utilizando como sustrato, en cada caso, D-arabinosa y D-xilosa, partiendo de una concentración inicial de 25 g dm^{-3} . Fijado el *pH* a 4,5 y 30°C de temperatura, se modificaron las condiciones de aeración:

- Microaeración: entrada de aire sólo por el vórtice de agitación.
- Sin aeración ó condiciones anaeróbicas: impidiendo dicha entrada por cierre del Erlenmeyer mediante un tapón de rosca.

En esta serie experimental se pretende observar el efecto del nivel de aeración en el proceso de fermentación de las pentosas utilizadas como sustrato. Toda esta serie experimental se ha realizado utilizando un agitador orbital tal como fue descrito en el apartado de Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.

Los procesos de fermentación llevados a cabo con D-arabinosa se realizaron por duplicado.

Los resultados experimentales obtenidos en cuanto a evolución del *pH*, generación de biomasa, consumo de sustrato, y formación de bioproductos durante el transcurso del proceso de fermentación se han indicado en las Tablas B.7 a B.12, y se han representado en las Figuras B.7 a B.12 los mismos parámetros excepto el *pH* y la concentración de etanol; cuando el sustrato es D-arabinosa se representa la concentración de arabitol que debe ser el bioproducto de mayor concentración, y cuando el sustrato es D-xilosa en las gráficas se muestra la concentración de xilitol.

En esta serie sobre el efecto de aeración se han realizado 6 experimentos cuya nomenclatura es FSn-M ó FSn-A, donde F simboliza fermentación, S sustrato y n es el número que representa la pentosa fermentada, siendo 1 y 3 los correspondientes a D-arabinosa y D-xilosa respectivamente. Las condiciones de aereación establecidas en el proceso de fermentación se han indicado como M, en caso de tratarse de microaeración, ó A cuando se trató de condiciones anaerobias. En caso de experimentos realizados como mínimo por duplicado, se ha finalizado con letras del alfabeto.

Tabla B.7
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS

Variación del pH , y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS1-Ma	$T = 30^{\circ}\text{C}$	$pH_0 = 4,5$	$D\text{-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$	microaeración			
t, h	pH	$x, \text{g dm}^{-3}$	$ART, \text{g dm}^{-3}$	$Ac, \text{g dm}^{-3}$	$E, \text{g dm}^{-3}$	$Xi, \text{g dm}^{-3}$	$Ar, \text{g dm}^{-3}$
0,0	4,5	0,102	24,750				0,000
44,8	5,8	0,800	17,832				0,035
166,0	6,9		14,469	0,029	0,000	0,140	0,209
308,3	4,3	1,786	12,162	0,351	0,000	0,014	0,007
452,8	4,0	3,334	6,972	0,487	0,000	0,019	0,016
526,0	4,3	3,356		0,408	0,000	0,020	
620,5	4,7		5,829	0,381	0,000	0,014	

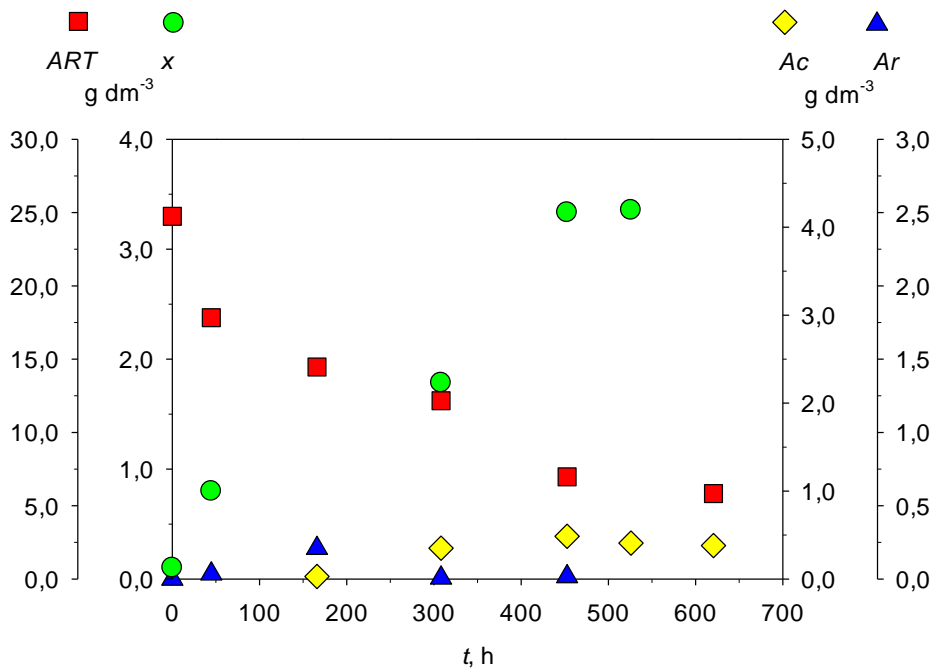


Figura B.7 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación FS1-Ma, con *H. polymorpha*, 30°C y 4,5 de pH , con $D\text{-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$ y en condiciones de microaeración.

Tabla B.8
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS

Variación del *pH*, y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS1-Mb	$T = 30^{\circ}\text{C}$	$\text{pH}_0 = 4,5$	$\text{D-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$	microaeración			
t, h	pH	$x, \text{g dm}^{-3}$	$\text{ART}, \text{g dm}^{-3}$	$\text{Ac}, \text{g dm}^{-3}$	$E, \text{g dm}^{-3}$	$Xl, \text{g dm}^{-3}$	$\text{Ar}, \text{g dm}^{-3}$
0,0	4,5	0,040	24,750		0,000		
24,0	4,8	0,482		0,011	0,000		
96,5	5,4	1,183	21,362	0,014	0,002		
114,5	6,0	1,368	21,281	0,004	0,006		
169,8	6,0	2,116	19,781	0,012	0,005		0,004
264,0	6,6	3,430		0,005	0,005	0,007	
287,8	6,4			0,032	0,000		0,011
338,5	5,5	4,193	9,990	0,019	0,001	0,007	0,185
432,0	6,6	4,215	12,510	0,005	0,000	0,008	0,252
504,0	6,0	6,667	1,779	0,016	0,001		0,106
528,0	5,9	5,334	2,856	0,017	0,000	0,007	0,184
600,0	6,0	5,162	1,556	0,016	0,020		
648,0	5,8	4,990	1,306	0,047	0,015	0,011	

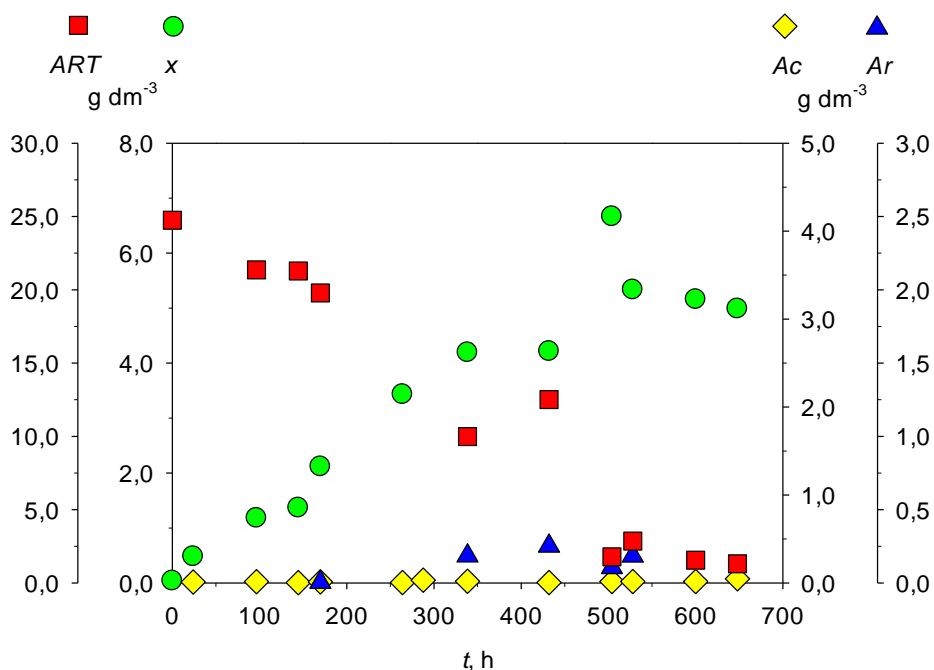


Figura B.8 Variación de la concentración de biomasa (*x*), azúcares reductores totales (*ART*), ácido acético (*Ac*) y arabitol (*Ar*) en el experimento de fermentación FS1-Mb, con *H. polymorpha*, 30°C y 4,5 de *pH*, con $\text{D-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$ y en condiciones de microaeración.

Tabla B.9
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS

Variación del pH , y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS1-Aa	$T = 30^{\circ}\text{C}$	$pH_0 = 4,5$	$D\text{-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$	anaerobia			
t, h	pH	$x, \text{g dm}^{-3}$	$ART, \text{g dm}^{-3}$	$Ac, \text{g dm}^{-3}$	$E, \text{g dm}^{-3}$	$Xi, \text{g dm}^{-3}$	$Ar, \text{g dm}^{-3}$
0,0	4,5	0,102	24,750				0,000
21,0	5,3	0,588					0,000
118,3	7,3	1,849	14,782	0,084	0,000	0,027	1,355
285,0	4,3			0,369	0,000	0,022	0,015
357,5	4,4	2,286	10,270	0,275	0,002	0,011	
500,8	4,1		7,554	0,523	0,000	0,019	
549,3	4,3	3,614	3,422				

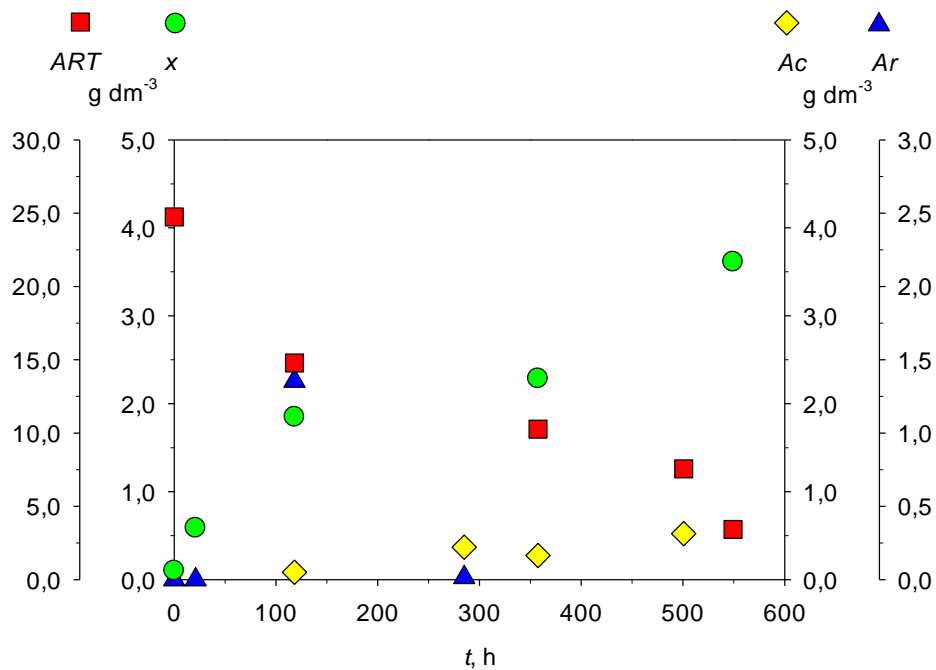


Figura B.9 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación FS1-Aa, con *H. polymorpha*, 30°C y 4,5 de pH , con $D\text{-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$ y en condiciones aeróbicas.

Tabla B.10
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
Variación del *pH*, y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS1-Ab	$T = 30^{\circ}\text{C}$	$\text{pH}_0 = 4,5$	$\text{D-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$	anaerobia			
t, h	pH	$x, \text{g dm}^{-3}$	$\text{ART}, \text{g dm}^{-3}$	$\text{Ac}, \text{g dm}^{-3}$	$E, \text{g dm}^{-3}$	$Xl, \text{g dm}^{-3}$	$\text{Ar}, \text{g dm}^{-3}$
0,0	4,5	0,040	24,750	0,000	0,000		0,000
24,0	4,8	0,467		0,000	0,000		
96,5	5,4	1,045	21,851	0,000	0,002		0,329
114,5	6,5	1,377	19,280	0,000	0,000		0,394
169,8	7,5		20,788	0,002	0,000		0,744
264,0	6,3	1,990	19,966	0,013	0,000	0,013	0,007
287,8	6,0	2,742	14,405	0,013	0,009		
338,5	5,7	2,989	13,624	0,019	0,000	0,012	0,006
432,0	5,6		9,016	0,015	0,026	0,045	
504,0	5,9		6,048	0,010	0,001		0,234
528,0	4,4	3,721	10,834	0,005	0,002	0,009	
600,0	6,0	5,377	0,837	0,006	0,000		
648,0	6,3	3,979	7,593	0,011	0,000	0,011	

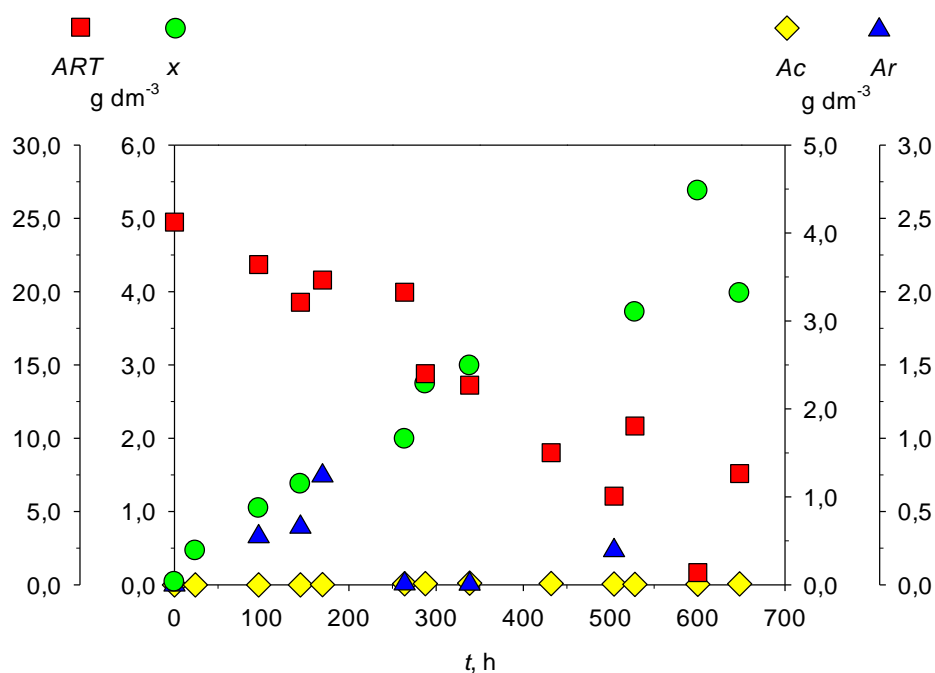


Figura B.10 Variación de la concentración de biomasa (*x*), azúcares reductores totales (*ART*), ácido acético (*Ac*) y arabitol (*Ar*) en el experimento de fermentación FS1-Ab, con *H. polymorpha*, 30°C y 4,5 de *pH*, con $\text{D-ARA}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$ y en condiciones aeróbicas.

Tabla B.11
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS

Variación del pH , y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS3-M	$T = 30^{\circ}\text{C}$	$pH_0 = 4,5$	$D\text{-XIL}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$	microaeración			
t, h	pH	$x, \text{g dm}^{-3}$	$ART, \text{g dm}^{-3}$	$Ac, \text{g dm}^{-3}$	$E, \text{g dm}^{-3}$	$Xi, \text{g dm}^{-3}$	$Ar, \text{g dm}^{-3}$
0,0	4,5	0,113	24,750			0,000	
44,8	4,9	0,740	22,014				0,000
166,0	4,6	3,441	7,139	0,194	0,248		0,000
308,3	5,0	5,033	3,420	0,274	0,177	2,591	
452,8	6,4	4,033	0,591	0,220	0,002	0,042	
526,0	6,5	4,544	0,626	0,138	0,007	0,077	
620,5	6,1	3,743	1,150	0,084	0,009	0,047	

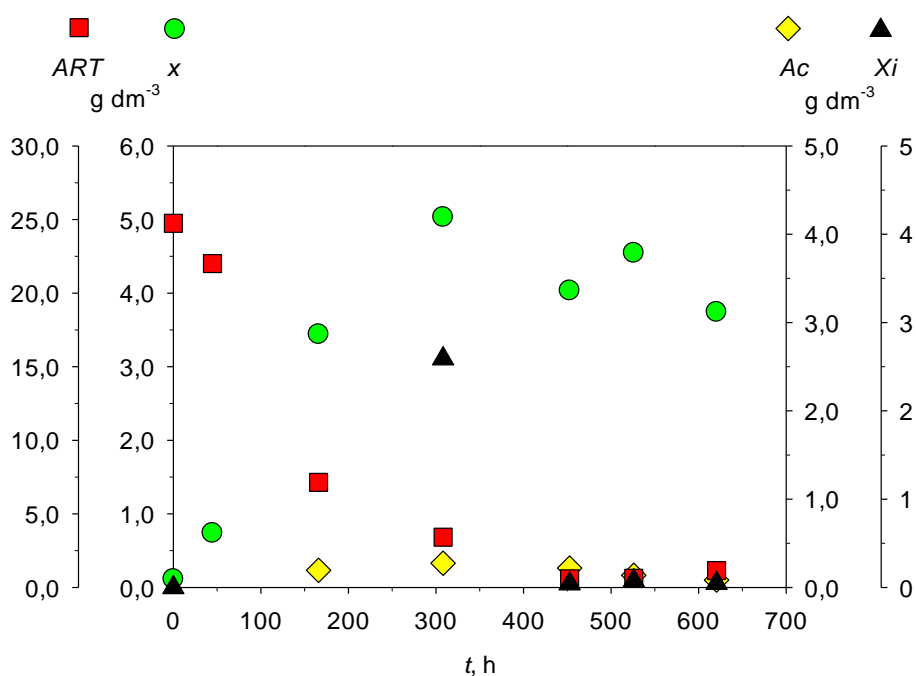


Figura B.11 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación FS3-M, con *H. polymorpha*, 30°C y 4,5 de pH , con $D\text{-XIL}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$ y en condiciones de microaeración.

Tabla B.12
 FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
 Variación del *pH*, y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS3-A	<i>T</i> = 30°C	<i>pH</i> ₀ = 4,5	D-XIL ₀ = 25 g dm ⁻³		anaerobia		
<i>t</i> , h	<i>pH</i>	<i>x</i> , g dm ⁻³	<i>ART</i> , g dm ⁻³	<i>Ac</i> , g dm ⁻³	<i>E</i> , g dm ⁻³	<i>Xi</i> , g dm ⁻³	<i>Ar</i> , g dm ⁻³
0,0	4,5	0,113	24,750			0,000	
21,0	4,6	0,441	21,515				
118,3	5,2	2,172	14,078	0,180	0,069	1,341	0,000
285,0	5,7		5,325	0,341	0,077	3,291	
357,5	6,5	4,033		0,084	0,007	1,644	0,000
500,8	6,2	3,711	0,591	0,261	0,002	0,056	
549,3	6,4	4,280	0,591				

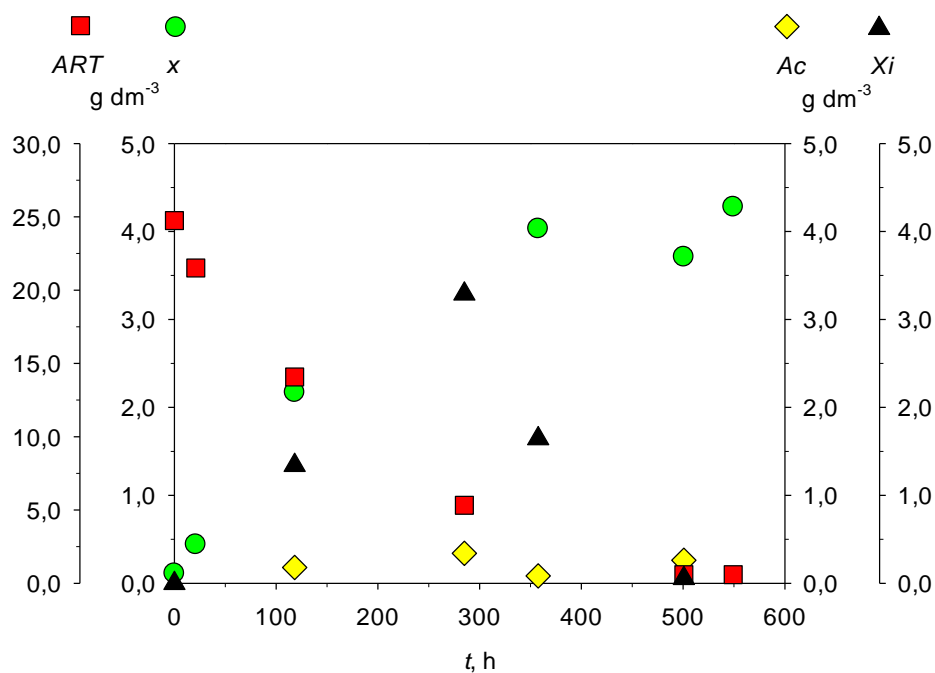


Figura B.12 Variación de la concentración de biomasa (*x*), azúcares reductores totales (*ART*), ácido acético (*Ac*) y arabitol (*Ar*) en el experimento de fermentación FS3-A, con *H. polymorpha*, 30°C y 4,5 de *pH*, con D-XIL₀ = 25 g dm⁻³ y en

B.3 Influencia del pH₀ del medio cultivo

Para cada una de las pentosas utilizadas como sustrato en cada caso, D-arabinosa y L-arabinosa, se llevó a cabo una serie experimental de fermentaciones con *H. polymorpha* a 35, 40 y 45°C, en condiciones de microaeración (entrada de aire sólo por el vórtice de agitación), modificando el *pH* inicial del medio de cultivo (3,5, 4,5 y 5,5) en cada una de dichas temperaturas.

La concentración inicial de pentosa en medio de cultivo de Lindegren *et al.* (1958) fue 25 g dm⁻³ en todos los casos. Los procesos de fermentación se han realizado utilizando un agitador orbital tal como fue descrito en el apartado de Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.

Los resultados experimentales obtenidos en cuanto a evolución del *pH*, generación de biomasa, consumo de sustrato, y formación de bioproductos durante el transcurso del proceso de fermentación se han indicado en las Tablas B.13 a B.28, y se han representado en las Figuras B.13 a B.28 los mismos parámetros excepto el *pH* y la concentración de etanol; debido a que el sustrato es D ó L-arabinosa se representa la concentración de arabitol que debe ser el bioproducto de mayor concentración.

Los procesos de fermentación llevados a cabo con D-arabinosa, *pH* 4,5 y 40°C, en condiciones de microaeración, ya fueron expuestos en el Anexo B.1 en el estudio de la influencia de la naturaleza del sustrato (Exptos. F-S1a, F-S1b y F-S1c, Tablas B.1 a B.3). De igual forma sucede con L-arabinosa como sustrato, bajo las mismas condiciones (Exptos. F-S2a y F-S2b, Tablas B.4 y B.5).

En esta serie experimental de efecto de aeración se han llevado a cabo 16 fermentaciones con *H. polymorpha* que junto con 5 de los experimentos de la serie de influencia de la naturaleza de sustrato (F-S1a, F-S1b, F-S1c, F-S2a y F-S2b), suman un total de 21. La nomenclatura de los realizados es FS_nT_{n'}-pH_{n''}, donde F simboliza fermentación, S sustrato y T temperatura. Por otro lado, n es el número que indica la pentosa fermentada, siendo 1 y 2 los correspondientes a D-arabinosa y L-arabinosa respectivamente; n' es un número que representa la temperatura a la que se ha realizado la fermentación (3, 4 y 5 equivalen a 35, 40 y 45°C, respectivamente); finalmente n'' es el número que representa el *pH* inicial del medio de cultivo (1, 2 y 3 equivalen a 3,5, 4,5 y 5,5, respectivamente). En caso de experimentos realizados como mínimo por duplicado, se ha finalizado con letras del alfabeto en serie (a, b, c, etc.).

