Grasas y Aceites
Vol. 53. Fasc. 3 (2002), 282-288

Proceso de sacarificación y fermentación simultáneas para la conversión de la fracción celulósica del residuo de la extracción del aceite de oliva en etanol

Por **I. Ballesteros, J.M. Oliva, M.J. Negro, P. Manzanares, y M. Ballesteros***

CIEMAT-Departamento de Energías Renovables
Avda. Complutense, 22. 28040-Madrid

RESUMEN

Proceso de sacarificación y fermentación simultáneas para la conversión de la fracción celulósica del residuo de la extracción del aceite de oliva en etanol.

En el presente trabajo se estudia la producción de etanol-combustible a partir de la celulosa contenida en las distintas fracciones (pulpa y fragmentos de huesos) que componen el residuo de la extracción de aceite de oliva mediante un proceso en dos fases.

El trabajo ha consistido en una caracterización de las dos fracciones y en el estudio de la producción de etanol mediante un proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultáneas (SFS), a escala de laboratorio. Se ha estudiado el efecto que un pretratamiento termomecánico de explosión a vapor, previo a la etapa de hidrólisis enzimática y fermentación, tiene sobre la acción del complejo celulolítico. Por último, se han determinado las condiciones óptimas de ensayo para la sacarificación y fermentación simultáneas utilizando una cepa termotolerante de *Kluyveromyces marxianus*.

En las condiciones de ensayo óptimas, serían necesarios 9 kg. de pulpa o 6 kg. de hueso pretratado (ambos sobre peso seco), para obtener 1 litro de etanol.

PALABRAS-CLAVE: Bioetanol – Pretratamiento - Residuo de la extracción del aceite de oliva - Sacarificación y fermentación simultáneas.

SUMMARY

Simultaneous saccharification and fermentation process for converting the cellulosic fraction of olive oil extraction residue into ethanol.

In this work, the residue generated in the new two-step centrifugation process for olive oil extraction is assessed for the production of bioethanol. Both olive pulp and fragmented stones fractions comprised in such residue are analyzed and tested at laboratory scale for bioconversion to ethanol by a simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process. Firstly, optima conditions for the enzymatic hydrolysis step of steam-exploded pretreated sustrates were determined. Then, simultaneous saccharification and fermentation process was assayed using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* in different assay conditions.

For the selected conditions, 9 kg of unpretreated pulp or 6 kg of pretreated fragmented stones (both based on dry matter) would be necessary to obtain 1 liter of ethanol.

KEY-WORDS: Bioethanol – Pretreatment - Olive oil extraction residue - Simultaneous saccharification and fermentation.

1. INTRODUCCION

Tradicionalmente, la extracción del aceite de oliva se ha realizado mediante un sistema continuo en tres fases que requiere la adición suplementaria de agua, lo que incrementa notablemente el volumen de efluentes producidos. Actualmente, el sistema de extracción de aceite de oliva según un procedimiento de extracción en dos fases (Alba, et al., 1996), también llamado ecológico, ha reducido de manera considerable el volumen de efluentes producidos por la industria olivarera. No obstante, en la separación del aceite del resto de componentes, todavía se origina un residuo, denominado genéricamente orujo, formado por la pulpa, el hueso y las aguas de vegetación, que contiene todos los azúcares y demás sustancias solubles que quedan disueltas en el alpechín en el proceso de extracción del aceite de oliva convencional. El producto agotado, con un contenido en grasa inferior al 1% y una humedad en torno al 60%, es un residuo molesto y muy abundante (alrededor del 80% de la aceituna molturada) de imposible almacenamiento en la almazara. La revalorización de este residuo mediante su fraccionamiento, y la posibilidad de obtener productos de interés industrial a partir del mismo supondría una mejora en la gestión de los subproductos de la industria olivarera.

La estrategia de aprovechamiento integral contempla la obtención de productos de alto valor añadido a partir de las dos fracciones del residuo: la fracción leñosa procedente de los huesos de la aceituna molturada y la fracción de pulpa residual. En estudios previos (Fernández-Bolaños *et al.*, 1998) se han identificado en este tipo de materiales una serie de compuestos de interés, tales como el hidroxitirosol y el manitol, conocidos por su actividad antioxidante y edulcorante, respectivamente. La recuperación de estos compuestos a partir de ambas fracciones está siendo estudiada como parte de la estrategia de utilización integral de estos residuos. Por otra parte, su contenido en material lignocelulósico puede ser revalorizado mediante su utilización como sustrato para la obtención de biocombustibles, tal como el etanol. La producción de etanol a partir de estos sustratos

presenta ventajas potenciales, ya que al tener un origen residual presentan un bajo coste en comparación con las materias primas de origen renovable que se utilizan habitualmente con este fin (maderas, residuos herbáceos, etc.).

El alcohol etílico, o bioetanol, obtenido por fermentación de materias primas que contienen hidratos de carbono, se adapta particularmente bien para sustituir a la gasolina en los motores de encendido por chispa. El alcohol etílico presenta una serie de cualidades que favorecen su empleo ya que es un líquido no tóxico, no contaminante y fácil de obtener a gran escala a partir de la fermentación de numerosos productos agrícolas y residuos. La producción de etanol combustible a partir de los subproductos procedentes de la extracción del aceite de oliva podría suponer una alternativa interesante en la utilización de este tipo de residuos que podría abrir nuevos mercados para su revalorización.

En este trabajo se ha evaluado la posibilidad de obtener etanol a partir de las dos fracciones presentes en el orujo (pulpa y fragmentos de hueso) mediante un proceso en el que se realizan de manera simultánea la hidrólisis enzimática de la celulosa a glucosa (sacarificación) y la fermentación de esta glucosa a etanol, denominado sacarificación y fermentación simultánea (SFS). Previo a la hidrólisis enzimática, es necesario realizar un pretratamiento de la biomasa lignocelulósica que altere la compleja estructura de este tipo de materiales, facilitando así la acción de los enzimas celulolíticos. En este estudio se utiliza el tratamiento termomecánico de explosión a vapor, en el que la biomasa se somete durante tiempos cortos a una presión y temperatura elevadas, produciéndose a continuación una descompresión brusca en el reactor mediante la cual se descarga el material. De esta manera, se produce una disgregación efectiva del material en sus tres componentes: celulosa, lignina y hemicelulosas.

Un problema asociado al proceso de SFS es la diferente temperatura óptima para la acción de las celulasas y el microorganismo. Puesto que el óptimo de temperatura de actuación de las celulasas está entre 45-50^{o}C, es deseable la utilización de microorganismos termotolerantes en el proceso de SFS de celulosa a etanol. En este estudio, se utiliza la levadura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* CECT 10895, que ha sido descrita y ensayada previamente por los autores en diferentes materiales lignocelulósicos (Ballesteros, *et al.,* 1993, 1998).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materia prima

Las muestras del residuo de la extracción del aceite de oliva en dos fases, fueron suministradas por Oleícola EL TEJAR S.C.L. (Córdoba). En este residuo se diferencian dos fracciones lignocelulósicas: la pulpa formada por la propia pulpa de la aceituna y las aguas de vegetación (71,8% humedad), y el leño formado por las porciones de hueso.

2.2. Pretratamiento por explosión a vapor

El pretratamiento de explosión a vapor se realizó mediante tecnología Masonite en una planta piloto que posee el CIEMAT (Carrasco et al., 1989). El hueso se pretrató a 210^{o}C durante 4 minutos en dos condiciones distintas: sin catalizador y con un catalizador ácido. La temperatura y el tiempo de residencia se seleccionaron teniendo en cuenta la máxima recuperación de celulosa en el residuo tras el pretratamiento y la máxima obtención de glucosa después de 72 h de hidrólisis enzimática. En los experimentos realizados con ácido sulfúrico, 200 g de material seco se impregnaron con 1 litro de una solución ácida (0,5%(p/v) H_2SO_4) durante una hora. Posteriormente se filtró y lavó con agua abundante para eliminar el ácido. La fracción de pulpa no se sometió a pretratamiento ya que en experiencias anteriores (no se muestran los datos), se había comprobado que no aumentaba el rendimiento de hidrólisis.