Tabla B.13
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
Variación del *pH*, y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS1T3-pH1	microaeración	D-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³		T = 35°C		pH ₀ = 3,5	
<i>t</i> , h	<i>pH</i>	<i>x</i> , g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac, g dm ⁻³	E, g dm ⁻³	X _i , g dm ⁻³	Ar, g dm ⁻³
0,0	3,5	0,059	24,192				0,000
1,0	3,4	0,059					
2,0	3,4	0,059					
3,5	3,4	0,059					
5,0	3,4	0,070					
6,5	3,4	0,091		0,004	0,000	0,001	
19,0	3,5	0,372					
23,5	3,5	0,413		0,008	0,000	0,001	
30,5	3,5	0,467					
47,5	3,7	0,654	22,296				0,052
71,5	3,9	0,701	20,465	0,006	0,000	0,001	
148,0	4,4	1,187	19,5707	0,007	0,000	0,001	
167,5	3,9	3,079	14,800				
192,0	3,9	3,251	14,091	0,001	0,000	0,004	0,159
216,0	3,2	3,260	10,4010	0,007	0,285	0,075	
236,0	3,8	3,974	12,078	0,010	0,000	0,005	0,303

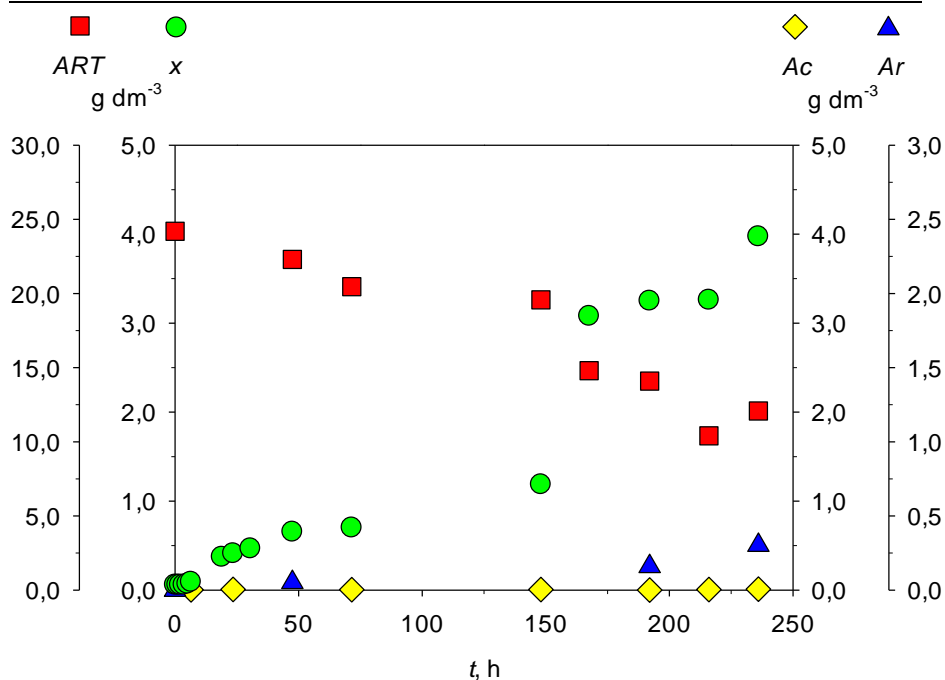


Figura B.13 Variación de *x*, ART, Ac y Ar en el experimento de fermentación FS1T3-pH1, con *H. polymorpha*, en condiciones de microaeración, D-ARA₀ = 25 g dm⁻³, a 35°C y 3,5 de *pH*.

Tabla B.14
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS

Variación del pH , y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS1T3-pH2	microaeración	D-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³	T = 35°C	pH ₀ = 4,5			
t , h	pH	x , g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac , g dm ⁻³	E , g dm ⁻³	Xi , g dm ⁻³	Ar , g dm ⁻³
0,0	4,5	0,089	24,750	0,003	0,005		
21,0	5,0	0,579		0,000	0,005		
45,5	5,3	0,660	23,623	0,011	0,006		
68,0	5,9	0,802	22,985	0,000	0,004		
140,5	6,0	1,200	20,592	0,000	0,002		0,004
188,5	5,5	2,451	13,574	0,000	0,008	0,013	
213,5	5,7	2,936	12,976	0,003	0,004	0,009	0,233
308,5	5,2		7,713	0,004	0,023		1,617
332,5	5,1	4,044	6,550	0,000	0,012	0,019	
380,5	4,5	3,495	3,944	0,006	0,006		2,248
476,0	4,4	3,420	1,938	0,003	0,008	0,012	0,354
500,0	5,1	3,441	1,701	0,003	0,006		0,345

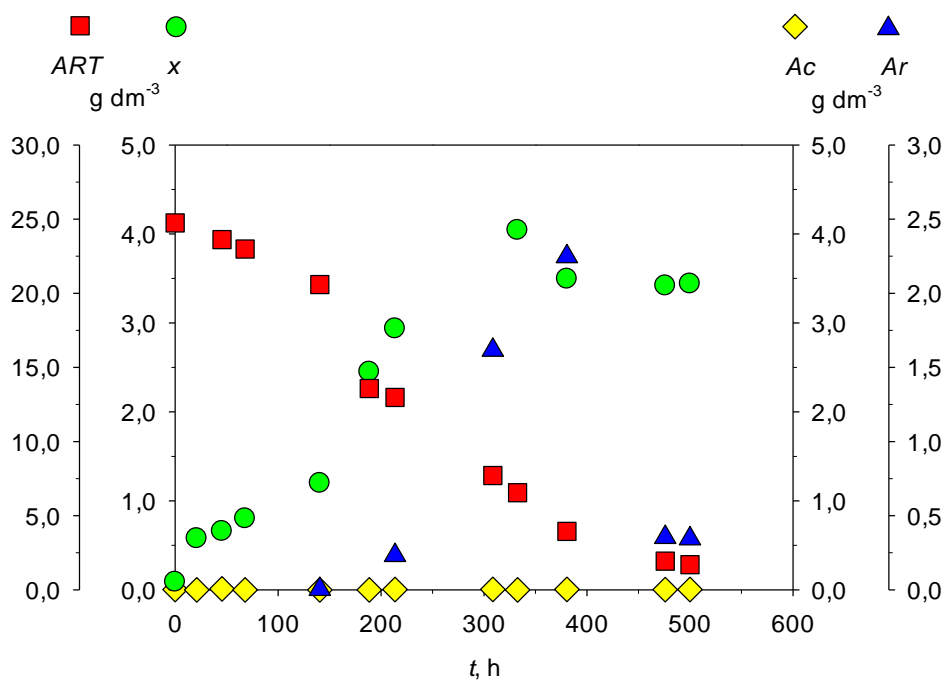


Figura B.14 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación FS1T3-pH2, con *H. polymorpha*, en condiciones de microaeración, D-ARA₀ = 25 g dm⁻³, a 35°C y 4,5 de pH .

Tabla B.15
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
Variación del *pH*, y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS1T3-pH3		microaeración	D-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³		T = 35°C	pH ₀ = 5,5	
<i>t</i> , h	<i>pH</i>	<i>x</i> , g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac, g dm ⁻³	<i>E</i> , g dm ⁻³	<i>Xi</i> , g dm ⁻³	<i>Ar</i> , g dm ⁻³
0,0	5,5	0,034	24,384				
1,0	5,5	0,034					
2,0	5,2	0,034					
3,0	5,3	0,034	21,815				
4,0	5,4	0,037					
19,8	5,7	0,396	20,473	0,000	0,000	0,006	
26,8	6,3	0,471	19,669				
43,3	7,1	0,798	18,365	0,036	0,000	0,014	0,000
66,3	7,5	0,878	18,442				0,007
144,8	6,9	1,463		0,009	0,000	0,104	0,147
160,0	7,2	1,239	16,219	0,014	0,000	0,050	0,155

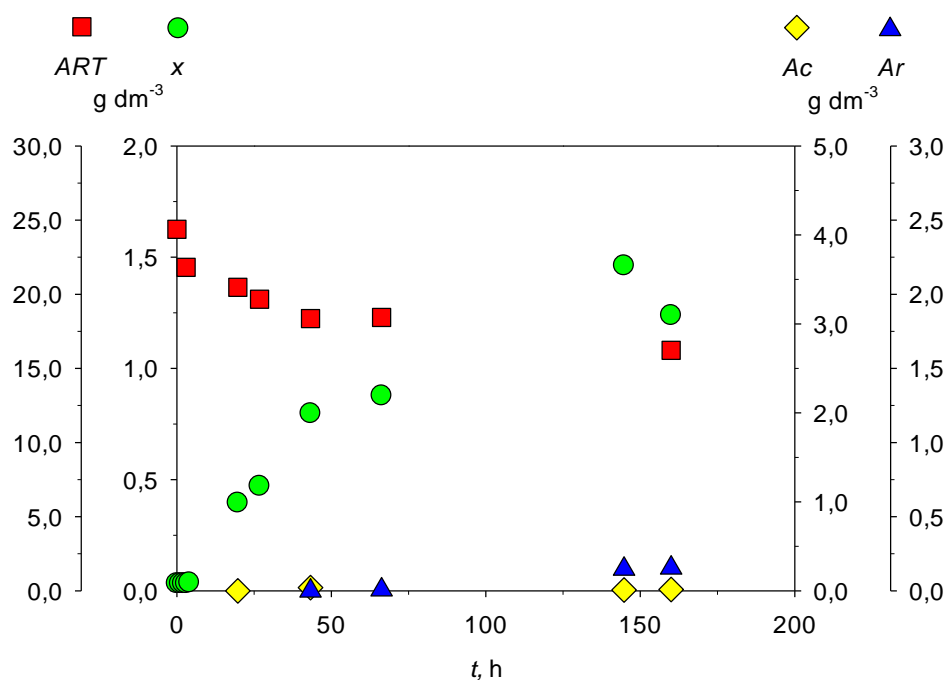


Figura B.15 Variación de la concentración de biomasa (*x*), azúcares reductores totales (*ART*), ácido acético (*Ac*) y arabitol (*Ar*) en el experimento de fermentación FS1T3-pH3, con *H. polymorpha*, en condiciones de microaeración, D-ARA₀ =

Tabla B.16
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS

Variación del pH , y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto.	FS2T3-pH1	microaeración	L-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³	T = 35°C	pH ₀ = 3,5		
t , h	pH	x , g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac, g dm ⁻³	E, g dm ⁻³	Xi, g dm ⁻³	Ar, g dm ⁻³
0,0	3,5	0,059	24,192				
1,0	3,4	0,059					
2,0	3,4	0,059					
3,5	3,4	0,059					
5,0	3,4	0,065					
6,5	3,4	0,076	24,056	0,010	0,000		
19,0	3,5	0,376	23,989				
23,5	3,6	0,531		0,000	0,043	0,001	
30,5	3,7	0,660					
47,5	4,1	1,080	21,764				0,042
71,5	4,6	1,720		0,008	0,000	0,002	0,049
148,0	5,0	1,996	19,674	0,008	0,000	0,012	0,758
167,5	5,0	2,314	19,405				0,143
192,0	4,9	2,314	19,202	0,003	0,000	0,009	0,043
216,0	5,5	3,028	17,854	0,010	0,000	0,010	
236,0	5,4	3,277	17,652	0,000	0,000	0,008	0,007

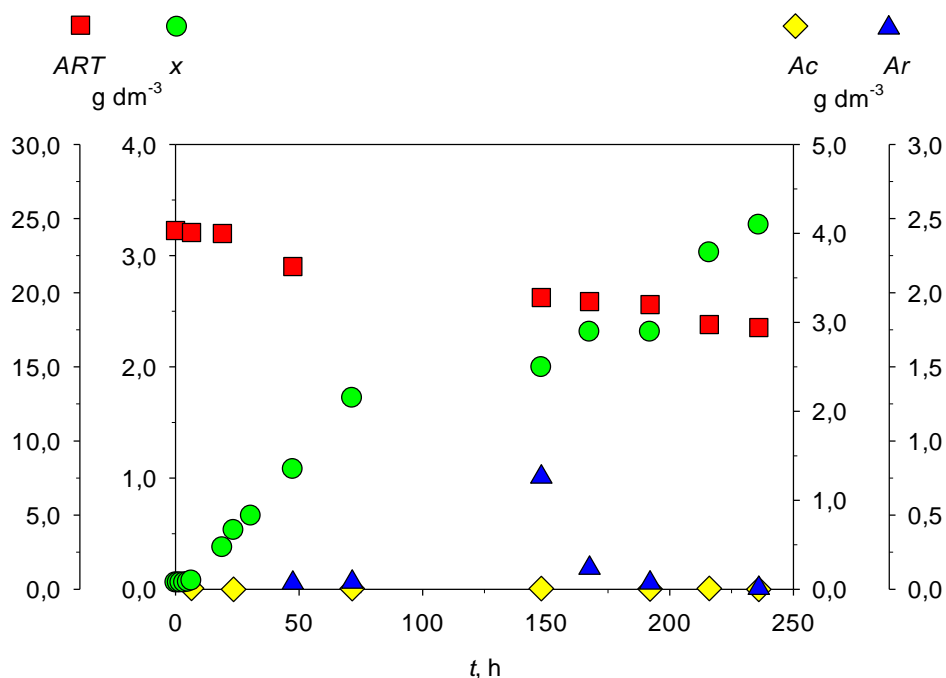


Figura B.16 Variación de x , ART, Ac y Ar en el experimento de fermentación FS2T3-pH1, con *H. polymorpha*, en condiciones de microaeración, L-ARA₀ = 25 g dm⁻³, a 35°C y 3,5 de pH .

Tabla B.17
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
 Variación del *pH*, y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto.	FS2T3-pH2	microaeración	L-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³	T = 35°C	pH ₀ = 4,5		
<i>t</i> , h	<i>pH</i>	<i>x</i> , g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac, g dm ⁻³	<i>E</i> , g dm ⁻³	X _i , g dm ⁻³	Ar, g dm ⁻³
0,0	4,5	0,135	24,750	0,021	0,014		0,000
21,0	5,4	0,886	22,793	0,000	0,005		
45,5	5,8	1,136	22,455	0,003	0,010	0,016	0,206
68,0	6,1	1,763	19,409	0,000	0,001	0,012	0,463
140,5	6,1	2,748	17,582	0,000	0,008	0,008	0,043

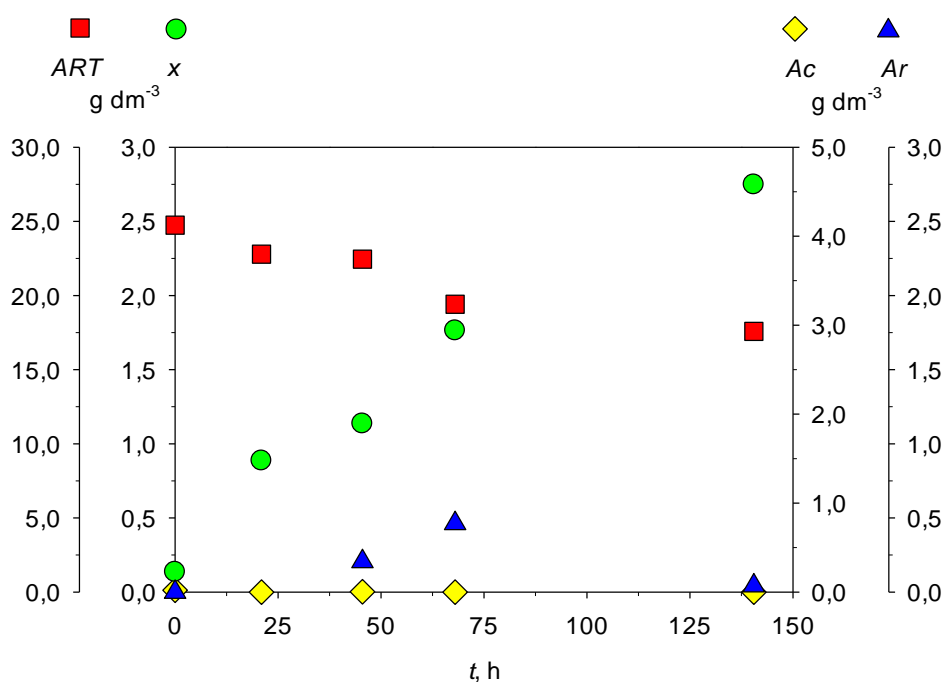


Figura B.17 Variación de la concentración de biomasa (*x*), azúcares reductores totales (*ART*), ácido acético (*Ac*) y arabitol (*Ar*) en el experimento de fermentación FS2T3-pH2, con *H. polymorpha*, en condiciones de microaeración, L-ARA₀ = 25 g dm⁻³, a 35°C y 4,5 de *pH*.

Tabla B.18
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS

Variación del pH , y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto.	FS2T3-pH3	microaeración	L-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³	T = 35°C	pH ₀ = 5,5		
t , h	pH	x , g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac, g dm ⁻³	E, g dm ⁻³	Xi, g dm ⁻³	Ar, g dm ⁻³
0,0	5,5	0,035	24,384				
1,0	5,2	0,035					
2,0	5,2	0,035					
3,0	5,2	0,036					
4,0	5,5	0,037					
19,8	5,9	0,310	22,531	0,000	0,000	0,010	
26,8	6,3	0,564					0,066
43,3	6,8		21,836	0,000	0,012	0,008	0,155
66,3	7,6	0,843					0,596
144,8	5,5	1,299	10,452	0,023	0,000	0,033	1,372
160,0	6,4	1,248	13,856	0,000	0,014	0,051	1,237

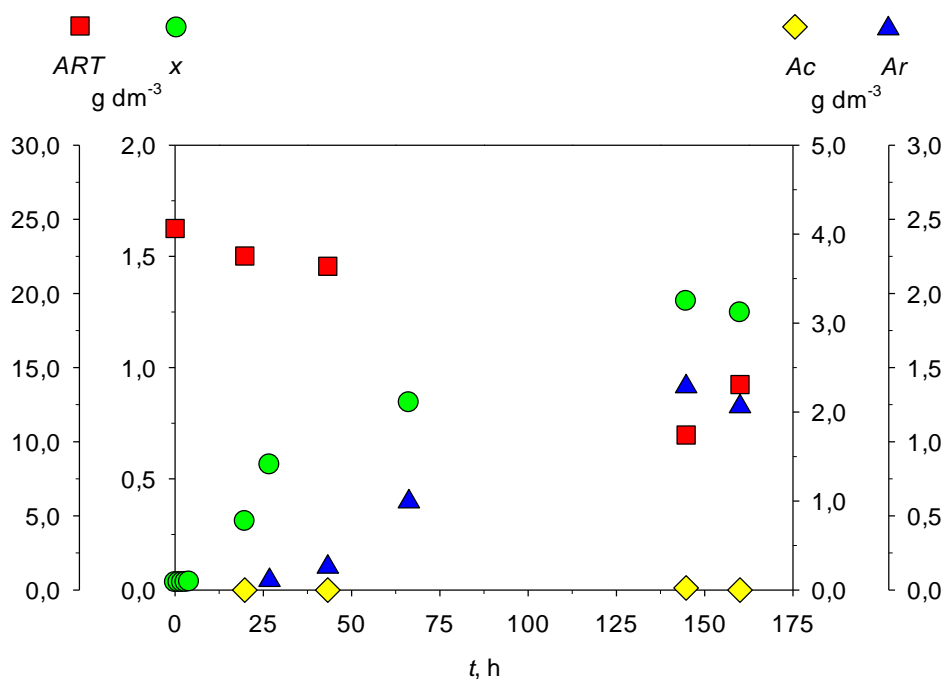


Figura B.18 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación FS2T3-pH3, con *H. polymorpha*, en condiciones de microaeración, L-ARA₀ = 25 g dm⁻³, a 35°C y 5,5 de pH .

Tabla B.19
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
Variación del *pH*, y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto.	FS1T4-pH1	microaeración	D-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³		T = 40°C	pH ₀ = 3,5	
<i>t</i> , h	<i>pH</i>	<i>x</i> , g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac, g dm ⁻³	<i>E</i> , g dm ⁻³	X _l , g dm ⁻³	Ar, g dm ⁻³
0,0	3,5	0,142	23,683				
1,0	3,6	0,157					
2,5	3,5	0,174					
4,0	3,4	0,200			0,000		
16,5	3,8	0,458		0,000	0,043	0,004	
28,0	4,0	0,572			0,000	0,006	
46,5	4,2	0,830	19,654			0,007	0,004
68,0	4,4	1,308	18,180	0,000	0,000	0,004	
137,0	4,5	2,538	11,955				0,021
153,0	4,3	3,215	6,765	0,000	0,000	0,002	
176,5	4,5	3,495	5,345	0,000	0,000	0,003	0,098

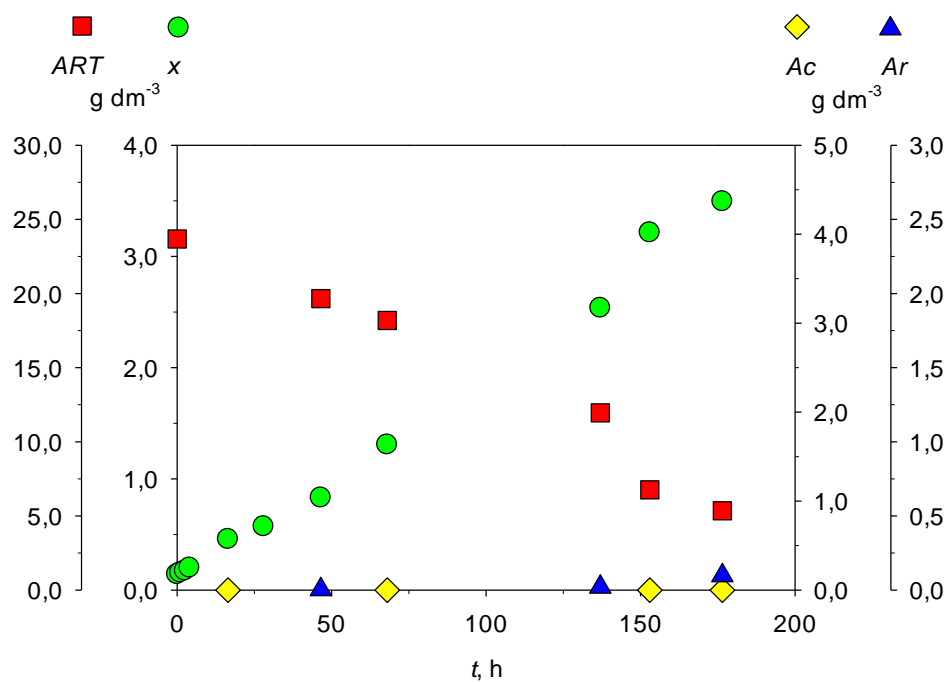


Figura B.19 Variación de la concentración de biomasa (*x*), azúcares reductores totales (*ART*), ácido acético (*Ac*) y arabitol (*Ar*) en el experimento de fermentación FS1T4-pH1, con *H. polymorpha*, en condiciones de microaeración, D-ARA₀ = 25 g dm⁻³, a 40°C y 3,5 de *pH*.

Tabla B.20
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS

Variación del pH , y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto.	FS1T4-pH3	microaeración	D-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³	T = 40°C	pH ₀ = 5,5		
t , h	pH	x , g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac, g dm ⁻³	E, g dm ⁻³	Xi, g dm ⁻³	Ar, g dm ⁻³
0,0	5,5	0,057	24,481				0,000
2,0	5,2	0,061					
4,0	5,0	0,082					
6,0	5,4	0,207	23,130				
20,0	6,2	0,450	22,424				
30,5	6,3	0,490	20,498	0,000	0,005	0,005	
47,0	6,3	0,942	17,673				0,182
69,0	6,4	1,093	18,531	0,000	0,002	0,005	0,610
93,0	6,3	1,454	15,875				0,223
168,0	6,2		12,922				
189,5	5,5	2,297		0,034	0,032	0,042	1,277
213,0	5,9		13,436	0,000	0,000	0,014	0,538
236,0	5,2	2,219	9,969	0,000	0,011	0,012	0,010

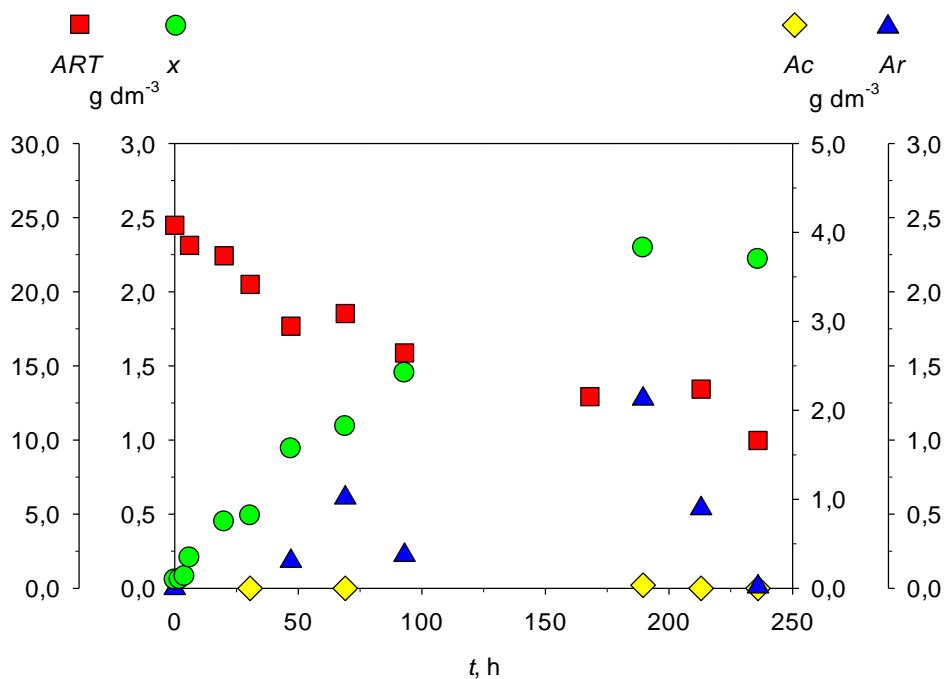


Figura B.20 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación FS1T4-pH3, con *H. polymorpha*, en condiciones de microaeración, D-ARA₀ = 25 g dm⁻³, a 40°C y 5,5 de pH .

Tabla B.21
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
Variación del *pH*, y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto.	FS2T4-pH1	microaeración	L-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³		T = 40°C	pH ₀ = 3,5	
<i>t</i> , h	<i>pH</i>	<i>x</i> , g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac, g dm ⁻³	<i>E</i> , g dm ⁻³	X _l , g dm ⁻³	Ar, g dm ⁻³
0,0	3,5	0,146	23,683				0,000
1,0	3,6	0,146					
2,5	3,5	0,168					
4,0	3,6	0,204			0,000		
16,5	3,9	0,662	21,583	0,000	0,045	0,012	
28,0	4,5	1,039	21,920		0,000	0,013	
46,5	4,7	1,406	18,213			0,015	0,710
68,0	4,6	2,323	13,046	0,000	0,000	0,086	0,922
137,0	4,9	3,022	12,765			0,024	1,536
153,0	4,8	4,043	6,868	0,000	0,000	0,056	0,989
176,5	4,9	3,925	7,654	0,000	0,000	0,051	0,797

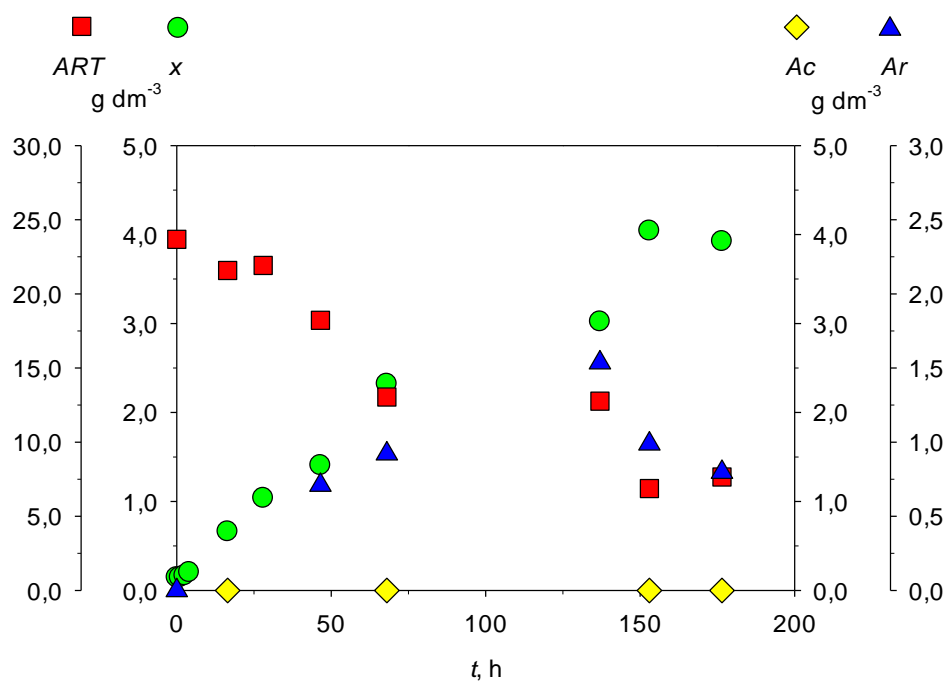


Figura B.21 Variación de la concentración de biomasa (*x*), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación FS2T4-pH1, con *H. polymorpha*, en condiciones de microaeración, L-ARA₀ = 25 g dm⁻³, a 40°C y 3,5 de *pH*.

Tabla B.22
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS

Variación del pH , y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS2T4-pH3	microaeración	L-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³	T = 40°C	pH ₀ = 5,5			
t , h	pH	x , g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac , g dm ⁻³	E , g dm ⁻³	Xi , g dm ⁻³	Ar , g dm ⁻³
0,0	5,5	0,059	24,481				0,000
2,0	5,0	0,067					
4,0	5,0	0,103					
6,0	5,6	0,241	24,077				0,087
20,0	5,9	0,658	21,912				0,184
30,5	6,7	0,856	21,777	0,014	0,011	0,007	0,360
47,0	6,3	1,067	20,086				0,164
69,0	6,5	1,548		0,000	0,001	0,001	0,069
168,0	6,0	2,839	12,579				
189,5	6,3	2,976	10,820	0,000	0,002	0,004	0,066
213,0	6,0		11,023	0,000	0,000	0,014	
236,0	6,0	3,190	8,926	0,000	0,001	0,000	0,093

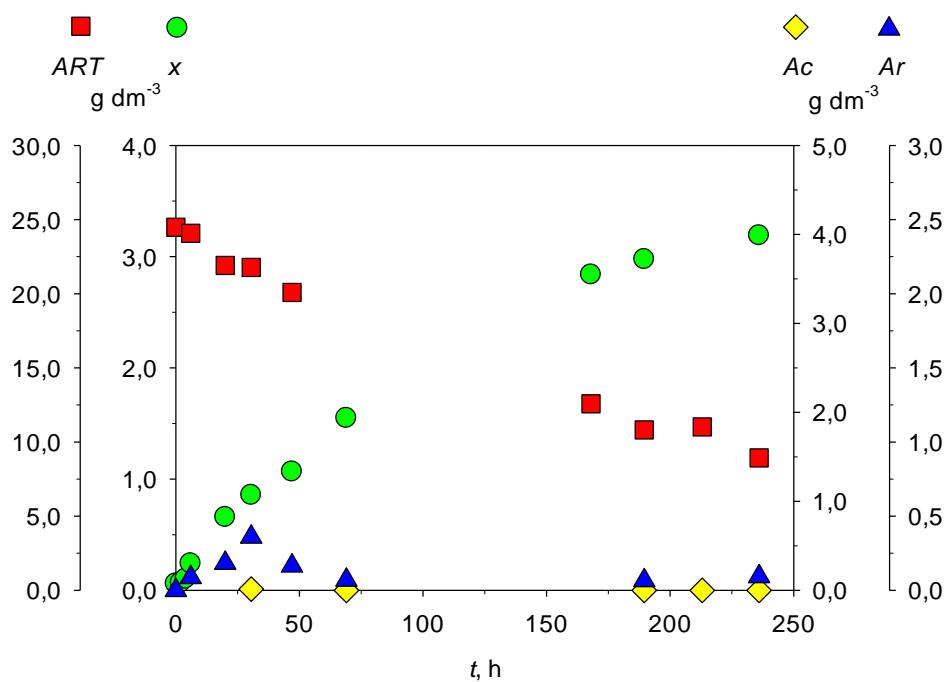


Figura B.22 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación FS2T4-pH3, con *H. polymorpha*, en condiciones de microaeración, L-ARA₀ = 25 g dm⁻³, a 40°C y 5,5 de pH .

Tabla B.23
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
Variación del *pH*, y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS1T5-pH1	microaeración	D-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³		T = 45°C		pH ₀ = 3,5	
<i>t</i> , h	<i>pH</i>	<i>x</i> , g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac, g dm ⁻³	E, g dm ⁻³	X _l , g dm ⁻³	Ar, g dm ⁻³
0,0	3,5	0,033	24,249				0,000
1,0	3,5	0,035					
2,0	3,4	0,038					
3,5	3,5	0,041					
5,0	3,5	0,060	22,495				
6,5	3,5	0,075	22,805	0,000	0,000	0,000	
20,5	3,6	0,342	20,895				
31,5	3,8	0,607	20,998	0,000	0,000	0,001	
46,5	3,8	0,817	21,256				
116,5	4,3	1,660	15,941				
140,5	4,4	1,686		0,000	0,000	0,016	0,204
167,5	4,5	1,695	16,560	0,000	0,000	0,004	0,180
190,5	4,7	1,514	16,199	0,000	0,000	0,004	0,602

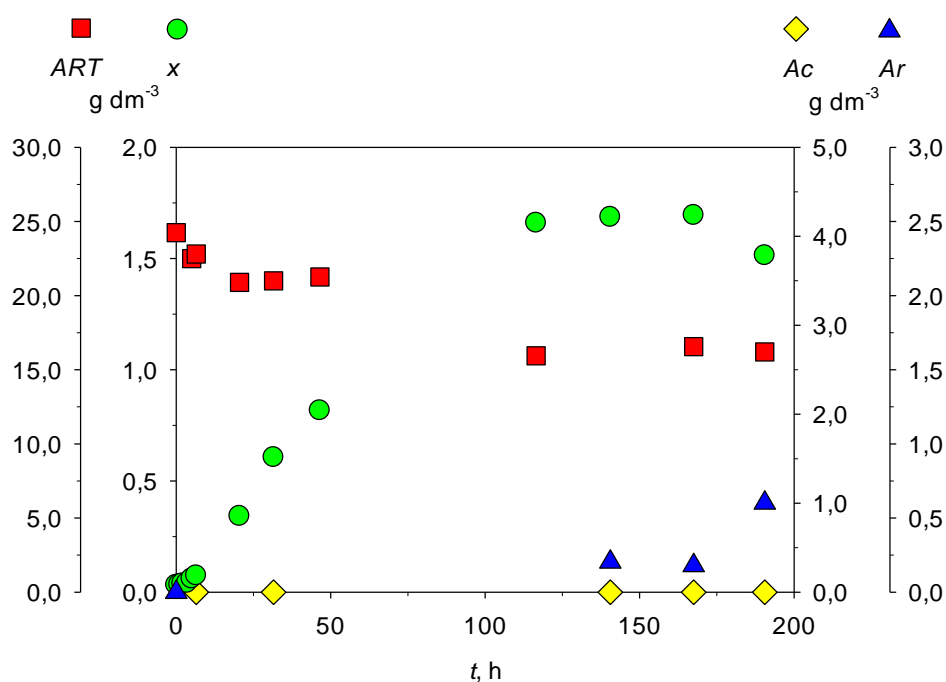


Figura B.23 Variación de la concentración de biomasa (*x*), azúcares reductores totales (*ART*), ácido acético (*Ac*) y arabitol (*Ar*) en el experimento de fermentación FS1T5-pH1, con *H. polymorpha*, en condiciones de microaeración, D-ARA₀ = 25 g dm⁻³, a 45°C y 3,5 de *pH*.

Tabla B.24
 FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
 Variación del pH , y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales,
 ácido acético, etanol, xilitol, arabitol y el índice de inhibición

Expto. FS1T5-pH2	microaeración	D-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³		T = 45°C		pH ₀ = 4,5		
t , h	pH	x , g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac, g dm ⁻³	l	E , g dm ⁻³	Xi , g dm ⁻³	Ar , g dm ⁻³
0,0	4,5	0,086	24,265	0,011	7,500	0,003		0,000
22,5	4,8	0,329		0,000	6,550	0,001		
46,5	5,5	0,435		0,000	8,000	0,001		
68,0	5,2	0,409	21,031	0,002	6,250	0,000		
139,5	5,5	1,002	16,914	0,000	8,750	0,011		
164,5	5,7			0,000	8,600	0,001	0,005	0,119
188,0	4,8	1,342	10,623	0,065	7,785	0,096		0,718
216,0	5,4	2,056	9,281	0,009	9,250	0,016	0,013	1,004

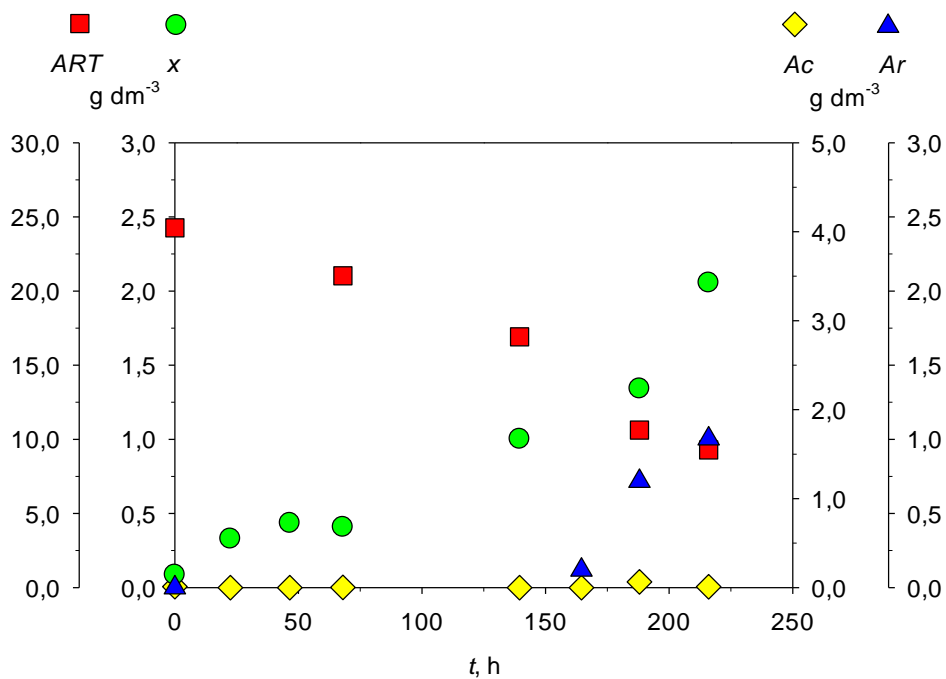


Figura B.24 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación FS1T5-pH2, con *H. polymorpha*, en condiciones de microaeración, D-ARA₀ = 25 g dm⁻³, a 45°C y 4,5 de pH .

Tabla B.25
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
Variación del *pH*, y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS1T5-pH3	microaeración	D-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³		T = 45°C		pH ₀ = 5,5	
<i>t</i> , h	<i>pH</i>	<i>x</i> , g dm ⁻³	ART _{<i>t</i>} , g dm ⁻³	Ac _{<i>t</i>} , g dm ⁻³	E _{<i>t</i>} , g dm ⁻³	X _{<i>t</i>} , g dm ⁻³	Ar _{<i>t</i>} , g dm ⁻³
0,0	5,5	0,054	24,3124				
2,0	5,5	0,069					
3,5	5,5	0,088					
5,0	5,6	0,192					
7,0	5,6	0,211					
19,0	6,0	0,428	22,262	0,002	0,000	0,000	
30,0	6,2	0,755	20,357				
44,0	6,2	0,860	20,547	0,001	0,003	0,004	
68,0	6,3	1,019					0,009
140,5	6,0	2,099	10,053				0,152
163,0	5,9	2,159	9,261	0,003	0,012	0,009	0,798
187,0	5,6			0,000	0,000	0,011	0,694
235,5	5,9	1,957	7,493	0,019	0,046	0,015	0,479

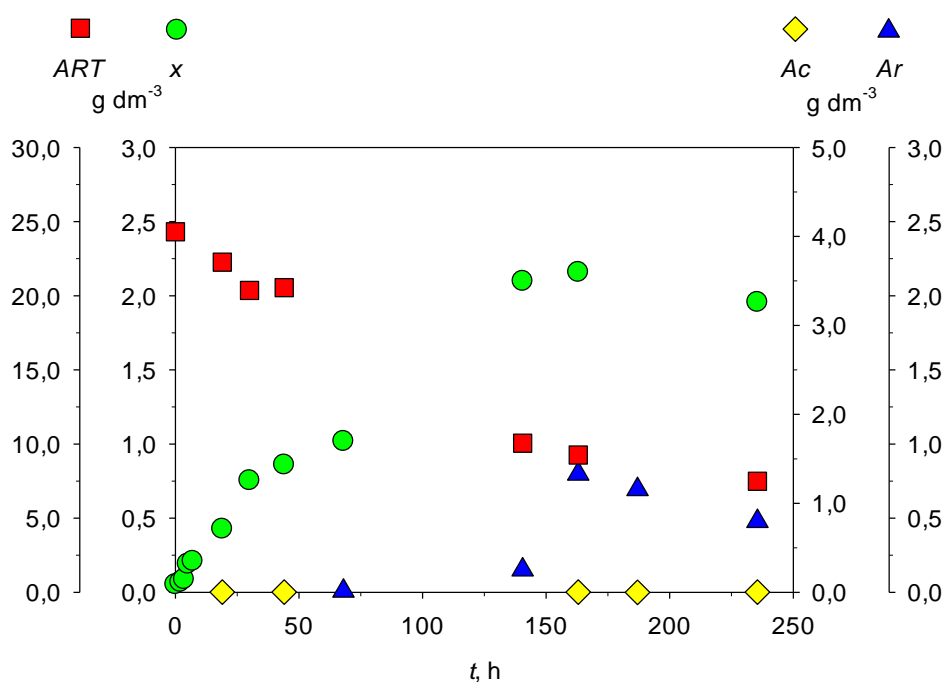


Figura B.25 Variación de la concentración de biomasa (*x*), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación FS1T5-pH3, con *H. polymorpha*, en condiciones de microaeración, D-ARA₀ = 25 g dm⁻³, a 45°C y 5,5 de *pH*.

Tabla B.26
 FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
 Variación del pH , y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS2T5-pH1 microaeración L-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³ T = 45°C pH ₀ = 3,5						
t , h	pH	x , g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac, g dm ⁻³	E, g dm ⁻³	Xi, g dm ⁻³
0,0	3,5	0,030	24,249			
1,0	3,5	0,032				
2,0	3,5	0,035	23,610			
3,5	3,5	0,044				
5,0	3,5	0,054				
6,5	3,5	0,066	22,567	0,000	0,000	0,004
20,5	3,8	0,598	21,654			
31,5	3,9	1,037		0,000	0,000	0,018
46,5	4,2	1,338	20,285			
116,5	4,7	2,718	10,834			
140,5	5,0	2,323	11,682	0,010	0,000	0,085
167,5	5,5	2,348	10,639	0,000	0,000	0,077
190,5	5,5	2,520	7,249	0,000	0,000	0,096

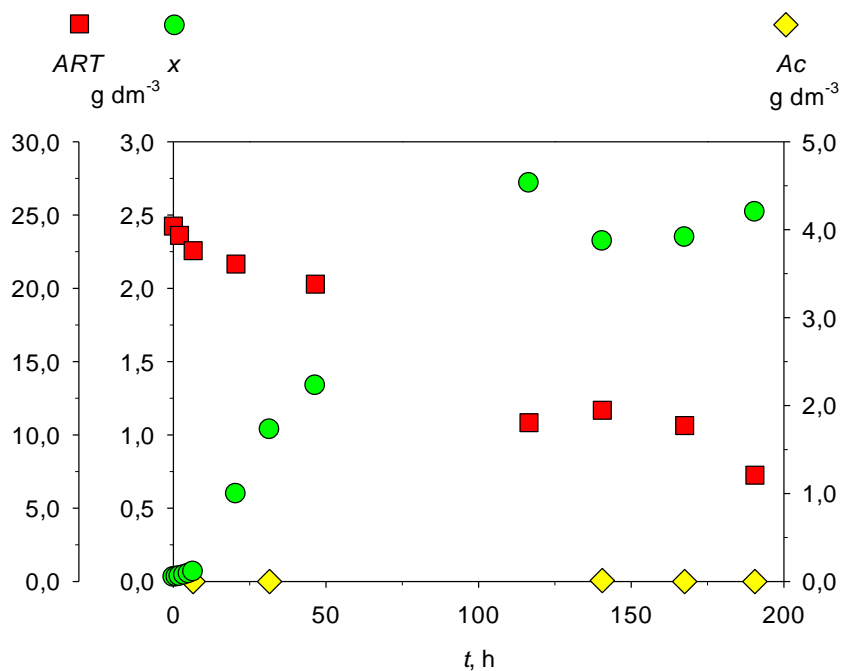


Figura B.26 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación FS2T5-pH1, con *H. polymorpha*, en condiciones de microaeración, L-ARA₀ = 25 g dm⁻³, a 45°C y 3,5 de pH .

Tabla B.27
 FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
 Variación del pH, y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol, arabitol y el índice de inhibición

Expto. FS2T5-pH2	microaeración	L-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³		T = 45°C		pH ₀ = 4,5		
t, h	pH	x, g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac, g dm ⁻³	l	E, g dm ⁻³	Xi, g dm ⁻³	Ar, g dm ⁻³
0,0	4,5	0,076	24,265	0,004	7,650	0,002		
22,5	4,8	0,372	23,745	0,004	7,850	0,001		
46,5	5,4	0,508		0,000	7,400	0,001		
68,0	5,3	0,602		0,000	7,850	0,000		
139,5	5,9	1,226	15,536	0,000	8,350	0,000		
164,5	6,2		13,394	0,000	8,400	0,000	0,011	0,075
188,0	5,9		12,680	0,004	7,650	0,000		0,079
216,0	6,2	2,606	12,125	0,001	9,500	0,000	0,013	0,156
240,0	6,2	2,443	10,301	0,000	9,350	0,011		
310,5	6,1	3,552	7,961	0,012	11,300	0,000	0,018	0,364

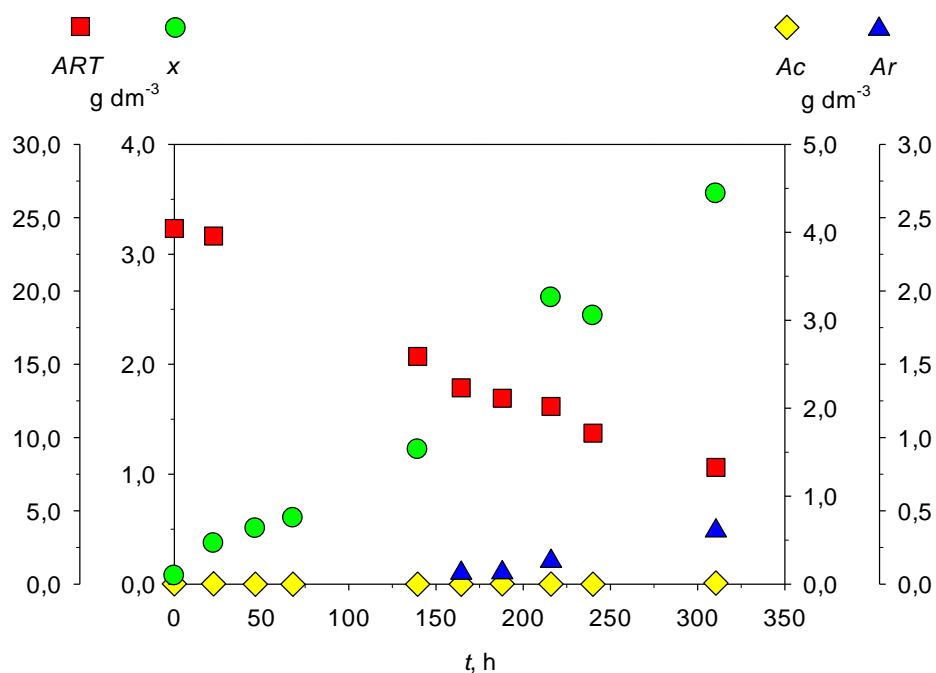


Figura B.27 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación FS2T5-pH2, con *H. polymorpha*, en condiciones de microaeración, L-ARA₀ = 25 g dm⁻³, a 45°C y 4,5 de pH.