La instalación piloto está equipada con un reactor de 2 litros de capacidad diseñado para alcanzar una presión de operación máxima de 42 kg/cm^2. El reactor se cargó con 200 g de materia prima y se inyectó vapor saturado hasta alcanzar la temperatura deseada. Una vez transcurrido el tiempo de proceso, el material se descargó de manera súbita en un ciclón, eliminándose los volátiles. A continuación se filtró separándose la fracción líquida de la sólida y se analizaron los carbohidratos en cada una de ellas.

2.3. Hidrólisis enzimática

Para determinar el rendimiento en glucosa se hidrolizaron enzimáticamente muestras de pulpa (previamente lavadas para eliminar los azúcares libres) y del residuo sólido obtenido tras el pretratamiento de los fragmentos de hueso. Se utilizaron diferentes concentraciones de sustrato y cargas de enzima. Se empleó un complejo celulolítico, Celluclast 1.5L, con una actividad de 50 Unidades de Papel de Filtro (UPF) por ml de preparación, comercializado por la firma Novo Nordisk (Bagsvaerd, Dinamarca). La hidrólisis enzimática se realizó en tampón acetato 0,05M pH 4,8, a una temperatura de 50^{o}C durante 72 h en un agitador orbital a 150 rpm.

2.4. Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)

Los ensayos de SFS se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 ml, conteniendo cada uno de

ellos 50 ml de un medio con la siguiente composición (g/l): 2,5 de extracto de levadura, 5 de peptona, 2 de NH4Cl, 1 de KH_2PO_4, 0,3 de $MgSO_4$. Una vez añadidas las concentraciones correspondientes de sustrato (pulpa o fragmentos de hueso) y enzima, los matraces se inoculan con un 10 % (v/v) de un cultivo de la levadura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* CECT 10895 (Ballesteros *et al.,* 1993). Periódicamente se toman muestras y se analiza el contenido en glucosa y etanol según los métodos analíticos que se describen más adelante.

Se realizaron ensayos de SFS utilizando una variación del proceso descrito anteriormente. Para ello, se iniciaron los experimentos de manera similar a la descrita, añadiendo nuevo sustrato 24 horas después del comienzo de la SFS. La mezcla se incubó otras 24 h, tras las cuales se volvió a añadir nuevo sustrato.

Se realizaron 4 experimentos distintos según se describen a continuación:

a) 15 % de pulpa como sustrato inicial + 5 % pulpa + 5 % pulpa
b) 15 % de pulpa como sustrato inicial + 7,5 % pulpa + 7,5 % pulpa
c) 10 % de hueso como sustrato inicial + 10 % hueso + 10 % hueso
d) 10 % de hueso pretratado con ácido como sustrato inicial + 10 % hueso + 10 % hueso

2.5. Métodos analíticos

Para el análisis de la composición de la materia prima (tanto pulpa como hueso) se ha seguido el esquema que se recoge en la Figura 1.

El contenido en cenizas se determinó calcinando la muestra a 575°C durante 5 horas. La muestra se sometió a una extracción orgánica [con una mezcla etanol-tolueno 1:2 (v/v) a reflujo] y posteriormente a una extracción acuosa, siguiendo la metodología estándar para materiales lignocelulósicos (ASTM, 1995). El residuo se analizó de acuerdo con el método descrito por Puls (1985). Para ello, se sometió a una primera hidrólisis con H_2SO_4 al 72% durante 60 minutos y posteriormente a una segunda hidrólisis con H_2SO_4 al 4% durante 60 minutos a 120°C, determinándose el contenido en azúcares por HPLC. Antes del análisis de los azúcares por HPLC, y tras la hidrólisis con sulfúrico, las muestras se pasan a través de una columna rellena con una resina de lecho mixto (DUOLITE MB200) que neutraliza y elimina las sales que interfieren en el análisis con los azúcares. De este análisis se obtuvo el contenido en hemicelulosas (expresado como la suma de xilosa+arabinosa+ galactosa+manosa), celulosa (expresada como glucosa) y lignina Klason, determinándose posteriormente las cenizas.