Tabla B.28
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS

Variación del pH , y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS2T5-pH3	microaeración	L-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³	T = 45°C	pH ₀ = 5,5			
t , h	pH	x , g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac , g dm ⁻³	E , g dm ⁻³	Xi , g dm ⁻³	Ar , g dm ⁻³
0,0	5,5	0,051	24,312				
2,0	5,5	0,065					
3,5	5,5	0,085	23,501				
5,0	5,6	0,183					
7,0	5,6	0,220	23,146				
19,0	6,2	0,604	21,946	0,024	0,000	0,000	
30,0	6,3	0,890	20,297				0,089
44,0	6,3			0,001	0,018	0,002	
68,0	6,3	1,746					0,155
140,5	6,2	2,357					0,590
163,0	6,2	2,804	10,599	0,000	0,086	0,004	0,149
187,0	6,0	3,398	8,199	0,001	0,000	0,002	0,176
235,5	5,9	3,817	4,500	0,000	0,099	0,000	

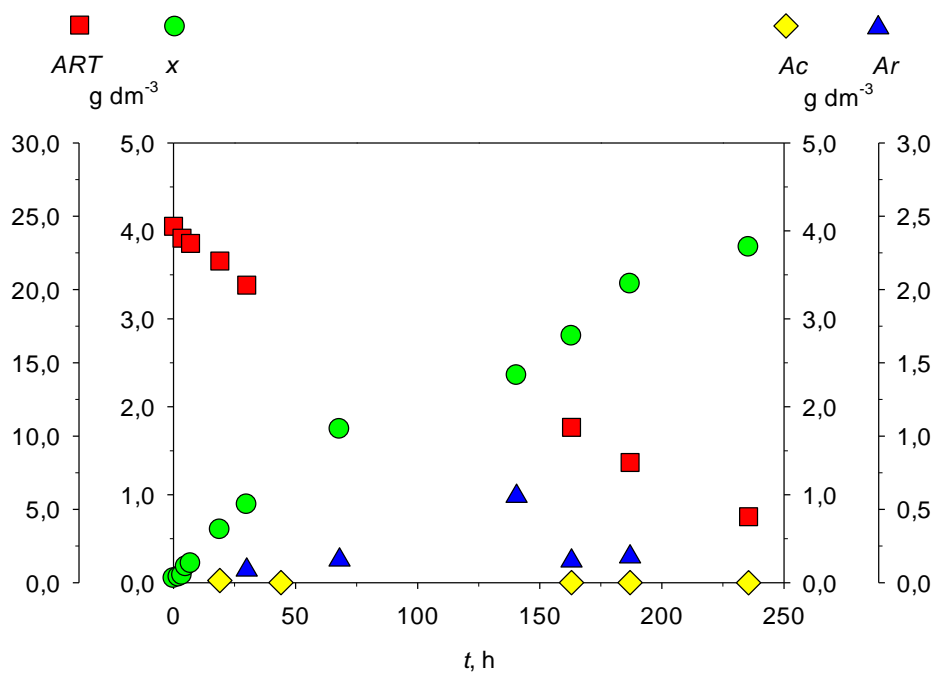


Figura B.28 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación FS2T5-pH3, con *H. polymorpha*, en condiciones de microaeración, L-ARA₀ = 25 g dm⁻³, a 45°C y 5,5 de pH .

B.4 Efecto de la temperatura

En este caso, para cada una de las pentosas utilizadas como sustrato (D-arabinosa, L-arabinosa y D-xilosa), se llevó a cabo una serie experimental de fermentaciones con *H. polymorpha* partiendo de una concentración inicial de sustrato de 25 g dm⁻³ en medio de cultivo de Lindegren *et al.* (1958), en condiciones de microaeración (entrada de aire sólo por el vórtice de agitación) y 4,5 de *pH*. En esta serie experimental, se modificó la temperatura dentro de un rango de 25 a 50°C con el fin de observar la influencia de esta variable en el proceso de fermentación de cada una de las pentosas utilizadas como sustrato. Toda esta serie experimental se ha realizado utilizando un agitador orbital tal como fue descrito en el apartado de Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.

Con D-arabinosa, las temperaturas estudiadas fueron 25, 30, 35, 40, 45 y 50°C. Con este sustrato, los procesos de fermentación llevados a cabo a 30, 40 y 50 °C se realizaron como mínimo por duplicado. Cuando el sustrato utilizado fue L-arabinosa, la fermentación se desarrolló a 35, 40, 45 y 50°C, efectuándose por duplicado el proceso de fermentación llevado a cabo a 40°C. Finalmente, el estudio de la influencia de la temperatura en la fermentación de la D-xilosa con *H. polymorpha* se realizó a 30, 40 y 50°C.

Los resultados experimentales obtenidos en cuanto a evolución del *pH*, generación de biomasa, consumo de sustrato, y formación de bioproductos durante el transcurso del proceso de fermentación se han indicado en las Tablas B.29 a B.33, y se han representado en las Figuras B.29 a B.33 los mismos parámetros excepto el *pH* y la concentración de etanol; cuando el sustrato es D o L-arabinosa se representa la concentración de arabitol que debe ser el bioproducto de mayor concentración, y cuando el sustrato es D-xilosa en las gráficas se muestra la concentración de xilitol.

Los procesos de fermentación llevados a cabo con D-arabinosa, en condiciones de microaeración, *pH* 4,5 y 40°C ya se mencionaron en el Anexo B.1 referido al estudio de la influencia de la naturaleza del sustrato (Tablas B.1 a B.3 junto con sus correspondientes Figuras B.1 a B.3, que muestran los resultados de los Exptos. F-S1a, F-S1b, F-S1c.). De igual forma sucede con L-arabinosa como sustrato, bajo las mismas condiciones (Tablas B.4 y B.5 así como Figuras B.4 y B.5, que muestran los Exptos. F-S2a y F-S2b) y D-xilosa (Tabla B.6 y Figura B.6 que muestra el Expto. F-S3).

Los resultados de los experimentos de fermentación de D-arabinosa con *H. polymorpha*, a 30°C y *pH* 4,5, en condiciones de microaeración, fueron expuestos en el Anexo B.2 dentro del estudio de la influencia de la aeración en el proceso de fermentación (Tablas B.7 y B.8,

Exptos. FS1-Ma y FS1-Mb,). Bajo las mismas condiciones de operación, se llevó a cabo la fermentación de D-xilosa con *H. polymorpha*, mostrándose los resultados en Anexo B.2 (Tabla B.11 y Figura B.11 que muestra los resultados del Expto. FS3-M)

Utilizando D-arabinosa como sustrato, *pH* 4,5 y condiciones de microaeración, se realizaron dos fermentaciones con *H. polymorpha* a diferente temperatura, 35 y 45°C. Ambos se muestran en el Anexo B.3 destinado al estudio de la influencia del *pH* del medio de cultivo en la fermentación con *H. polymorpha* (Tablas B.14 y B.24 así como Figuras B.14 y B.24, que representan los resultados de los Exptos. FS1T3-pH2 y FS1T5-pH2 respectivamente).

Los resultados de los experimentos de fermentación de L-arabinosa con *H. polymorpha* llevados a cabo a *pH* 4,5, en condiciones de microaeración, tanto a 35 como 45°C se muestran en el Anexo B.3 de estudio de la influencia del *pH* del medio de cultivo en el proceso de fermentación (Tablas B.17 y B.27 junto con sus Figuras B.17 y B.27, que muestra los Expto. FS2T3-pH2 y FS2T5-pH2, respectivamente).

En definitiva, en esta serie experimental de estudio del efecto de la temperatura se han llevado a cabo 5 fermentaciones con *H. polymorpha* que junto con los 6 experimentos del Anexo B.1 de influencia de la naturaleza de sustrato (Exptos. F-S1a, F-S1b, F-S1c, F-S2a, F-S2b y F-S3), 3 de los experimentos de la serie experimental del Anexo B.2 del efecto de la aeración (Exptos. FS1-Ma, FS1-Mb y FS3-M) y finalmente 4 del Anexo B.3 de la influencia del *pH* en el proceso de fermentación (Exptos. FS1T3-pH2, FS1T5-pH2, FS2T3-pH2 y FS2T5-pH2) suman un total de 18.

La nomenclatura de los realizados y no nombrados previamente es FSn-Tn', donde F simboliza fermentación, S sustrato y T temperatura. Por otro lado, n es el número que indica la pentosa fermentada, siendo 1, 2 y 3 los correspondientes a D-arabinosa, L-arabinosa y D-xilosa, respectivamente; n' es un número que representa la temperatura a la que se ha realizado la fermentación (1, 2, 3, 4, 5 y 6 equivalen a 25, 30, 35, 40, 45 y 50°C, respectivamente). En caso de experimentos realizados como mínimo por duplicado, se ha finalizado con letras del alfabeto en serie (a, b, c, etc.).

Tabla B.29
 FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
 Variación del pH, y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS1-T1	pH ₀ = 4,5	microaeración	D-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³		T = 25°C		
t, h	pH	x, g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac, g dm ⁻³	E, g dm ⁻³	Xi, g dm ⁻³	Ar, g dm ⁻³
0,0	4,5	0,043	24,750	0,000	0,002		
21,5	5,0	0,368		0,012	0,000		
45,5	5,4	0,729		0,008	0,000		
136,0	6,5	1,222	22,968	0,000	0,002		
189,5	6,6	1,153	22,110	0,000	0,000		0,000
214,5	6,8	1,557	19,460	0,000	0,000	0,021	0,030
309,5	6,4		18,758	0,003	0,002	0,011	
357,5	4,6	2,202	12,703	0,026	0,000		
405,0	5,5		16,943	0,000	0,006	0,013	0,079
503,5	4,1	3,720	8,938	0,000	0,000		
526,0	4,4	2,914	8,335	0,002	0,013	0,008	
573,0	4,2	3,538		0,000	0,007		0,158
647,0	4,8	6,086	6,001	0,011	0,000	0,006	0,416
815,0	4,3		2,539	0,006	0,010		0,044
836,0	4,2			0,000	0,002	0,007	

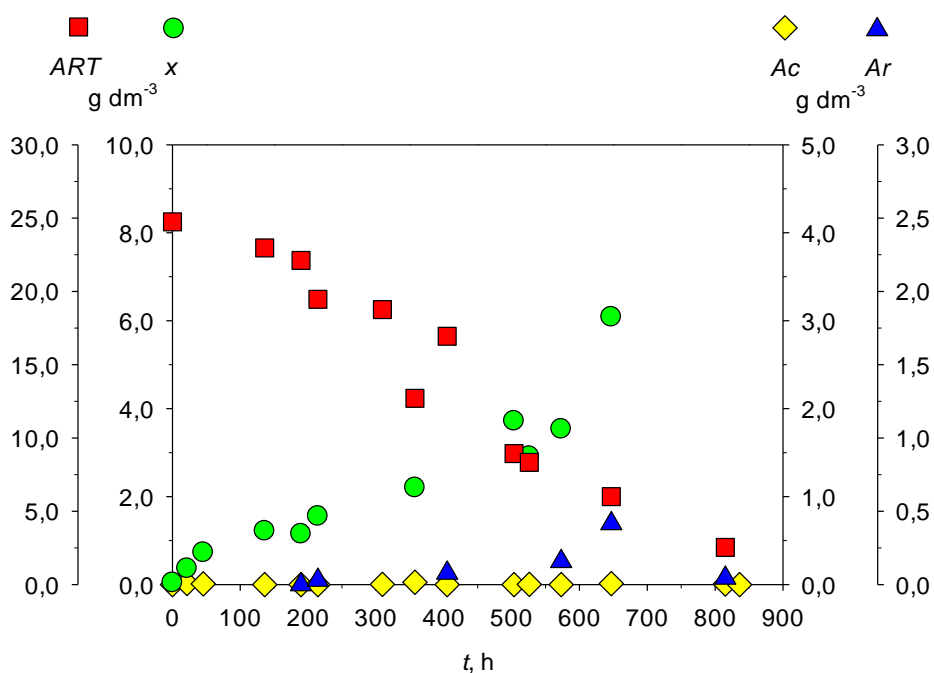


Figura B.29 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación FS1-T1, con *H. polymorpha*, 4,5 de pH y en condiciones de microaeración, D-ARA₀ = 25 g dm⁻³ y 25°C de temperatura.

Tabla B.30
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS

Variación del pH , y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS1-T6a	$pH_0 = 4,5$	microaeración	D-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³			T = 50°C	
t , h	pH	x , g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac, g dm ⁻³	E, g dm ⁻³	Xi, g dm ⁻³	Ar, g dm ⁻³
0,0	4,5	0,033	23,982				0,000
2,0	4,1	0,042					
3,0	4,1	0,049					
4,0	4,1	0,051					
5,0	4,1	0,059					
7,5	4,2	0,081		0,000	0,000	0,000	
27,0	4,3	0,196					0,156
52,0	4,4	0,204	21,295	0,000		0,000	0,183
67,5	4,5	0,207	21,099	0,000	0,000		0,211
92,0	4,2	0,310	19,923	0,000	0,001	0,000	0,463
167,5	4,3	0,770	17,492	0,137	0,085	0,000	0,126

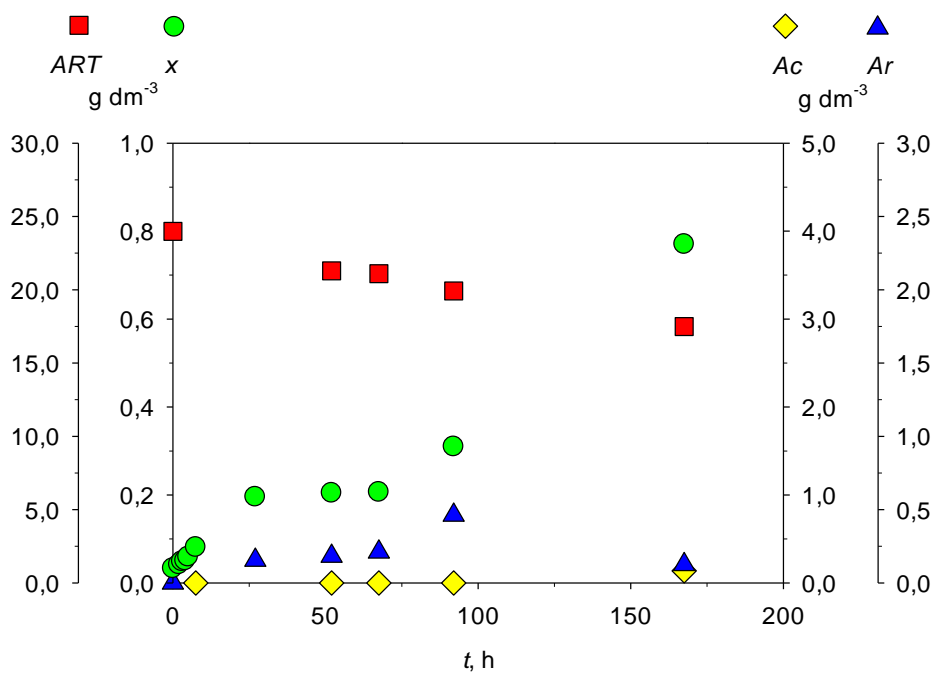


Figura B.30 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación FS1-T6a, con *H. polymorpha*, 4,5 de pH y en condiciones de microaeración, D-ARA₀ = 25 g dm⁻³ y 50°C de temperatura.

Tabla B.31
 FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
 Variación del *pH*, y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS1-T6b	$pH_0 = 4,5$	microaeración	$D-ARA_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$	$T = 50^\circ\text{C}$			
$t, \text{ h}$	pH	$x, \text{ g dm}^{-3}$	$ART, \text{ g dm}^{-3}$	$Ac, \text{ g dm}^{-3}$	$E, \text{ g dm}^{-3}$	$Xl, \text{ g dm}^{-3}$	$Ar, \text{ g dm}^{-3}$
0,0	4,5	0,048	24,352				
1,0	4,5	0,051					
2,5	4,5	0,058					
4,0	4,5	0,071					
6,0	4,6	0,127	23,785				
20,0	4,8	0,254	22,970	0,009	0,013	0,003	
30,0	5,5	0,542	22,766				
47,0	5,6	0,757	21,910				0,009
68,0	5,7	1,153	20,075	0,005	0,023	0,006	0,274
142,0	5,3	1,428					0,488
166,5	5,1	1,471		0,017	0,071	0,023	1,297
190,0	5,2		18,103	0,001	0,029	0,024	0,779
213,0	5,6	1,523	17,463	0,004	0,024	0,023	0,578

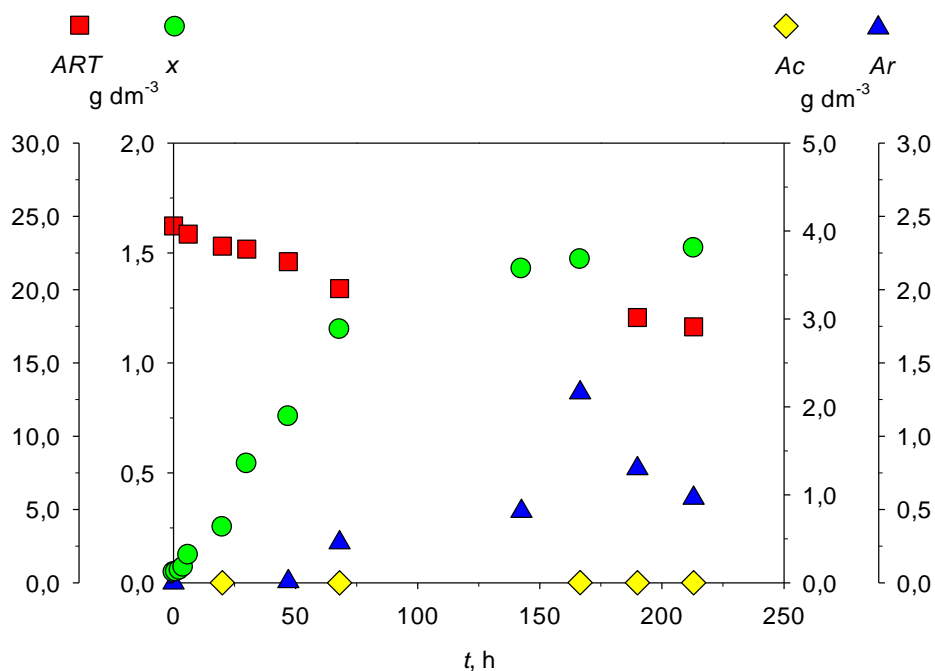


Figura B.31 Variación de la concentración de biomasa (*x*), azúcares reductores totales (*ART*), ácido acético (*Ac*) y arabitol (*Ar*) en el experimento de fermentación FS1-T6b, con *H. polymorpha*, 4,5 de *pH* y en condiciones de microaeración, $D-ARA_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$ y 50°C de temperatura.

Tabla B.32
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS

Variación del pH , y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS2-T6	$pH_0 = 4,5$	microaeración	L-ARA ₀ = 25 g dm ⁻³			$T = 50^\circ\text{C}$	
t , h	pH	x , g dm ⁻³	ART, g dm ⁻³	Ac, g dm ⁻³	E , g dm ⁻³	Xi , g dm ⁻³	Ar , g dm ⁻³
0,0	4,5	0,033	23,983				0,000
2,0	3,6	0,040					
3,0	4,1	0,042					
4,0	4,2	0,044					
5,0	4,2	0,051					
7,5	4,5	0,070		0,000	0,004	0,000	
27,0	4,7	0,284					0,200
52,0	4,2		19,475	0,008		0,000	0,122
67,5	4,5		18,913		0,002		
92,0	5,7	0,804	16,950	0,001	0,004	0,000	0,261
167,5	6,1	1,351	14,144	0,000	0,000	0,000	0,119

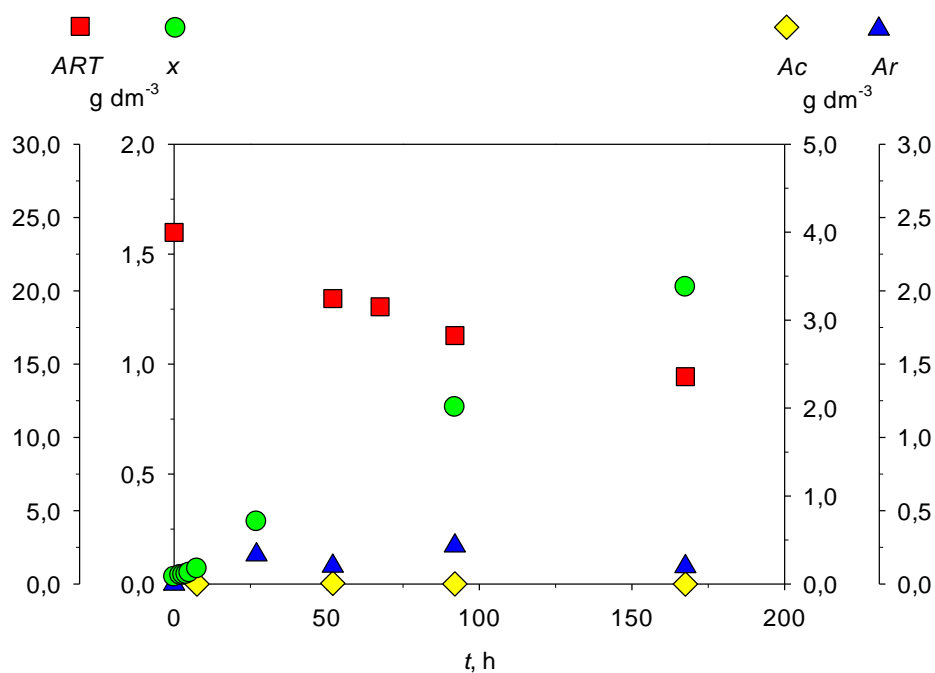


Figura B.32 Variación de la concentración de biomasa (x), azúcares reductores totales (ART), ácido acético (Ac) y arabitol (Ar) en el experimento de fermentación FS2-T6, con *H. polymorpha*, 4,5 de pH y en condiciones de microaeración, L-ARA₀ = 25 g dm⁻³ y 50°C de temperatura.

Tabla B.33
FERMENTACIÓN DE AZÚCARES SINTÉTICOS
Variación del *pH*, y de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FS3-T6 $pH_0 = 4,5$ microaeración $D\text{-XIL}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$ $T = 50^\circ\text{C}$

t , h	<i>pH</i>	x , g dm^{-3}	<i>ART</i> , g dm^{-3}	<i>Ac</i> , g dm^{-3}	<i>E</i> , g dm^{-3}	<i>Xi</i> , g dm^{-3}
0,0	4,5	0,049	24,475			0,000
1,0	4,5	0,053				
2,5	4,4	0,064				
4,0	4,5	0,083				
6,0	4,5	0,144				
20,0	4,6	0,325	22,448	0,008	0,024	0,315
30,0	4,6	0,342	22,114			
47,0	4,7	0,527	21,070			
68,0	4,7	0,757	18,897	0,0048	0,021	0,770
142,0	4,7	1,222	11,002			
166,5	4,4	1,144	8,454	0,115	0,225	1,341
190,0	4,2	1,514	4,527		0,177	1,621
213,0	4,7	1,918	3,691		0,172	1,376

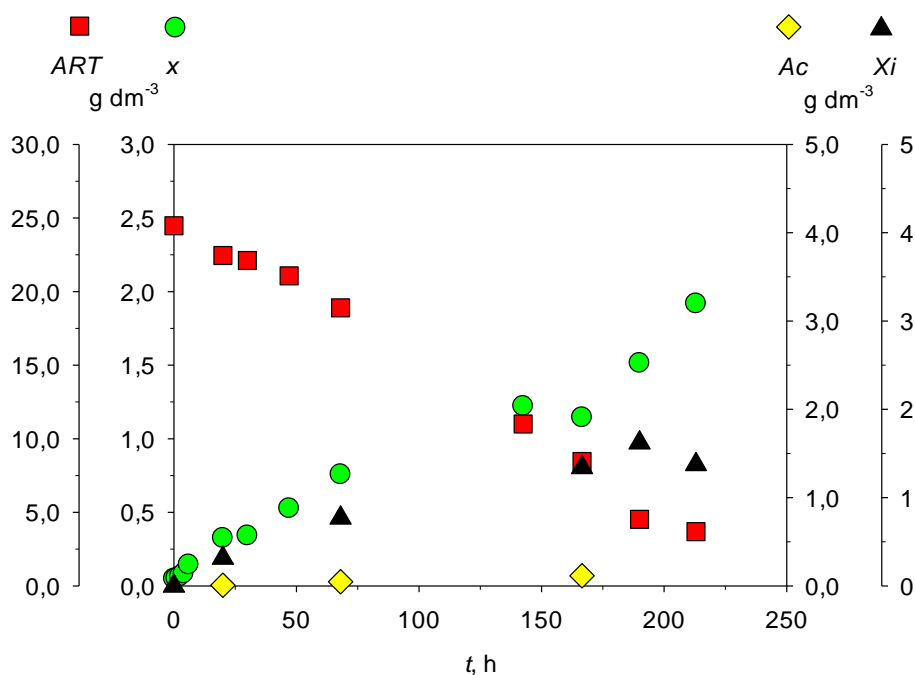


Figura B.33 Variación de la concentración de biomasa (*x*), azúcares reductores totales (*ART*), ácido acético (*Ac*) y xilitol (*Xi*) en el experimento de fermentación FS3-T6, con *H. polymorpha*, 4,5 de *pH* y en condiciones de microaeración, $D\text{-XIL}_0 = 25 \text{ g dm}^{-3}$ y 50°C de temperatura.

ANEXO C. FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADO PRETRATADO A PRESIÓN CON *Hansenula polymorpha*

Fijada la temperatura de operación (45°C) y el pH_0 (4,5), y manteniendo las condiciones de microaeración (entrada de aire sólo por el vórtice de agitación), se realizó un experimento de fermentación del hidrolizado líquido procedente del pretratamiento de hidrólisis a presión. La concentración inicial de inóculo en el reactor fue en torno a $0,27 \text{ g dm}^{-3}$.

Este ensayo se desarrolló en un biorreactor tipo tanque agitado, tal y como fue descrito en el apartado de Materiales y Métodos, apartado 3.7.3, sin la adición de la enzima celulasa [EC 3.2.1.4] y β -glucosidasa [EC 3.2.1.21], debido a que en este caso no se pretende sacarificación y fermentación simultánea, sino solo el proceso de fermentación del hidrolizado.

Los resultados experimentales obtenidos en cuanto a evolución del pH , generación de biomasa, consumo de azúcares totales, evolución de la concentración de monosacáridos fermentables, formación de bioproductos, así como evolución de la concentración de ácido acético e índice de inhibición durante el transcurso del proceso de fermentación, se han indicado en la Tablas C.1. A partir de estos datos experimentales, se ha llevado a cabo una representación gráfica de la formación de los bioproductos (Figura C.1) así como de los consumos de azúcares totales, D-glucosa, D-xilosa y arabinosa (Figura C.2).

La nomenclatura general de esta serie experimental es FHP-pHn, donde FHP simboliza fermentación con *H. polymorpha* de hidrolizado a presión, y n es el número que representa el pH inicial (1, 2 y 3 corresponde a 3,5, 4,5 y 5,5). De este modo, el único experimento desarrollado en esta serie ($pH_0 = 4,5$) se denomina FHP-pH2.

Tabla C.1

FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADO PRETRATADO A PRESIÓN CON *Hansenula polymorpha*
Variación del *pH*, y de las concentraciones de azúcares totales, etanol, xilitol y arabitol

Expto. FHP-pH2	$T = 45^{\circ}\text{C}$	$\text{pH}_0 = 4,5$	microaeración	$[I]_{B_0} = 0,27 \text{ g dm}^{-3}$		
t, h	pH	$x, \text{g dm}^{-3}$	$AT, \text{g dm}^{-3}$	$E, \text{g dm}^{-3}$	$Xi, \text{g dm}^{-3}$	$Ar, \text{g dm}^{-3}$
0,0	4,5	0,273	17,984		0,443	0,025
1,5	4,5	0,296				
3,5	4,5	0,318	17,984	0,086		0,065
5,0	4,5	0,336		0,108		
6,5	4,5	0,348				
19,0	4,5	0,553	17,984	0,094		0,069
30,5	4,4	0,652				
92,5	4,3			0,088		0,102
117,0	4,3	1,504	13,811	0,069		
142,0	4,4	1,621		0,056	0,386	
165,5	4,5	1,779				
189,0	4,5	1,788	12,928	0,112		0,168
261,0	4,4	1,886	14,891	0,000	0,246	0,089
309,5	4,4		15,446	0,000	0,201	0,102
338,0*	4,4	2,180	15,247	0,000		0,033
358,5	4,3	1,696	10,449	0,018		0,046
429,5	4,3	1,414	7,191	0,000		0,015
455,5	4,3	1,094	4,624	0,008	0,059	0,001
476,0	4,3	0,563				

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

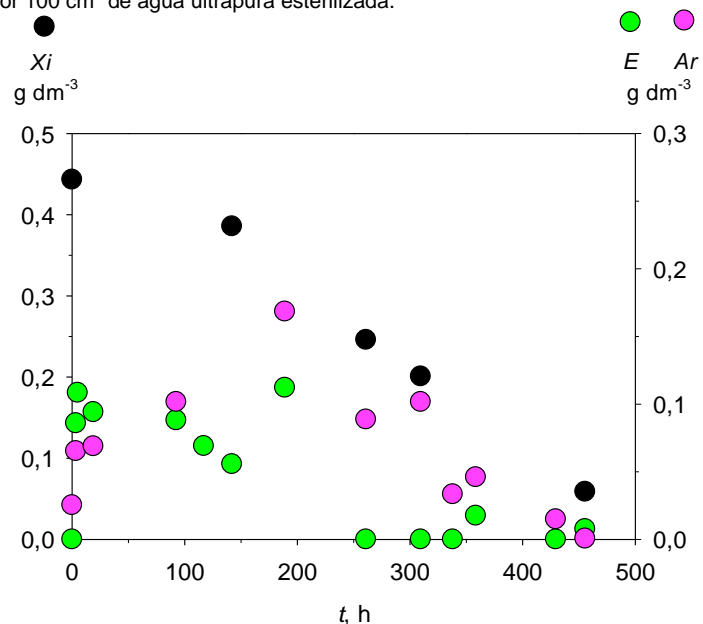


Figura C.1 Variación de Xi , E , y Ar con el tiempo en el experimento FHP-pH2, a 45°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, en condiciones microaeróbicas, y $[I]_{B_0} = 0,27 \text{ g dm}^{-3}$

Tabla C.1 (cont.)
Variación de la concentración de cada uno de los azúcares generados

t , h	<i>D-GLU</i> , g dm^{-3}	<i>D-XIL</i> , g dm^{-3}	<i>ARA</i> , g dm^{-3}	<i>D-GAL</i> , g dm^{-3}	<i>D-MAN</i> , g dm^{-3}	<i>D-FRU</i> , g dm^{-3}
0,0	8,835	6,197	1,663	0,678	0,564	0,047
3,5	8,835	6,197	1,663	0,678	0,564	0,047
19,0	8,835	6,197	1,663	0,678	0,564	0,047
92,5	6,797		1,071	0,443	0,498	0,061
117,0			0,970	0,400	0,448	0,045
189,0	5,911	4,686	1,267	0,531	0,424	0,110
261,0	6,992			0,578	0,483	0,000
309,5	6,809		1,186	0,540	0,313	0,087
338,0*	7,144		1,159	0,476	0,286	0,241
358,5	4,761	3,907	0,998	0,412	0,372	0,000
429,5	3,435	2,587	0,631	0,253	0,252	0,033
455,5	2,167		0,413	0,162	0,154	0,012

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

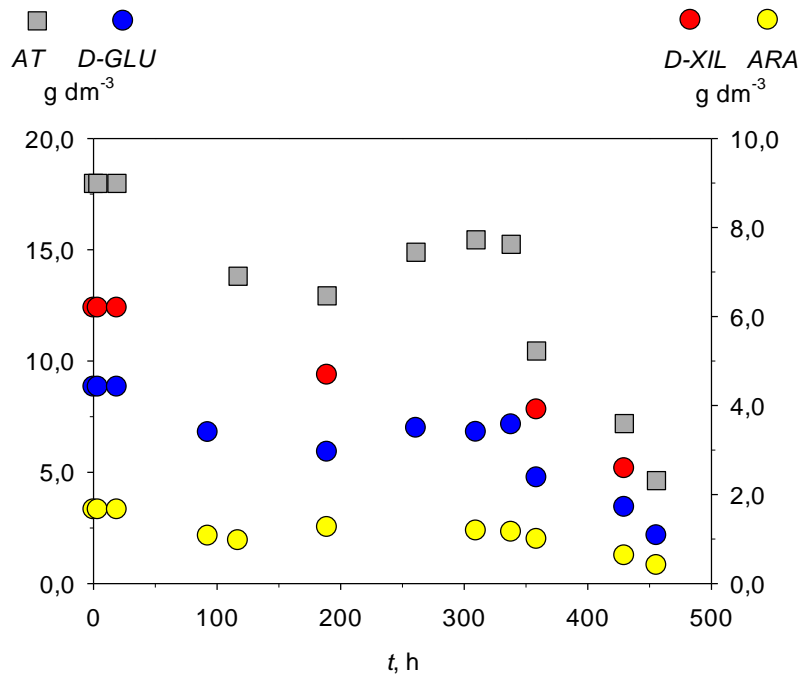


Figura C.2 Variación de *AT*, *D-GLU*, *D-XIL* y *ARA* con el tiempo en el experimento FHP-pH2, a 45°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de $0,27 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla C.1 (cont.)
Variación de la concentración de ácido acético

$t,$ h	$A_c,$ $g\ dm^{-3}$
3,5	1,842
19,0	1,805
92,5	1,636
309,5	1,014
338,0*	1,013
358,5	0,647
429,5	0,399
455,5	0,360

(*) Se añade al reactor 100 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

Tabla C.1 (cont.)
Variación del índice de inhibición

$t,$ h	I_i
6,5	209,20
30,5	212,73
189,0	159,30
358,5	81,92
429,5	69,04

ANEXO D. SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *Hansenula polymorpha***D.1 Influencia de la concentración del inóculo y del pH inicial**

En este caso, manteniéndose constante la temperatura del bioproceso (45°C) así como las condiciones microaeróbicas (entrada de aire sólo por el vórtice de agitación), se realizó una serie experimental donde el hidrolizado procedente del pretratamiento de hidrólisis ácida a presión (fase sólida y líquida) fue sometido a un proceso de sacarificación y fermentación simultánea con las enzimas celulasa [EC 3.2.1.4] y β -glucosidasa [EC 3.2.1.21], usando la levadura *H. polymorpha*. Estos experimentos de SFS fueron llevados a cabo bajo diferentes concentraciones iniciales de inóculo (rango de 0,11 – 0,36 g dm⁻³), modificándose el pH inicial (3,5, 4,5 y 5,5) en cada una de dichas concentraciones, con el fin de estudiar el efecto del contenido inicial de inóculo (no quiero repetir concentración_{ij}) así como el pH₀; en definitiva, establecer las condiciones de operación más adecuadas en este proceso SFS con las enzimas celulasa [EC 3.2.1.4] y β -glucosidasa [EC 3.2.1.21], usando la levadura *H. polymorpha*. Estos experimentos se realizaron en un biorreactor tipo tanque agitado, tal y como fue descrito en el apartado de Materiales y Métodos, apartado 3.7.2.

Los resultados experimentales obtenidos en cuanto a evolución del *pH*, concentración celular por contaje celular (sólo en los Exptos. SFS3-pH1, SFS3-pH2a, SFS3-pH3, SFS4-pH1, SFS4-pH2 y SFS4-pH3), consumo de azúcares totales, evolución de la concentración de monosacáridos fermentables, formación de bioproductos, así como evolución de la concentración de ácido acético e índice de inhibición durante el transcurso del proceso de fermentación, se han indicado en las Tablas D.1 a D.13. A partir de estos datos experimentales, se ha llevado a cabo una representación gráfica de la formación de los bioproductos así como de los consumos de azúcares totales, D-glucosa, D-xilosa y arabinosa, Figuras D.1 a D.26.

En esta serie se han llevado a cabo 13 experimentos SFS con *H. polymorpha*. La nomenclatura de los realizados es SFS_n-pH_{n'}, donde SFS simboliza sacarificación y fermentación simultánea, n es el número que indica la concentración inicial de inóculo, siendo 1, 2, 3 y 4 los correspondientes a 0,11, 0,13, 0,15 y 0,36 g dm⁻³; finalmente n' es el número que representa el pH inicial (1, 2 y 3 equivalen a 3,5, 4,5 y 5,5, respectivamente). En caso de experimentos realizados como mínimo por duplicado, se ha finalizado con letras del alfabeto en serie (a, b, c, etc.).

Tabla D.1
SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *Hansenula polymorpha*
Variación del *pH*, y de las concentraciones de azúcares totales, etanol, xilitol y arabitol

Expto. SFS1-pH1	$T = 45^{\circ}\text{C}$	$\text{pH}_0 = 3,5$	microaeración	$[I]_{\text{Bo}} = 0,11 \text{ g dm}^{-3}$	
t, h	pH	$AT, \text{g dm}^{-3}$	$E, \text{g dm}^{-3}$	$Ar, \text{g dm}^{-3}$	
0,0	3,5	15,737		0,018	
18,5	3,9	35,174		0,048	
42,5		29,089			
114,0	3,7	30,337		0,158	
163,0*	3,7				
164,0	3,7	10,279	0,000	3,465	0,024
184,0		17,724	0,000	3,463	0,017
210,0		28,228	0,000	3,672	0,039
281,5		27,247	0,000		0,031
305,0		27,694	0,000		0,121
352,5		13,882	0,000	4,718	0,000

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

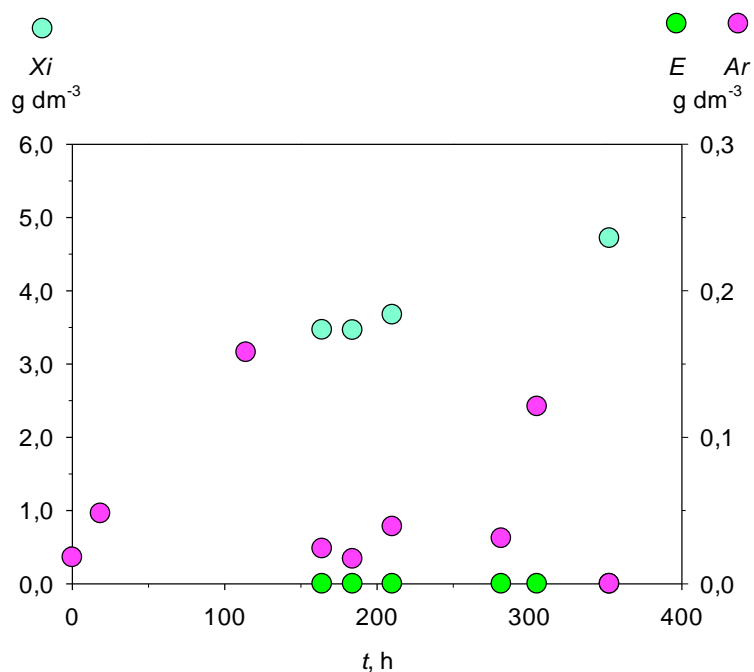


Figura D.1 Variación de X_i , E , y Ar con el tiempo en el experimento SFS1-pH1, a 45°C y $\text{pH}_0 = 3,5$, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de $0,11 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla D.1 (cont.)
Variación de la concentración de cada uno de los azúcares generados

t , h	<i>D-GLU</i> , g dm ⁻³	<i>D-XIL</i> , g dm ⁻³	<i>ARA</i> , g dm ⁻³	<i>D-FRU</i> , g dm ⁻³	<i>D-GAL</i> , g dm ⁻³	<i>D-MAN</i> , g dm ⁻³
0,0	8,330	4,418	1,313	0,660	0,575	0,442
18,5	24,273	6,895	1,718	1,090	0,731	0,468
42,5	20,090	5,501	1,465	0,900	0,602	0,532
114,0	20,088	6,822	1,286	0,835	0,716	0,591
164,0	5,984	2,499	0,733	0,241	0,384	0,438
184,0	11,621	3,652	1,042	0,460	0,463	0,488
210,0	18,582	5,843	1,102	1,300	0,578	0,824
281,5	17,913	5,477	1,317	1,186	0,551	0,802
305,0	18,312	5,753	1,462	0,934	0,594	0,638
352,5	8,931	2,914	0,935	0,304	0,387	0,411

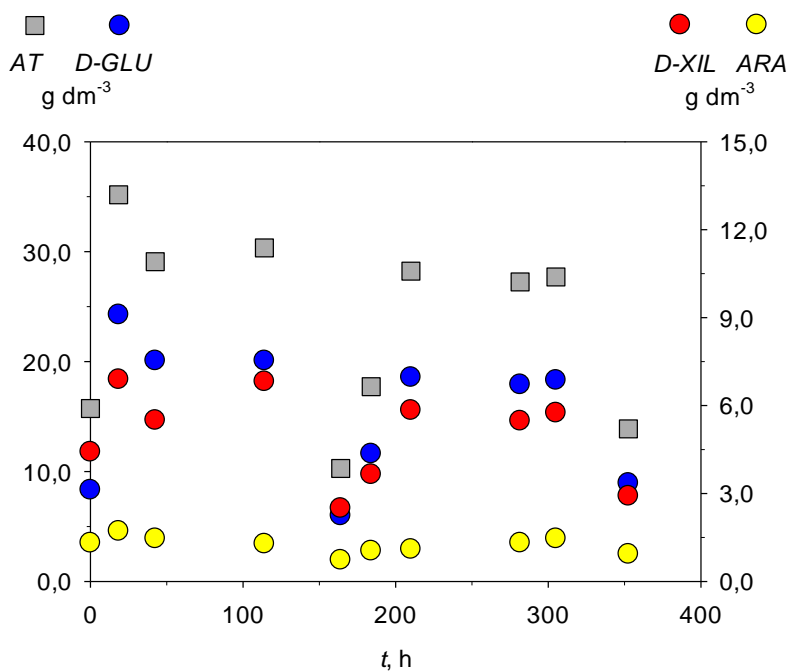


Figura D.2 Variación de *AT*, *D-GLU*, *D-XIL* y *ARA* con el tiempo en el experimento SFS1-pH1, a 45°C y pH₀ = 3,5, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de 0,11 g dm⁻³.

Tabla D.1 (cont.)
Variación de la concentración de ácido acético

t , h	A_c , g dm^{-3}
1,5	$0,002 \pm 0,001$
18,5	$0,084 \pm 0,015$
114,0	$0,052 \pm 0,010$
210,0	$0,987 \pm 0,003$
352,5	$1,002 \pm 0,011$

Tabla D.1 (cont.)
Variación del índice de inhibición

t , h	I
0,0	237,200
18,5	240,796
114,0	227,341
210,0	171,503
352,5	163,826

Tabla D.2
SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *Hansenula polymorpha*
Variación del pH, y de las concentraciones de azúcares totales, etanol, xilitol y arabitol

Expto. SFS2-pH1	$T = 45^{\circ}\text{C}$	$\text{pH}_0 = 3,5$	microaeración	$[\text{I}]_{\text{Bo}} = 0,13 \text{ g dm}^{-3}$	
t, h	pH	$AT, \text{g dm}^{-3}$	$E, \text{g dm}^{-3}$	$Xi, \text{g dm}^{-3}$	$Ar, \text{g dm}^{-3}$
0,0	3,5	4,389	0,000	4,781	0,000
19,3	3,7				
34,3		16,746			0,023
103,8	3,6	17,520			0,037
153,3*			0,000	4,623	
154,3	3,6				
321,8		14,153			0,004
351,8	3,5				
367,8		15,149	0,000	4,298	0,015

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

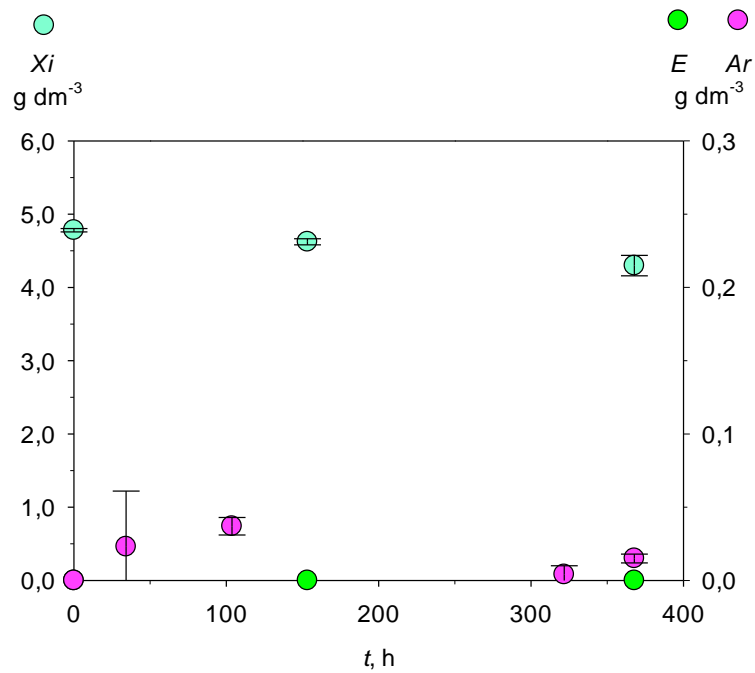


Figura D.3 Variación de Xi , E y Ar con el tiempo en el experimento SFS2-pH1, a 45°C y $\text{pH}_0 = 3,5$, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de $0,13 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla D.2 (cont.)
Variación de la concentración de cada uno de los azúcares generados

t , h	<i>D</i> -GLU, g dm ⁻³	<i>D</i> -XIL, g dm ⁻³	ARA, g dm ⁻³	<i>D</i> -FRU, g dm ⁻³	<i>D</i> -GAL, g dm ⁻³	<i>D</i> -MAN, g dm ⁻³
0,0	2,17	1,208	0,594	0,000	0,285	0,133
34,3	10,563	3,621	0,983	0,701	0,457	0,422
103,8	11,267	3,852	0,893	0,731	0,381	0,395
321,8	9,070	3,053	0,727	0,571	0,383	0,350
367,8	9,710	3,166	0,895	0,605	0,382	0,391

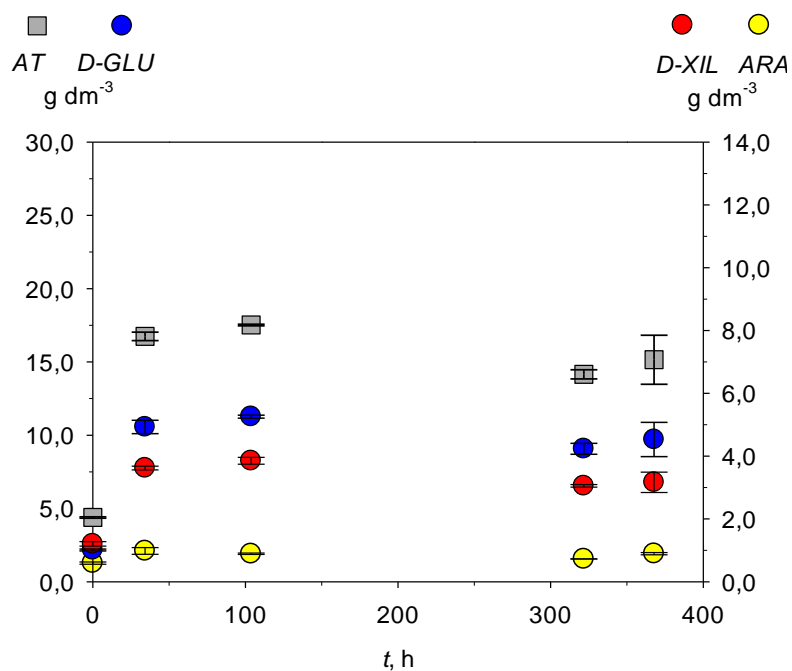


Figura D.4 Variación de AT, *D*-GLU, *D*-XIL y ARA con el tiempo en el experimento SFS2-pH1, a 45°C y pH₀ = 3,5, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de 0,13 g dm⁻³.