Figura 1
Esquema de análisis de la composición de la materia prima.

Las actividades enzimáticas se determinaron de acuerdo con los métodos descritos por Ghose (1987). Los azúcares se analizaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en un equipo 10181B de Hewlett Packard con detector de índice de refracción diferencial en las siguientes condiciones: columna AMINEX HPX-87P (BioRad); temperatura 85°C; eluyente, agua a 0,1 ml/min. El contenido en etanol se midió mediante cromatografía de gases, utilizando un equipo 5890 Series II de Hewlett Packard, con detector de ionización de llama y una columna de Carbowax 20 M (2m x 1/8 pulgada) a 95°C.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización y análisis de la materia prima

Los análisis de la fracción de pulpa y hueso se muestran en la Tabla I. Como puede observarse, los extractivos de la fracción de pulpa suponen más del 50% del peso total de la muestra, de los que 6,4 % corresponden a azúcares. Los azúcares hemicelulósicos (13,4 %) están formados mayoritariamente por xilosa (8,4 %). La celulosa y la lignina representan el 15,8 y el 15,2%, respectivamente, del peso seco de la muestra.

La composición de los fragmentos de hueso corresponde a una pared secundaria muy lignificada (29,1 %) rica en celulosa (27,6%) y hemicelulosas (23,5 %) y bajo contenido en sales (0,6 %). El 52% en peso del hueso está formado por carbohidratos. Como se esperaba, el contenido de azúcares hemicelulósicos del hueso es muy alto, supone el 46,5% de la fracción de azúcares. El contenido en celulosa, cercano al 30%, hace de este material un sustrato potencialmente interesante para su utilización como materia prima para la obtención de etanol.

Tabla I
Composición de la fracción de pulpa y hueso obtenidos como residuo tras el proceso de obtención del aceite de oliva por centrifugación en dos fases. Datos expresados sobre peso seco

Composición	Pulpa (%)		Hueso (%)	
Extractivos	53,3		19,2	
Azúcares libres		6,4		0,5
Hemicelulosa	13,4		23,5	
Xilosa		8,4		20,6
Arabinosa		2,5		1,5
Galactosa		1,0		1,0
Manosa		1,5		0,4
Celulosa como glucosa	15,8		27,6	
Lignina Klason	15,2		29,1	
Cenizas	2,3		0,6	

3.2. Pretratamiento mediante el proceso de explosión a vapor

En el pretratamiento de los fragmentos de huesos (Tabla II) se recupera el 60% del material. Del análisis de los resultados de la composición de la fracción sólida se observa que, durante el tratamiento sin catalizador se solubiliza un 12% de la celulosa (expresada como glucosa) y un 75% de la hemicelulosas. Cuando se utiliza ácido sulfúrico como catalizador se solubiliza un 16% de la celulosa y un 82% de hemicelulosas. La mayor parte de la glucosa solubilizada se degrada a otros productos durante el pretratamiento con y sin catalizador (94%), no apareciendo casi glucosa libre en la fracción líquida. En cuanto a los azúcares hemicelulósicos, el 24% de los solubilizados se degrada en el tratamiento sin catalizador y un 26% cuando se utiliza ácido sulfúrico.

Tabla II
Composición de la fracción sólida y líquida obtenida tras el pretratamiento del hueso (explosión a vapor: 210°C, 4 minutos). Datos expresados sobre peso seco

Composición	Sin catalizador		0,5%(p/v) H_2SO_4	
	Líquido (g/100g materia prima)	Sólido (%)	Líquido (g/100g materia prima)	Sólido (%)
Glucosa	0,21	40,5	0,28	42,3
Xilosa	13,40	9,8	14,19	7,7
Galactosa	0,63	0	0,71	0
Arabinosa	0,94	0	1,03	0
Manosa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Recuperación	—	60	—	55

3.3. Hidrólisis enzimática de la celulosa contenida en las fracciones de pulpa y hueso

Con objeto de establecer la susceptibilidad de la celulosa de la fracción de pulpa y hueso al ataque enzimático, muestras de estas fracciones, sin ningún tratamiento previo, se sometieron a una serie de ensayos de hidrólisis enzimática utilizando un complejo celulolítico comercial (Celluclast 1.5L), estudiando distintas concentraciones de sustrato y enzima.