Tabla D.2 (cont.)
Variación de la concentración de ácido

t , h	A_c , g dm^{-3}
0,0	$2,452 \pm 0,010$
6,0	$2,125 \pm 0,090$
153,3*	$1,488 \pm 0,010$
321,8	$1,400 \pm 0,010$
367,8	$1,394 \pm 0,152$

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

Tabla D.2 (cont.)
Variación del índice de inhibición

t , h	I
1,5	165,43
19,3	168,81
153,3*	150,79
154,3	142,04
351,8	115,06

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

Tabla D.3
SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *Hansenula polymorpha*
Variación del pH, y de las concentraciones de azúcares totales, etanol, xilitol y arabitol

Expto. SFS3-pH1 T = 45°C pH₀ = 3,5 microaeración [I]_{B0} = 0,15 g dm⁻³

t, h	pH	N 10 ⁹ , células dm ⁻³	AT, g dm ⁻³	E, g dm ⁻³	Xi, g dm ⁻³	Ar, g dm ⁻³
0,0	3,5	9,375	8,079		5,609	0,003
3,0					5,351	
4,5		16,190				
18,0	3,9			0,000	5,617	
24,5	3,9	30,615				
41,5		52,788		0,000		
88,8	3,7	65,040	8,269		5,447	0,000
159,3*		76,963	13,292	0,010	5,693	0,033
162,5	3,6					
213,5		57,238	15,537			0,057
237,5		51,995		0,028	4,685	
261,5	3,4	44,471				
329,8		32,085	18,072		5,191	0,095
352,0		44,515				
400,3**	3,2	32,374		0,023		
495,3	3,3	26,992	9,196	0,000	4,051	0,000
520,5		25,086				
548,5		16,687				
598,5			7,563	0,000	3,971	0,000

Se añade al reactor (*) 100 cm³ y (**) 128 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

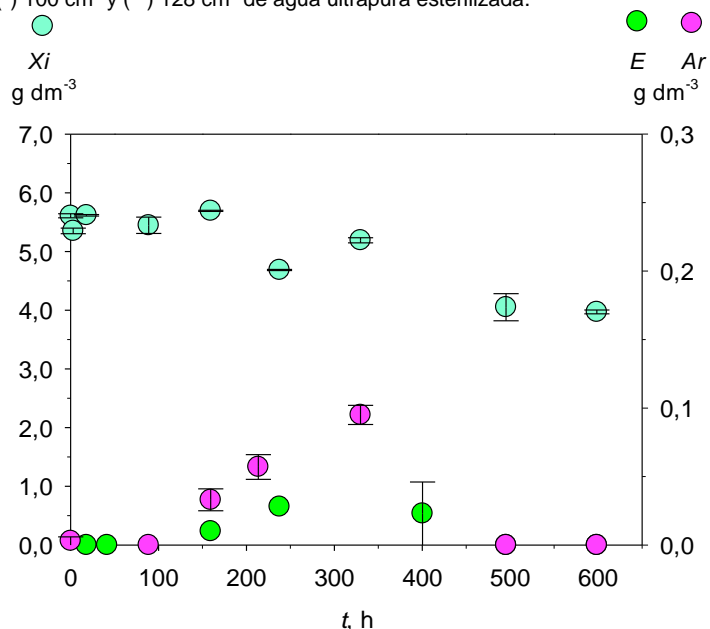


Figura D.5 Variación de Xi, E y Ar con el tiempo en SFS3-pH1, a 45°C y pH₀ = 3,5, en condiciones de microaeración, y [I]_{B0} = 0,15 g dm⁻³.

Tabla D.3 (cont.)
Variación de la concentración de cada uno de los azúcares generados

t , h	<i>D-GLU</i> , g dm^{-3}	<i>D-XIL</i> , g dm^{-3}	<i>ARA</i> , g dm^{-3}	<i>D-FRU</i> , g dm^{-3}	<i>D-GAL</i> , g dm^{-3}	<i>D-MAN</i> , g dm^{-3}
0,0	3,859	2,302	0,737	0,472	0,372	0,339
88,8	5,105	1,588	0,609	0,336	0,313	0,318
159,3*	8,425	2,600	0,804	0,692	0,398	0,372
213,5	9,873	3,184	0,832	0,746	0,429	0,473
329,8	11,694	3,465	0,990	1,020	0,421	0,483
495,3	6,061	1,757	0,499	0,366	0,260	0,253
598,5	5,544	0,754	0,493	0,297	0,222	0,253

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

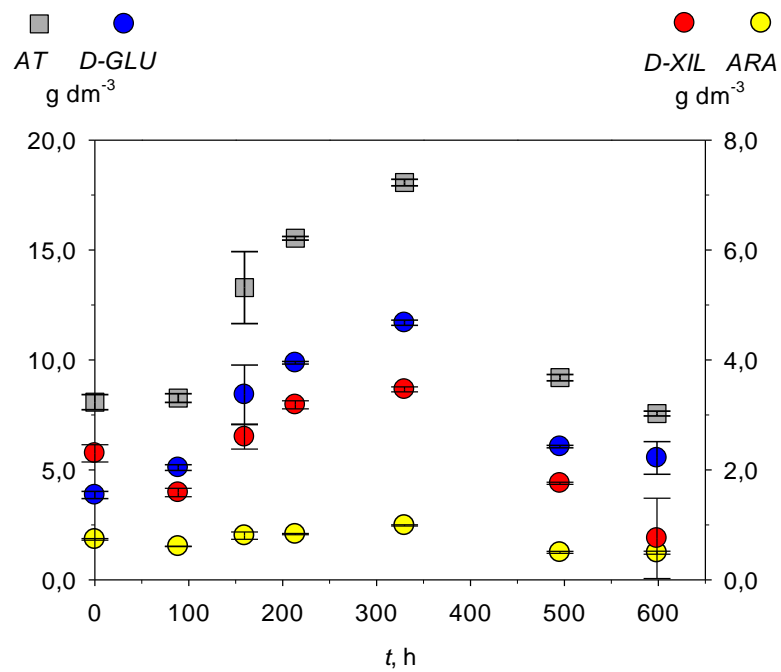


Figura D.6 Variación de AT, *D-GLU*, *D-XIL* y *ARA* con el tiempo en el experimento SFS3-pH1, a 45°C y $\text{pH}_0 = 3,5$, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de $0,15 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla D.3 (cont.)
Variación de la concentración de ácido acético

t , h	A_c , $g\ dm^{-3}$
0,0	1,245 ± 0,023
159,3*	0,641 ± 0,043
400,3**	1,287 ± 0,062
598,5	0,333 ± 0,055

(*) Se añade al reactor 100 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

(**) Se añade al reactor 128 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

Tabla D.3 (cont.)
Variación del índice de inhibición

t , h	I_i
0,0	236,000
3,0	243,408
18,0	229,555
41,5	237,456
159,3*	206,098
186,0	186,513
237,5	178,153
329,8	146,673
400,3**	140,024
495,3	115,807
548,5	108,876
598,5	

(*) Se añade al reactor 100 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

(**) Se añade al reactor 128 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

Tabla D.4
SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *Hansenula polymorpha*
Variación del pH, y de las concentraciones de azúcares totales, etanol, xilitol y arabitol

Expto. SFS4-pH1	$T = 45^{\circ}\text{C}$	$\text{pH}_0 = 3,5$	microaeración	$[\text{I}]_{\text{Bo}} = 0,36 \text{ g dm}^{-3}$		
t, h	pH	$N \cdot 10^9, \text{ células dm}^{-3}$	$AT, \text{ g dm}^{-3}$	$E, \text{ g dm}^{-3}$	$Xi, \text{ g dm}^{-3}$	$Ar, \text{ g dm}^{-3}$
0,0	3,5	22,500	6,838			0,013
3,0		34,272				
4,5		27,998				
19,5	3,9					
27,5						
49,0	3,7	47,423	6,976			
73,5						
92,3*	3,5	39,410	10,800			0,004
164,3		37,105	5,572			0,000
236,5**	3,6	26,763	7,384	0,005	5,193	0,000
332,8	3,5	19,114	7,157	0,000	4,590	0,000
355,5		15,267			4,427	
389,3			6,317	0,000	4,704	0,000

(*) Se añade al reactor 133 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

(**) Se añade al reactor 110 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

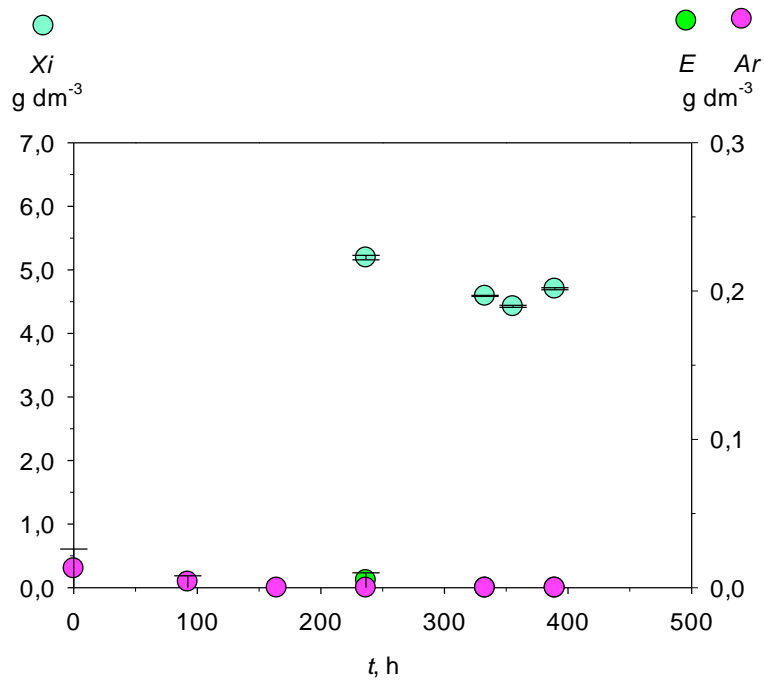


Figura D.7 Variación de Xi , E y Ar con el tiempo en el experimento SFS4-pH1, a 45°C y $\text{pH}_0 = 3,5$, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de $0,36 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla D.4 (cont.)
Variación de la concentración de cada uno de los azúcares generados

t , h	<i>D</i> -GLU, g dm ⁻³	<i>D</i> -XIL, g dm ⁻³	ARA, g dm ⁻³	<i>D</i> -GAL, g dm ⁻³	<i>D</i> -MAN, g dm ⁻³	<i>D</i> -FRU, g dm ⁻³
0,0	3,032	1,812	0,996	0,361	0,303	0,335
49,0	4,097	1,475	0,700	0,287	0,290	0,126
92,3*	6,506	2,357	0,965	0,401	0,327	0,244
164,3	3,274	1,113	0,531	0,249	0,239	0,167
236,5**	4,475	1,566	0,648	0,276	0,255	0,165
332,8	4,277	1,545	0,695	0,251	0,241	0,148
389,3	3,809	1,365	0,586	0,239	0,222	0,095

(*) Se añade al reactor 133 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

(**) Se añade al reactor 110 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

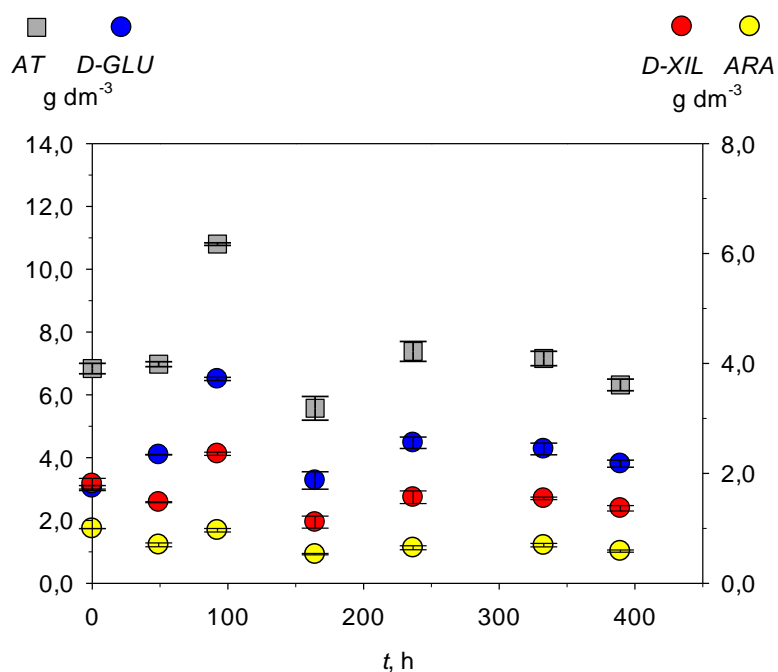


Figura D.8 Variación de AT, *D*-GLU, *D*-XIL y ARA con el tiempo en el experimento SFS4-pH1, a 45°C y pH₀ = 3,5, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de 0,36 g dm⁻³.

Tabla D.4 (cont.)
Variación de la concentración de ácido acético

t , h	A_c , g dm^{-3}
0,0	0,000
6,0	0,000
73,5	0,000
332,8	0,000
389,3	0,000

Tabla D.4 (cont.)
Variación del índice de inhibición

t , h	I
0,0	177,600
3,0	173,080
6,0	178,107
27,5	174,855
73,5	167,792
92,3*	159,982
236,5**	123,324
332,8	101,029
389,3	101,067

(*) Se añade al reactor 133 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

(**) Se añade al reactor 110 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

Tabla D.5

SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *Hansenula polymorpha*Variación del pH , y de las concentraciones de azúcares totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. SFS1-pH2	$T = 45^{\circ}\text{C}$	$pH_0 = 4,5$	microaeración	$[I]_{B_0} = 0,11 \text{ g dm}^{-3}$	
t , h	pH	AT , g dm^{-3}	E , g dm^{-3}	Xi , g dm^{-3}	Ar , g dm^{-3}
0,0	4,5	15,479			0,034
18,5	4,6	35,802			0,061
42,5		28,636			0,122
114,0	4,5	35,118			0,050
163,0*	4,4				
164,0	4,4	16,187	0,000	3,805	0,000
184,0		14,260	0,000	4,413	0,000
210,0		24,102	0,000	5,083	0,108
281,5		25,340	0,000	3,233	0,071
305,0		28,087	0,022		0,088
352,5		12,274	0,000	4,952	0,000

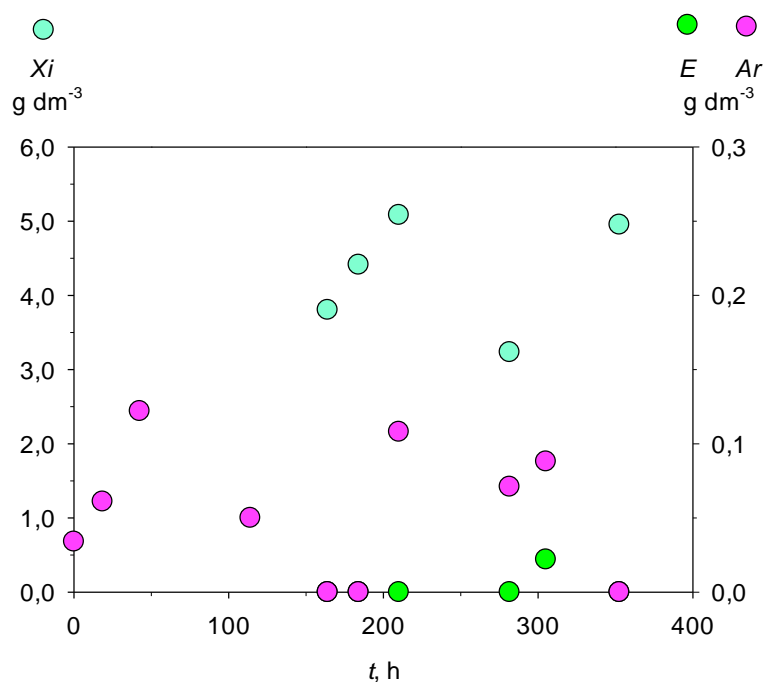
(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.Figura D.9 Variación de Xi , E y Ar con el tiempo en el experimento SFS1-pH2, a 45°C y $pH_0 = 4,5$, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de $0,11 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla D.5 (cont.)
Variación de la concentración de cada uno de los azúcares generados

t , h	<i>D-GLU</i> , g dm ⁻³	<i>D-XIL</i> , g dm ⁻³	<i>ARA</i> , g dm ⁻³	<i>D-FRU</i> , g dm ⁻³	<i>D-GAL</i> , g dm ⁻³	<i>D-MAN</i> , g dm ⁻³
0,0	7,711	4,315	1,372	0,998	0,614	0,469
18,5	24,675	6,685	1,666	1,200	0,753	0,824
42,5	20,232	5,338	1,448	0,323	0,641	0,654
114,0	25,108	5,895	1,602	1,223	0,707	0,582
164,0	11,332	2,669	0,970	0,469	0,425	0,323
184,0	9,930	2,347	0,806	0,412	0,366	0,399
210,0	16,294	4,372	1,339	1,023	0,573	0,497
281,5	17,126	4,383	1,187	1,370	0,519	0,755
305,0	18,977	4,949	1,329	1,454	0,568	0,810
352,5	8,614	2,001	0,768	0,224	0,350	0,317

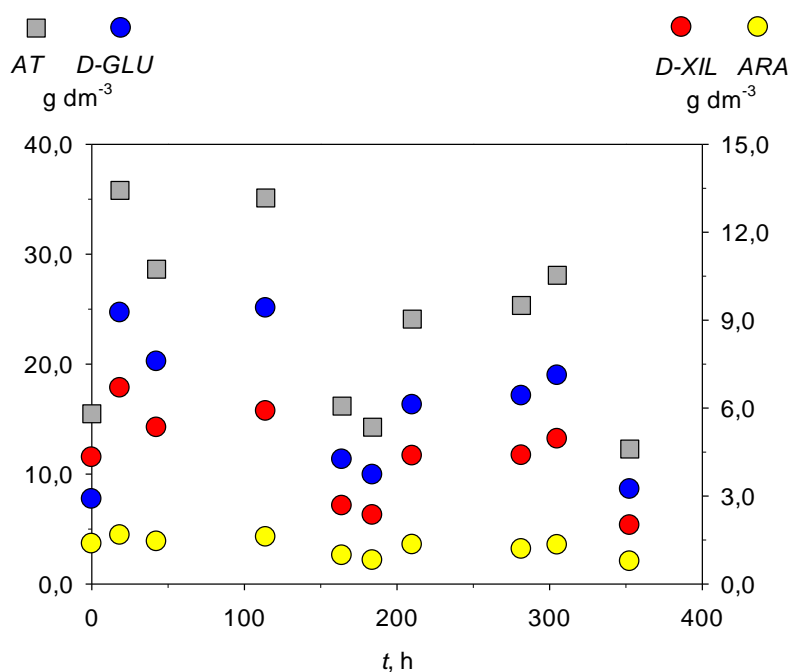


Figura D.10 Variación de *AT*, *D-GLU*, *D-XIL* y *ARA* con el tiempo en el experimento SFS1-pH2, a 45°C y pH₀ = 4,5, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de 0,11 g dm⁻³.

Tabla D.5 (cont.)
Variación de la concentración de ácido acético

t , h	A_c , $g\ dm^{-3}$
1,5	$0,802 \pm 0,011$
18,5	$0,602 \pm 0,001$
114,0	$1,202 \pm 0,010$
210,0	$1,100 \pm 0,002$
352,5	$1,357 \pm 0,014$

Tabla D.5 (cont.)
Variación del índice de inhibición

t , h	I
0,0	339,000
18,5	324,365
114,0	296,392
210,0	221,705
352,5	213,471

Tabla D.6
SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *Hansenula polymorpha*
Variación del pH , y de las concentraciones de azúcares totales, etanol, xilitol y arabitol

Expto. SFS2-pH2	$T = 45^{\circ}\text{C}$	$pH_0 = 4,5$	microaeración	$[I]_{B_0} = 0,13 \text{ g dm}^{-3}$	
t, h	pH	$AT, \text{g dm}^{-3}$	$E, \text{g dm}^{-3}$	$Xi, \text{g dm}^{-3}$	$Ar, \text{g dm}^{-3}$
0,0	4,5	6,487	0,000	4,664	0,000
19,3	4,6				
34,3		16,285			0,017
103,8	4,5	19,167			0,002
153,3*			0,000	4,325	
154,3	4,4				
321,8	4,4	14,539			
367,8		21,296	0,000	4,055	0,050

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

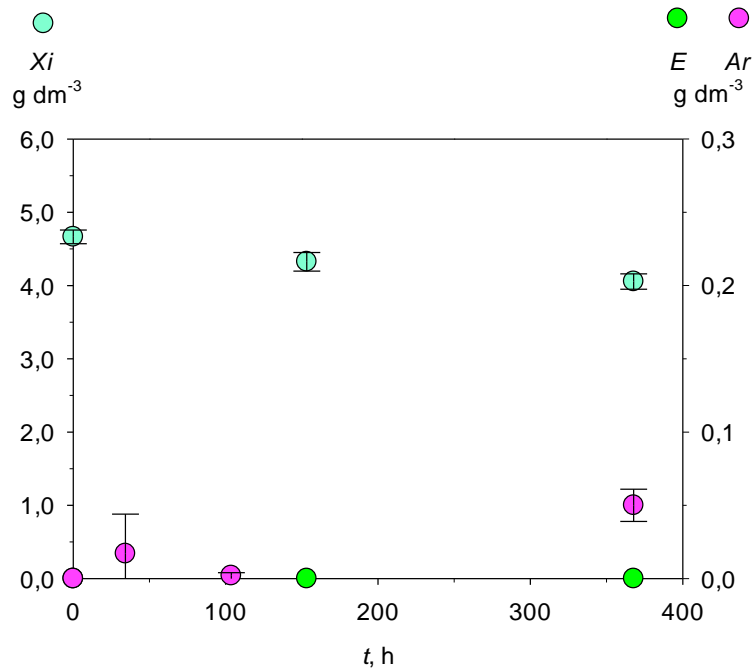


Figura D.11 Variación de Xi , E y Ar con el tiempo en el experimento SFS2-pH2, a 45°C y $pH_0 = 4,5$, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de $0,13 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla D.6 (cont.)
Variación de la concentración de cada uno de los azúcares generados

t , h	<i>D</i> -GLU, g dm ⁻³	<i>D</i> -XIL, g dm ⁻³	ARA, g dm ⁻³	<i>D</i> -FRU, g dm ⁻³	<i>D</i> -MAN, g dm ⁻³	<i>D</i> -GAL, g dm ⁻³
0,0	3,120	1,864	0,728	0,129	0,308	0,338
34,3	10,244	3,586	0,957	0,592	0,439	0,468
103,8	12,529	3,998	0,994	0,687	0,481	0,478
321,8	9,218	3,241	0,831	0,433	0,427	0,389
367,8	13,808	4,675	0,969	0,959	0,485	0,400

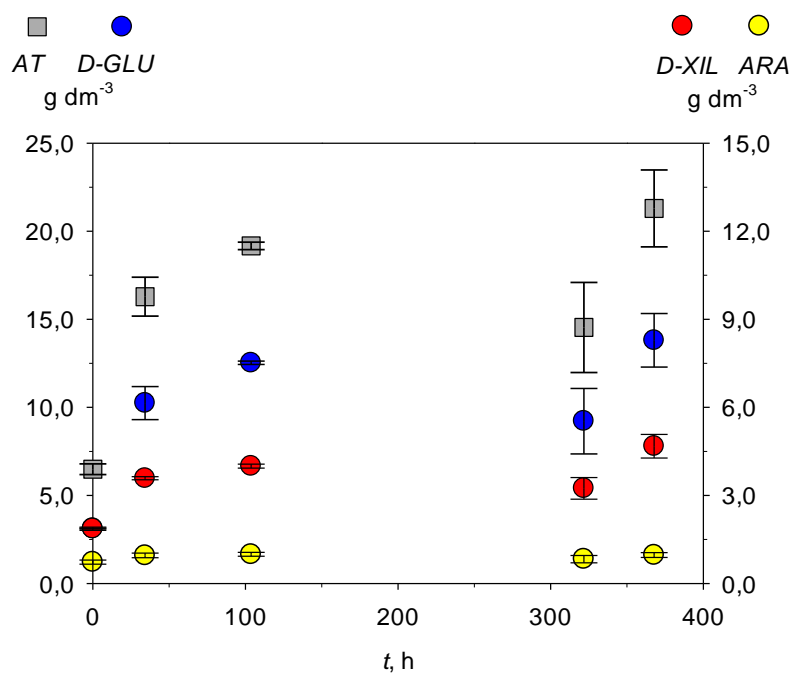


Figura D.12 Variación de AT, *D*-GLU, *D*-XIL y ARA con el tiempo en el experimento SFS2-pH2, a 45°C y pH₀ = 4,5, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de 0,13 g dm⁻³.

Tabla D.6 (cont.)
Variación de la concentración de ácido acético

t , h	A_c , g dm^{-3}
0,0	0,000
6,0	0,000
153,3*	0,000
177,8	$0,540 \pm 0,011$
321,8	$0,740 \pm 0,011$
367,8	$1,720 \pm 0,404$

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

Tabla D.6 (cont.)
Variación del índice de inhibición

t , h	I_i
1,5	138,29
19,3	137,67
153,3*	130,19
154,3	122,72
351,8	104,09

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

Tabla D.7
SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *Hansenula polymorpha*
Variación del pH, y de las concentraciones de azúcares totales, etanol, xilitol y arabitol

Expto. SFS3-pH2a T = 45°C pH₀ = 4,5 microaeración [I]_{B0} = 0,15 g dm⁻³

t, h	pH	N 10 ⁹ , células dm ⁻³	AT, g dm ⁻³	E, g dm ⁻³	Xi, g dm ⁻³	Ar, g dm ⁻³
0,0	4,5	8,750	9,723		5,539	0,000
3,0					5,181	
4,5		17,462				
18,0	4,6			0,000	5,097	
24,5		57,120				
41,5		50,506		0,000		
88,8	4,6	128,432	9,760		5,472	0,013
159,3*			16,399	0,000	5,685	0,074
186,0	4,4	77,178				
213,5		109,823	14,369			0,046
237,5		55,551		0,000	4,943	
261,5	4,3	78,055				
329,8		56,596	13,154	0,000	4,695	0,020
352,0		70,045	13,002			0,000
400,3**	4,1	59,081		0,000		
495,3	4,2	59,061	8,244	0,000	4,196	0,000
520,5		45,983				
548,5		53,460				
598,5			7,761	0,000	3,981	0,000

Se añade al reactor (*) 100 cm³ y (**) 128 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

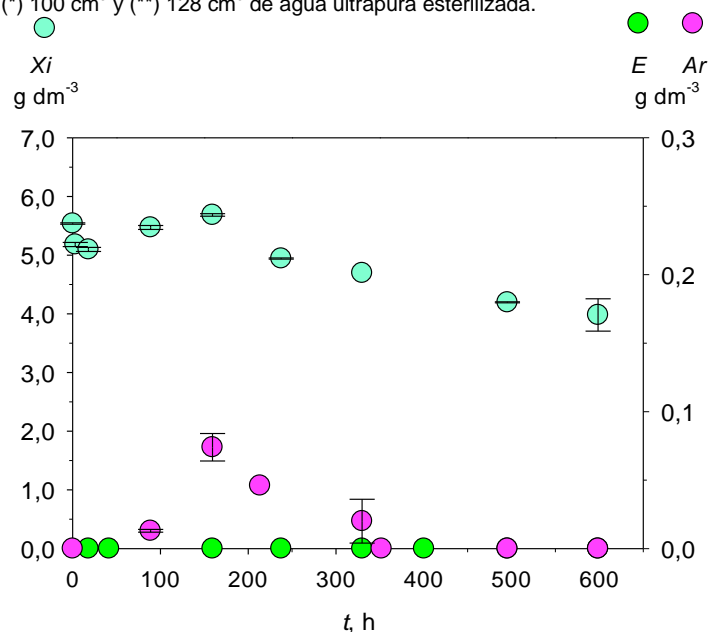


Figura D.13 Variación de Xi, E y Ar con el tiempo en SFS3-pH2a, a 45°C y pH₀ = 4,5, en condiciones de microaeración, y [I]_{B0} = 0,15 g dm⁻³.

Tabla D.7 (cont.)
Variación de la concentración de cada uno de los azúcares generados

t , h	<i>D-GLU</i> , g dm ⁻³	<i>D-XIL</i> , g dm ⁻³	<i>ARA</i> , g dm ⁻³	<i>D-FRU</i> , g dm ⁻³	<i>D-MAN</i> , g dm ⁻³	<i>D-GAL</i> , g dm ⁻³
0,0	4,572	2,798	0,939	0,571	0,428	0,415
88,8	6,176	1,851	0,734	0,344	0,323	0,331
159,3*	10,639	3,312	0,926	0,636	0,433	0,453
213,5	9,103	3,015	0,845	0,526	0,450	0,431
329,8	8,395	2,697	0,769	0,513	0,412	0,368
352,0	8,561	2,525	0,700	0,513	0,353	0,351
495,3	5,359	1,586	0,531	0,241	0,260	0,266
598,5	5,057	1,423	0,516	0,250	0,275	0,239

(*) Se añade al reactor 100 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

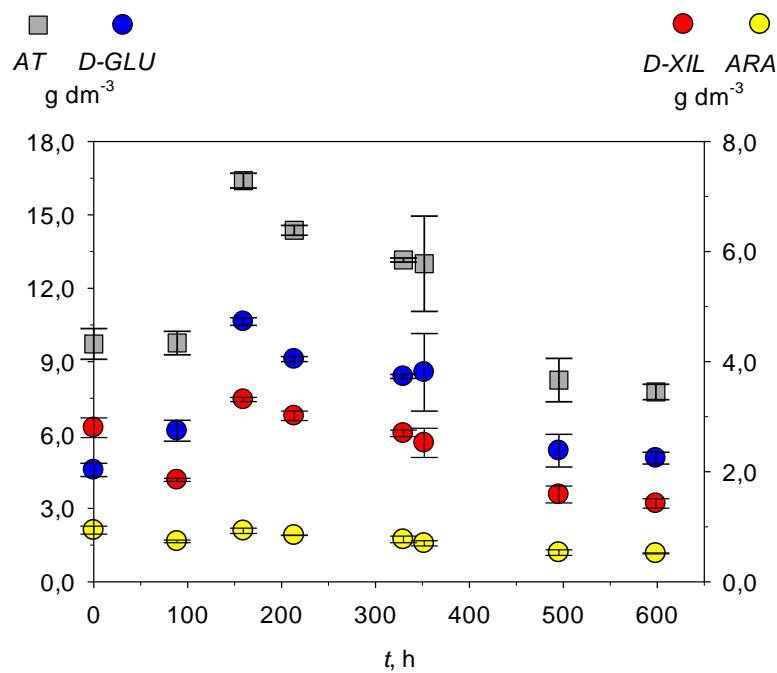


Figura D.14 Variación de *AT*, *D-GLU*, *D-XIL* y *ARA* con el tiempo en el experimento SFS3-pH2a, a 45°C y pH₀ = 4,5, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de 0,15 g dm⁻³.

Tabla D.7 (cont.)
Variación de la concentración de ácido acético

t , h	A_c , $g\ dm^{-3}$
0,0	1,251 \pm 0,069
159,3*	0,632 \pm 0,006
400,3**	0,604 \pm 0,011
598,5	0,598 \pm 0,002

(*) Se añade al reactor 100 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

(**) Se añade al reactor 128 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

Tabla D.7 (cont.)
Variación del índice de inhibición

t , h	I
0,0	220,400
3,0	219,685
18,0	220,858
41,5	233,908
159,3*	208,995
186,0	187,971
237,5	186,652
329,8	175,210
400,3**	159,292
495,3	135,448
548,5	128,874

(*) Se añade al reactor 100 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

(**) Se añade al reactor 128 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

Tabla D.8
SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *Hansenula polymorpha*
Variación del pH, y de las concentraciones de azúcares totales, etanol, xilitol y arabitol

Expto. SFS3-pH2b	$T = 45^{\circ}\text{C}$	$\text{pH}_0 = 4,5$	microaeración	$[\text{I}]_{\text{Bo}} = 0,15 \text{ g dm}^{-3}$
t, h	pH	$AT, \text{g dm}^{-3}$	$E, \text{g dm}^{-3}$	$Ar, \text{g dm}^{-3}$
0,0	4,5	10,593		0,000
1,5	4,4			
3,0	4,4	12,617	0,000	0,000
4,5	4,4		0,017	
17,0	4,4	17,898	0,046	0,000
28,5	4,4	15,167		5,916
90,5	4,3	15,058	0,056	0,058
115,0	4,3	13,956		0,045
140,0	4,3	19,448		
163,5	4,4	18,975		5,720
187,0	4,4	17,169	0,075	
259,0	4,3	17,141	1,627	5,609
307,5	4,3	10,678	7,924	0,211
336,0*	4,2	8,405	7,405	0,200
356,5	4,2	7,925	7,068	5,316
427,5	4,2	3,760	6,643	0,109
453,5	4,2	1,328	5,675	0,000
474,0	4,2	2,257		4,708

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

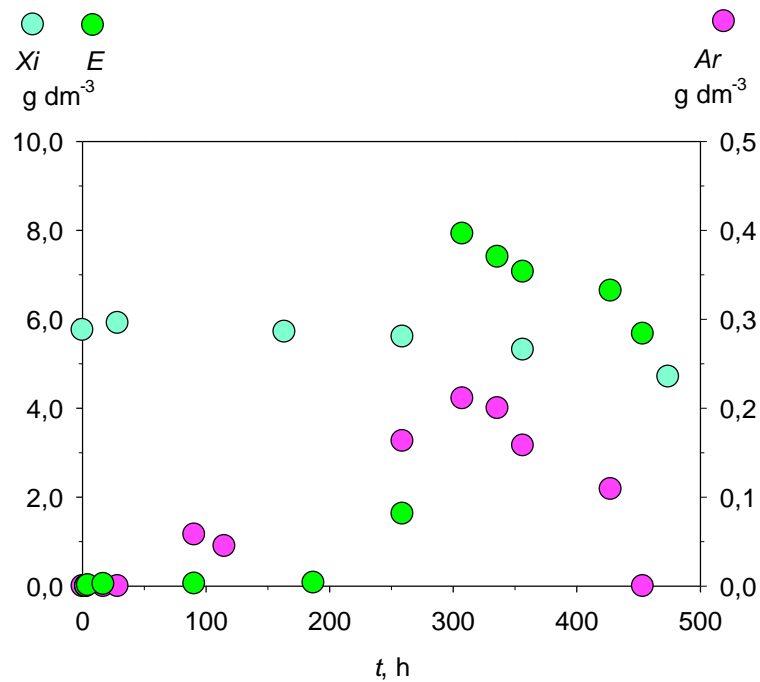


Figura D.15 Variación de Xi , E y Ar versus t en el Expto. SFS3-pH2b, a 45°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, en condiciones microaeróbicas, y con una concentración inicial de inóculo de $0,15 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla D.8 (cont.)
Variación de la concentración de cada uno de los azúcares generados

t , h	<i>D-GLU</i> , g dm ⁻³	<i>D-XIL</i> , g dm ⁻³	<i>ARA</i> , g dm ⁻³	<i>D-FRU</i> , g dm ⁻³	<i>D-GAL</i> , g dm ⁻³	<i>D-MAN</i> , g dm ⁻³
0,0	5,421	2,712	0,975	0,650	0,445	0,391
3,0	8,402	2,192	0,832	0,472	0,377	0,343
17,0	11,990	3,195	1,027	0,818	0,469	0,399
28,5	10,282	2,923	0,995	0,114	0,434	0,419
90,5	9,658	2,909	0,609	1,225	0,254	0,403
115,0	9,727	2,550	0,564	0,593	0,249	0,273
140,0	13,588	2,999	1,279	0,718	0,481	0,384
163,5	13,562	3,261	1,006	0,227	0,450	0,469
187,0	11,257	3,437	1,000	0,508	0,447	0,521
259,0	10,915	3,331	1,161	0,784	0,580	0,370
307,5	5,032	3,166	1,044	0,655	0,480	0,303
336,0*	3,213	2,993	0,971	0,457	0,439	0,332
356,5	2,825	3,001	0,890	0,497	0,395	0,318
427,5	0,523	1,904	0,679	0,159	0,318	0,176
453,5	0,000	0,799	0,348	0,000	0,181	0,000
474,0	0,000	1,515	0,514	0,000	0,228	0,000

(*) Se añade al reactor 100 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

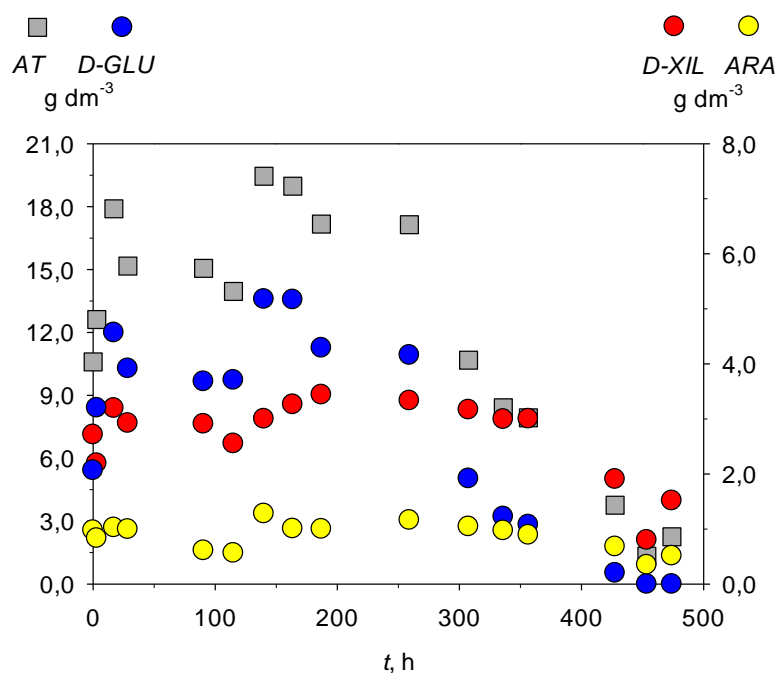


Figura D.16 Variación de AT, *D-GLU*, *D-XIL* y *ARA* con el tiempo en el experimento SFS3-pH2b, a 45°C y pH₀ = 4,5, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de 0,15 g dm⁻³.

Tabla D.8 (cont.)
Variación de la concentración de ácido acético

t , h	A_c , g dm^{-3}
0,0	0,715
17,0	0,115
115,0	0,149
140,0	0,144
187,0	0,000
307,5	0,000
336,0*	0,000
356,5	0,000
427,5	0,000
453,5	0,000

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

Tabla D.8 (cont.)
Variación del índice de inhibición

t , h	I
4,5	91,842
187,0	85,780
336,0*	40,570
356,5	38,829
427,5	32,862

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

Tabla D.9
SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *Hansenula polymorpha*
Variación del pH, y de las concentraciones de azúcares totales, etanol, xilitol y arabitol

Expto. SFS4-pH2	$T = 45^{\circ}\text{C}$	$\text{pH}_0 = 4,5$	microaeración	$[I]_{\text{Bo}} = 0,36 \text{ g dm}^{-3}$		
t, h	pH	$N \cdot 10^9, \text{células dm}^{-3}$	$AT, \text{g dm}^{-3}$	$E, \text{g dm}^{-3}$	$Xi, \text{g dm}^{-3}$	$Ar, \text{g dm}^{-3}$
0,0	4,5	21,000	6,257			0,000
3,0						
4,5		27,982				
19,5	4,6	33,600				
27,5		30,246				
49,0	4,5	44,154	10,666			0,000
73,5		48,460				
92,3*	4,4		7,819			0,000
164,3		42,771	7,120			0,000
236,5**	4,6		8,895	0,000	5,075	0,000
332,8	4,4	26,824	6,629	0,000	4,572	0,000
355,5		22,774			4,403	
389,3			5,306	0,000	4,581	0,000

(*) Se añade al reactor 135 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

(**) Se añade al reactor 110 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

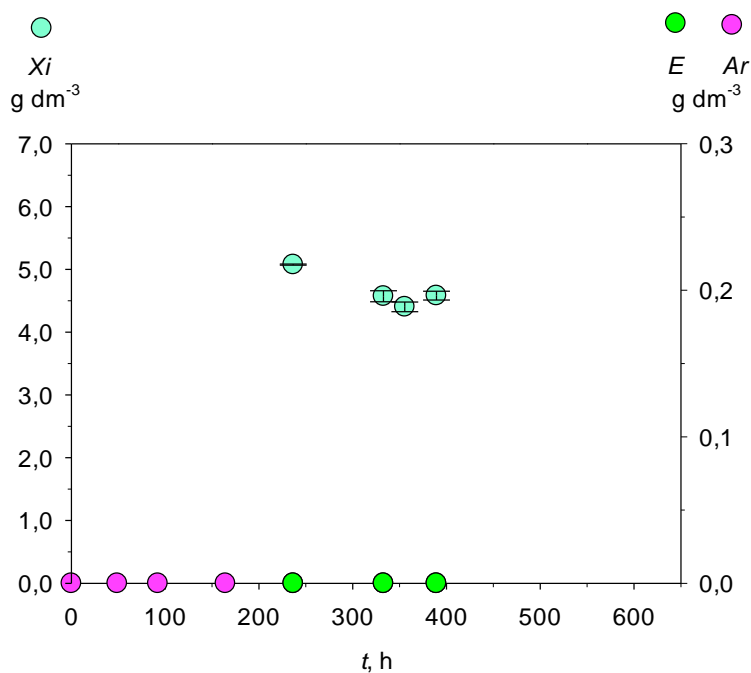


Figura D.17 Variación de Xi , E y Ar con el tiempo en el experimento SFS4-pH2, a 45°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de 0,36 g dm⁻³.

Tabla D.9 (cont.)
Variación de la concentración de cada uno de los azúcares generados

t , h	<i>D-GLU</i> , g dm^{-3}	<i>D-XIL</i> , g dm^{-3}	<i>ARA</i> , g dm^{-3}	<i>D-GAL</i> , g dm^{-3}	<i>D-MAN</i> , g dm^{-3}	<i>D-FRU</i> , g dm^{-3}
0,0	2,961	1,698	0,817	0,349	0,308	0,124
49,0	6,362	2,348	0,926	0,362	0,330	0,338
92,3*	4,631	1,749	0,732	0,297	0,272	0,137
164,3	4,330	1,597	0,612	0,284	0,297	0,000
236,5**	5,383	1,994	0,710	0,303	0,299	0,206
332,8	3,960	1,503	0,584	0,240	0,251	0,091
389,3	3,197	1,147	0,475	0,204	0,200	0,083

(*) Se añade al reactor 135 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

(**) Se añade al reactor 110 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

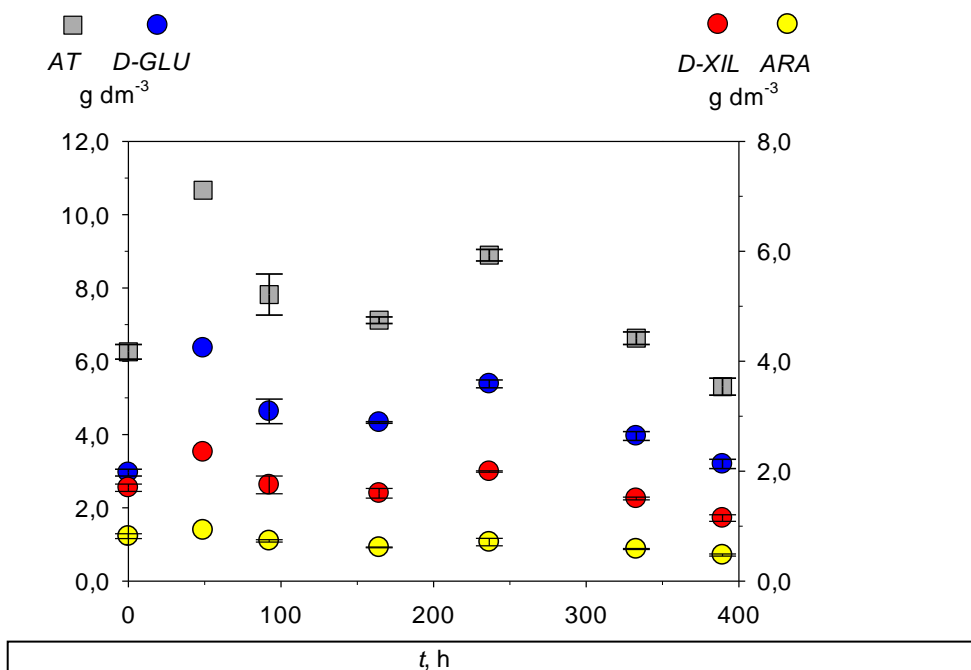


Figura D.18 Variación de *AT*, *D-GLU*, *D-XIL* y *ARA* con el tiempo en el experimento SFS4-pH2, a 45°C y $\text{pH}_0 = 4,5$, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de $0,36 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla D.9 (cont.)
Variación de la concentración de ácido acético

t , h	A_c , $g\ dm^{-3}$
0,0	0,000
6,0	0,000
73,5	0,000
332,8	0,000
389,3	0,000

Tabla D.9 (cont.)
Variación del índice de inhibición

t , h	I
0,0	151,200
3,0	155,475
6,0	150,561
27,5	148,666
73,5	139,383
92,3*	135,750
236,5**	107,645
332,8	84,874
389,3	80,583

(*) Se añade al reactor 135 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

(**) Se añade al reactor 110 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

Tabla D.10

SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *Hansenula polymorpha*
 Variación del pH , y de las concentraciones de azúcares totales, ácido acético, etanol, xilitol y arabitol

Expto. SFS1-pH3	$T = 45^{\circ}\text{C}$	$pH_0 = 5,5$	microaeración	$[I]_{B_0} = 0,11 \text{ g dm}^{-3}$	
t , h	pH	AT , g dm^{-3}	E , g dm^{-3}	Xi , g dm^{-3}	Ar , g dm^{-3}
0,0	5,5	15,063			0,000
18,5	5,2	37,661			0,002
42,5		34,280			0,108
114,0	5,1	32,487			0,038
163,0*	5,2				
164,0	5,2	21,146	0,000	1,188	
184,0		21,356	0,000	3,128	0,199
210,0			4,007	1,848	
281,5		6,793	3,757	1,154	0,352
305,0		7,008	3,656	0,678	0,258
352,5		3,603	2,816	1,409	0,120

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

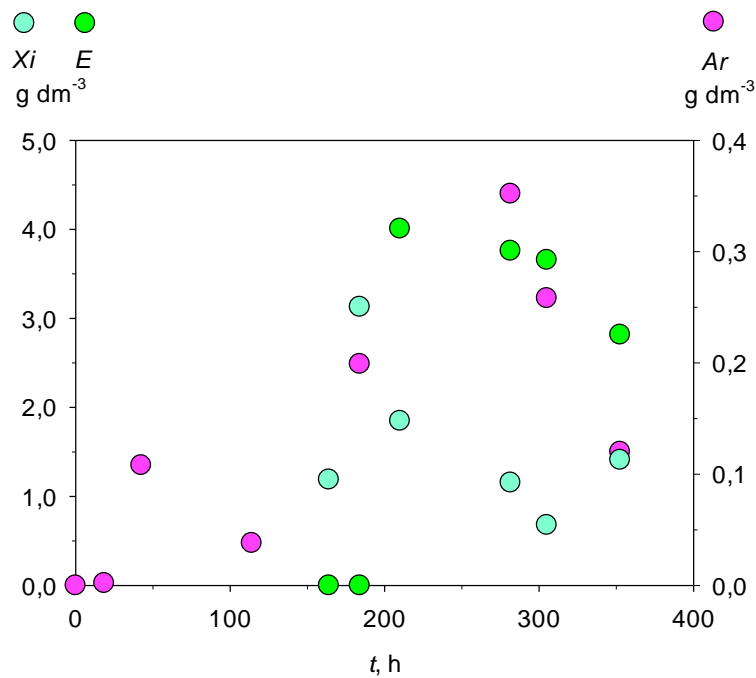


Figura D.19 Variación de Xi , E y Ar con el tiempo en el experimento SFS1-pH3, a 45°C y $pH_0 = 5,5$, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de $0,11 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla D.10 (cont.)
Variación de la concentración de cada uno de los azúcares generados

t , h	<i>D-GLU</i> , g dm ⁻³	<i>D-XIL</i> , g dm ⁻³	<i>ARA</i> , g dm ⁻³	<i>D-FRU</i> , g dm ⁻³	<i>D-GAL</i> , g dm ⁻³	<i>D-MAN</i> , g dm ⁻³
0,0	7,745	4,458	1,204	0,672	0,548	0,436
18,5	26,478	7,184	1,705	1,026	0,749	0,519
42,5	23,902	6,521	1,623	0,971	0,697	0,565
114,0	21,415	7,098	1,589	0,964	0,669	0,751
164,0	14,492	4,077	1,092	0,547	0,443	0,495
184,0	14,501	4,192	1,028	0,690	0,434	0,512
281,5	0,592	4,327	1,195	0,000	0,478	0,200
305,0	0,509	4,537	1,245	0,069	0,475	0,173
352,5	0,000	2,500	0,774	0,000	0,329	0,000

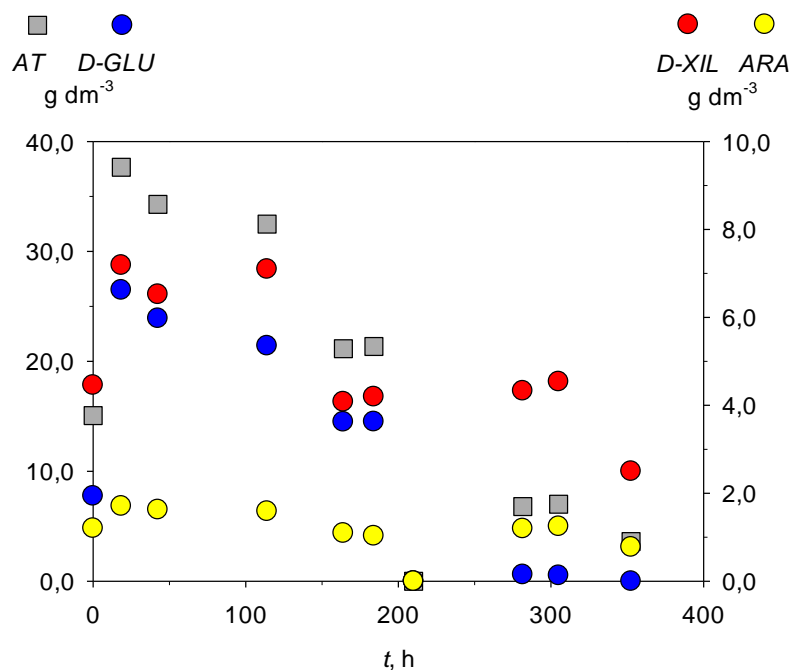


Figura D.20 Variación de AT, *D-GLU*, *D-XIL* y *ARA* con el tiempo en el experimento SFS1-pH3, a 45°C y pH₀ = 5,5, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de 0,11 g dm⁻³.

Tabla D.10 (cont.)
Variación de la concentración de ácido acético

t , h	A_c , g dm^{-3}
1,5	$0,053 \pm 0,010$
22,0	$0,553 \pm 0,010$
164,0	$1,030 \pm 0,652$
184,0	$1,130 \pm 0,483$
210,0	$1,707 \pm 0,613$
281,5	$0,958 \pm 0,878$
305,0	$2,195 \pm 0,605$
352,5	$2,552 \pm 0,196$

Tabla D.10 (cont.)
Variación del índice de inhibición

t , h	I
0,0	231,600
18,5	268,159
114,0	187,087
210,0	87,234
352,5	65,819

Tabla D.11
SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *Hansenula polymorpha*
Variación del pH, y de las concentraciones de azúcares totales, etanol, xilitol y arabitol

Expto. SFS2-pH3	$T = 45^{\circ}\text{C}$	$\text{pH}_0 = 5,5$	microaeración	$[I]_{\text{Bo}} = 0,13 \text{ g dm}^{-3}$	
t, h	pH	$AT, \text{g dm}^{-3}$	$E, \text{g dm}^{-3}$	$Xi, \text{g dm}^{-3}$	$Ar, \text{g dm}^{-3}$
0,0	5,5	6,513	0,000	5,084	0,000
19,3	5,1				
34,3		18,614			0,126
103,8	5,5	17,169			0,046
153,3*			0,000	4,293	
154,3	5,4				
321,8		12,955	2,582	3,872	0,389
351,8	5,1		6,926	4,074	
367,8		6,030	9,877	4,920	0,287

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

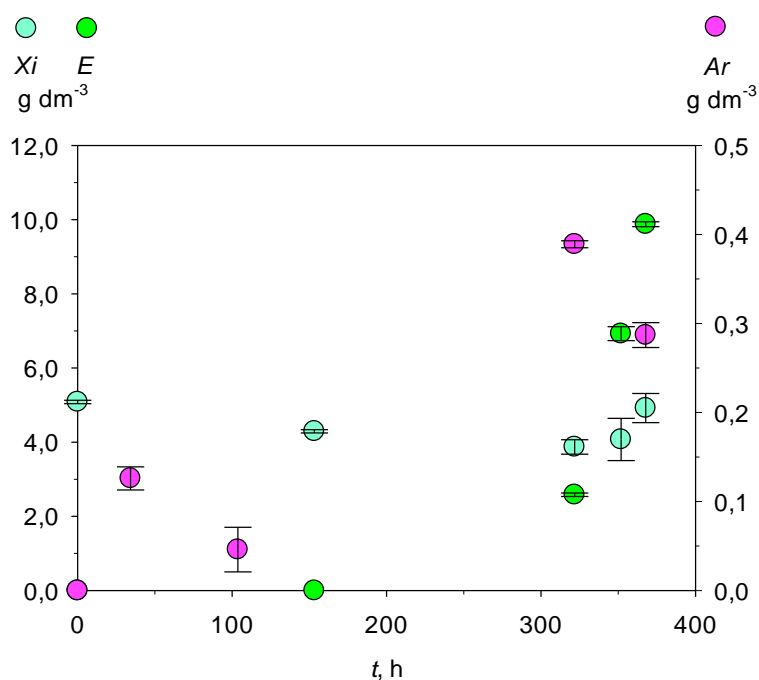


Figura D.21 Variación de Xi , E y Ar con el tiempo en el experimento SFS2-pH3, a 45°C y $\text{pH}_0 = 5,5$, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de $0,13 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla D.11 (cont.)
Variación de la concentración de cada uno de los azúcares generados

t , h	<i>D-GLU</i> , g dm ⁻³	<i>D-XIL</i> , g dm ⁻³	<i>ARA</i> , g dm ⁻³	<i>D-FRU</i> , g dm ⁻³	<i>D-GAL</i> , g dm ⁻³	<i>D-MAN</i> , g dm ⁻³
0,0	3,193	1,772	0,724	0,176	0,345	0,304
34,3	11,373	4,162	1,301	0,801	0,522	0,456
103,8	10,906	3,613	0,997	0,718	0,458	0,477
321,8	6,884	3,689	0,896	0,652	0,448	0,384
367,8	0,352	3,988	1,072	0,077	0,425	0,116

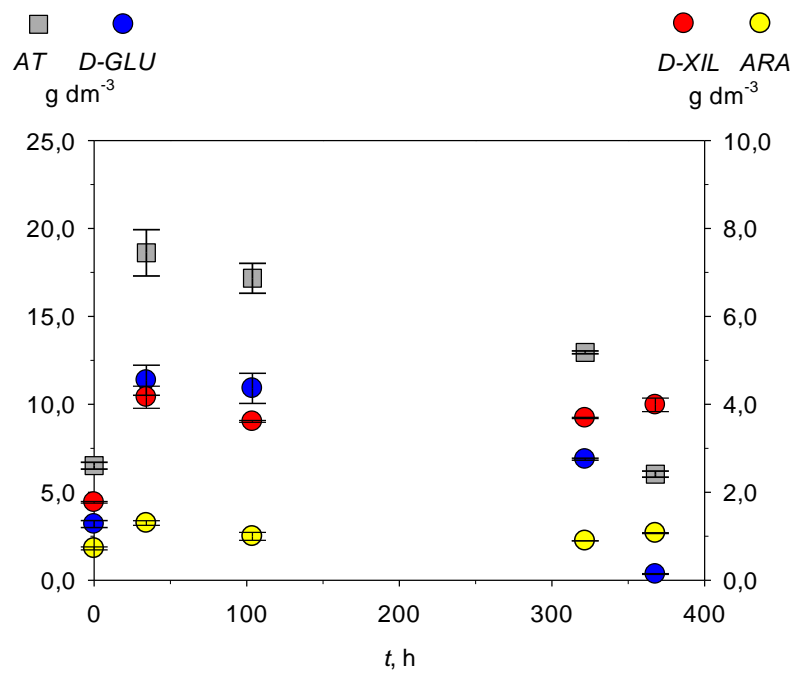


Figura D.22 Variación de *AT*, *D-GLU*, *D-XIL* y *ARA* con el tiempo en el experimento SFS2-pH3, a 45°C y $pH_o = 5,5$, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de 0,13 g dm⁻³.

Tabla D.11 (cont.)
Variación de la concentración de ácido acético

t , h	A_c , g dm ⁻³
0,0	0,621 ± 0,010
153,3*	0,861 ± 0,058
321,8	1,589 ± 0,010
351,8	3,675 ± 0,564
367,8	2,856 ± 0,251

(*) Se añade al reactor 100 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

Tabla D.11 (cont.)
Variación del índice de inhibición

t , h	I
1,5	131,094
19,3	142,454
153,3*	118,116
154,3	113,410
351,8	41,607

(*) Se añade al reactor 100 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

Tabla D.12

SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *Hansenula polymorpha*

Variación del pH, y de las concentraciones de azúcares totales, etanol, xilitol y arabitol

Expto. SFS3-pH3 $T = 45^{\circ}\text{C}$ $\text{pH}_0 = 5,5$ microaeración $[\text{I}]_{\text{Bo}} = 0,15 \text{ g dm}^{-3}$

t , h	pH	$N \cdot 10^9$, células dm^{-3}	AT, g dm^{-3}	E, g dm^{-3}	X_i , g dm^{-3}	A_r , g dm^{-3}
0,0	5,5	8,125	8,220		5,107	0,020
3,0					5,075	
4,5		17,453				
18,0	5,4			0,000	5,375	
24,5		32,328				
41,5		67,013		0,000		
88,8	5,3	73,869	10,696		5,611	0,060
159,3*		145,053	16,324	0,042	5,507	0,058
162,5	5,1					
186,0		114,677				
213,5		115,280	15,763			0,051
237,5		114,624		0,045	4,790	
261,5	5,4	101,891				
329,8			19,067	0,000	5,231	0,093
352,0		150,654	12,951			0,018
400,3**	5,1	87,668		0,000		
495,3	5,2	99,107	11,251	0,000	4,033	0,003
520,5		117,233				
548,5		90,198				
598,5			9,480	0,000	3,661	0,003

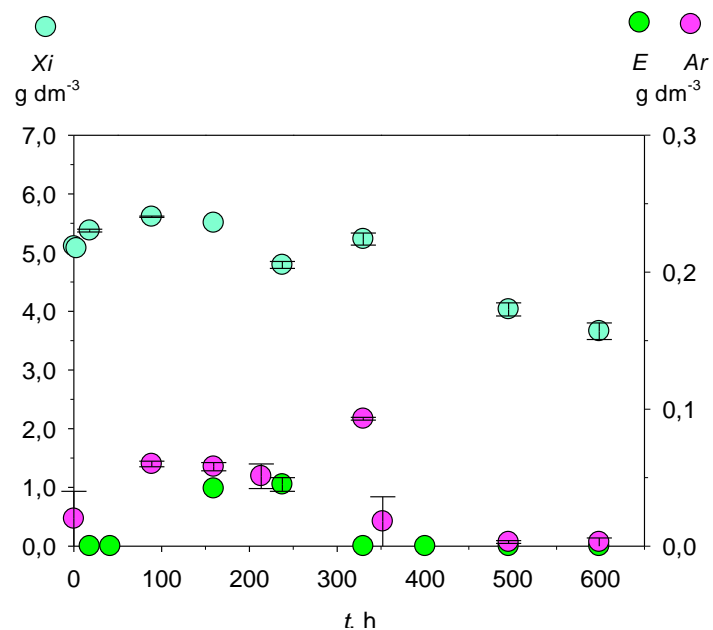
Se añade al reactor (*) 100 cm^3 y (**) 128 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.Figura D.23 Variación de X_i , E y A_r versus t en Expto. SFS3-pH3, a 45°C y $\text{pH}_0 = 5,5$, en condiciones de microaeración, y $[\text{I}]_{\text{Bo}} = 0,15 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla D.12 (cont.)
Variación de la concentración de cada uno de los azúcares generados

t , h	<i>D-GLU</i> , g dm ⁻³	<i>D-XIL</i> , g dm ⁻³	<i>ARA</i> , g dm ⁻³	<i>D-FRU</i> , g dm ⁻³	<i>D-GAL</i> , g dm ⁻³	<i>D-MAN</i> , g dm ⁻³
0,0	3,782	2,487	0,765	0,454	0,374	0,358
88,8	6,744	2,141	0,766	0,339	0,365	0,340
159,3*	10,722	3,141	0,957	0,637	0,419	0,448
213,5	10,279	3,146	0,795	0,704	0,394	0,445
329,8	12,189	3,953	0,952	0,972	0,465	0,536
352,0	8,245	2,665	0,818	0,489	0,354	0,381
495,3	7,178	2,362	0,661	0,368	0,314	0,368
598,5	5,948	2,015	0,614	0,344	0,274	0,285

(*) Se añade al reactor 100 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

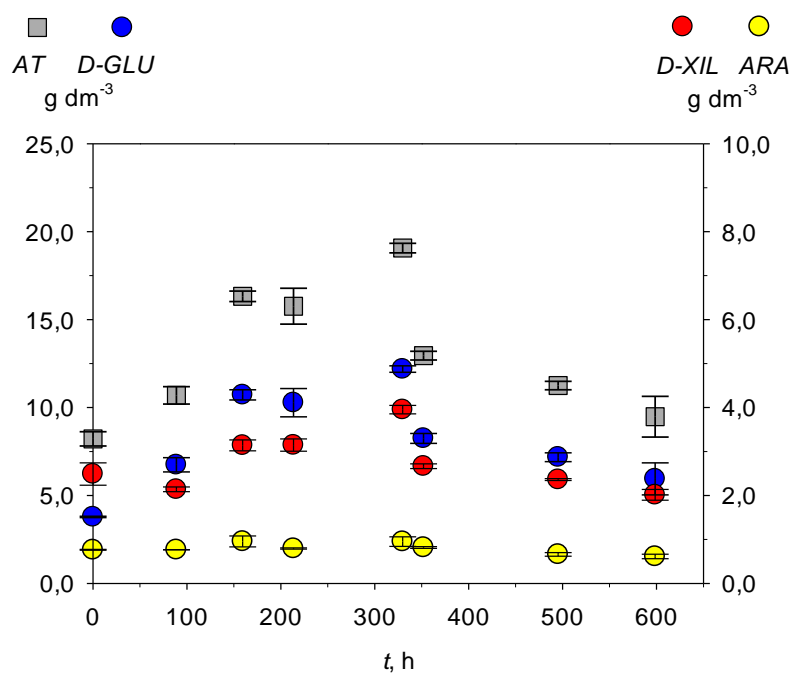


Figura D.24 Variación de AT, *D-GLU*, *D-XIL* y *ARA* con el tiempo en el experimento SFS3-pH3, a 45°C y pH₀ = 5,5, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de 0,15 g dm⁻³.

Tabla D.12 (cont.)
Variación de la concentración de ácido acético

t , h	A_c , g dm^{-3}
0,0	$1,159 \pm 0,051$
159,3*	$0,506 \pm 0,040$
400,3**	$1,084 \pm 0,003$
598,5	$0,612 \pm 0,002$

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

(**) Se añade al reactor 128 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

Tabla D.12 (cont.)
Variación del índice de inhibición

t , h	I
0,0	195,000
3,0	189,665
18,0	194,879
41,5	205,670
159,3*	185,218
186,0	173,191
237,5	175,199
329,8	149,397
400,3**	139,132
495,3	114,319
548,5	110,877

(*) Se añade al reactor 100 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

(**) Se añade al reactor 128 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

Tabla D.13
SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON *Hansenula polymorpha*
Variación del pH, y de las concentraciones de azúcares totales, etanol, xilitol y arabitol

Expto. SFS4-pH3	$T = 45^{\circ}\text{C}$	$\text{pH}_0 = 5,5$	microaeración	$[\text{I}]_{\text{Bo}} = 0,36 \text{ g dm}^{-3}$		
t , h	pH	$N \cdot 10^9$, células dm^{-3}	AT , g dm^{-3}	E , g dm^{-3}	X_i , g dm^{-3}	Ar , g dm^{-3}
0,0	5,5	19,500	6,517	0,000		0,009
3,0		24,919				
4,5						
19,5	5,1					
27,5						
49,0	5,2		9,670			0,001
73,5		54,323				
92,3*	5,4	55,737	10,691			0,033
164,3		45,680	5,454			0,000
236,5**	5,3		5,985	0,022		0,000
332,8	5,5	27,233	6,145	0,000	4,195	0,000
355,5		37,901			4,250	
389,3			5,801	0,353	4,470	0,008

(*) Se añade al reactor 138 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

(**) Se añade al reactor 110 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

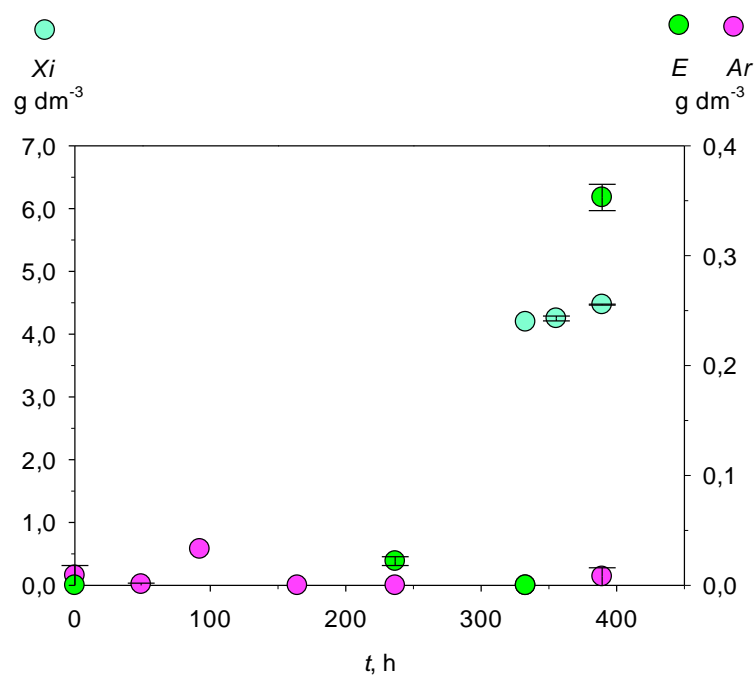


Figura D.25 Variación de X_i , E y Ar con el tiempo en el experimento SFS4-pH3, a 45°C y $\text{pH}_0 = 5,5$, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de $0,36 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla D.13 (cont.)
Variación de la concentración de cada uno de los azúcares generados

t , h	<i>D-GLU</i> , g dm^{-3}	<i>D-XIL</i> , g dm^{-3}	<i>ARA</i> , g dm^{-3}	<i>D-GAL</i> , g dm^{-3}	<i>D-MAN</i> , g dm^{-3}	<i>D-FRU</i> , g dm^{-3}
0,0	3,010	1,716	0,982	0,338	0,295	0,177
49,0	5,826	2,011	0,960	0,351	0,330	0,192
92,3*	6,403	2,353	0,888	0,368	0,392	0,287
164,3	3,140	1,232	0,587	0,260	0,235	0,000
236,5**	3,600	1,279	0,616	0,240	0,250	0,000
332,8	3,644	1,311	0,607	0,243	0,224	0,117
389,3	3,452	1,269	0,601	0,229	0,205	0,045

(*) Se añade al reactor 138 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

(**) Se añade al reactor 110 cm^3 de agua ultrapura esterilizada.

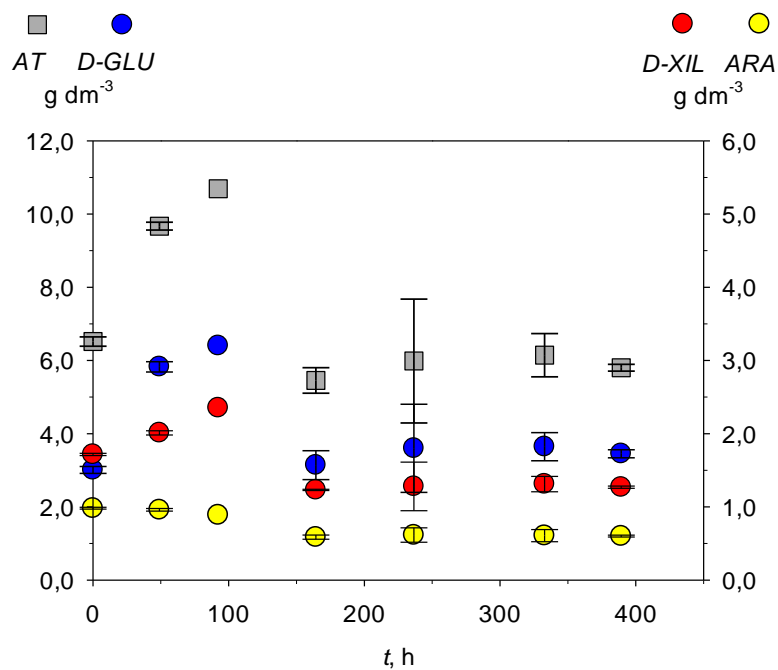


Figura D.26 Variación de *AT*, *D-GLU*, *D-XIL* y *ARA* con el tiempo en el experimento SFS4-pH3, a 45°C y $\text{pH}_0 = 5,5$, en condiciones de microaeración, y con una concentración inicial de inóculo de $0,36 \text{ g dm}^{-3}$.

Tabla D.13 (cont.)
Variación de la concentración de ácido acético

t , h	A_c , g dm ⁻³
0,0	0,000
6,0	0,000
73,5	0,000
332,8	0,000
389,3	0,000

Tabla D.13 (cont.)
Variación del índice de inhibición

t , h	I
0,0	158,000
3,0	164,664
6,0	163,709
27,5	166,241
73,5	156,266
92,3*	151,248
236,5**	115,197
332,8	97,602
389,3	79,272

(*) Se añade al reactor 138 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

(**) Se añade al reactor 110 cm³ de agua ultrapura esterilizada.

7.4 BIBLIOGRAFÍA

- Lindegren C.C., Nagai S., Nagai H. (1958). Induction of respiratory deficiency in yeast by manganese, copper, cobalt and nickel. *Nature* **182**(4633), 446-448.