En la pulpa (Tabla III), los rendimientos de hidrólisis enzimática no varían al aumentar la concentración de sustrato. Tampoco se producen variaciones en el rendimiento utilizando cargas de enzima de 7,5 y 15 FPU/g sustrato, produciéndose un incremento en los rendimientos a concentraciones de 30 FPU/g sustrato. Los rendimientos de hidrólisis están entre el 40 y el 50%, lo que podría considerarse dentro de los valores medios obtenidos para otros tipos de materiales con alto contenido en hemicelulosas como pueden ser las maderas blandas (Ballesteros *et al.*,

Tabla III
Hidrólisis enzimática de la fracción de pulpa sin pretratar a diferentes concentraciones y cargas de enzima. El rendimiento se expresa como la glucosa obtenida en la hidrólisis enzimática dividida por la glucosa potencial en la materia prima

Sustrato (%)	Enzima FPU/g sustrato	Glucosa potencial * (g/l)	Glucosa liberada (g/l)	Rendimiento (%)
5	7,5	7,9	3,0	38
	15	7,9	3,0	38
	30	7,9	3,6	45
10	7,5	15,8	6,7	42
	15	15,8	6,8	43
	22,5	15,8	6,2	39
	30	15,8	8,3	52
15	7,5	23,7	10,4	44
	15	23,7	10,8	46
	30	23,77	11,6	49
20	7,5	31,6	12,2	39
	15	31,6	12,5	39
	30	31,6	13,7	43

* No se ha tenido en cuenta la glucosa libre presente en la pulpa.

Tabla IV

Hidrólisis enzimática de la fracción de hueso pretratada (con y sin catalizador) utilizando una concentración inicial de sustrato del 10% (p/v) y una carga de enzima de 15 UPF/g sustrato

CONDICIONES (210 ^{0}C, 4 min.)	Glucosa potencial (g/l)	Glucosa liberada (g/l)	Rendimiento (%)
SIN CATALIZADOR	40,5	16,4	40
CON CATALIZADOR	42,3	22,3	53

2000, Aguilera y San Martin, 1985). Debido al bajo contenido en celulosa que presenta la pulpa, se libera poca glucosa durante la hidrólisis enzimática y son necesarias altas cargas iniciales de sustrato (por encima del 15%) para que puedan obtenerse concentraciones de glucosa superiores a 10 g/l. Otros autores (Abdi et al., 2000) han realizado ensayos de sacarificación en el residuo sólido procedente de la extracción de aceite de oliva obteniendo rendimientos similares de hasta el 50%.

En cuanto a la fracción de hueso, no se produce hidrólisis enzimática cuando se utiliza el hueso sin pretratar (no se muestran los datos). De hecho, el material permanece intacto después del pretratamiento, lo que reduce enormemente la accesibilidad del enzima a la celulosa contenida en los huesos. Los resultados de hidrólisis enzimática de la fracción de hueso sometida al pretratamiento de explosión a vapor (según las condiciones que se detallan en el apartado de parte experimental), utilizando un 10% (p/v) de concentración de sustrato y una carga de enzima de 15 FPU/g sustrato, se muestran en la Tabla IV. De su análisis podemos concluir que la utilización de ácido sulfúrico como catalizador durante el pretratamiento de explosión a vapor aumenta la eficiencia de hidrólisis enzimática posterior. La penetración del ácido dentro de la estructura del hueso produce una hidrólisis más efectiva de los grupos acetilos de los xilanos (Ropart *et al.*, 1992), lo que a su vez facilita el acceso de las enzimas a las fibras de celulosa.

3.4. Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)

Los resultados de los ensayos de SFS utilizando la pulpa sin tratar y los fragmentos de huesos pretratados se muestran en las Tablas V y VI, respectivamente. Los rendimientos del proceso de SFS se calculan dividiendo la concentración de etanol (g/l) por la glucosa potencial 8 (g/l). Este parámetro engloba el rendimiento de la etapa de hidrólisis y el de la etapa de fermentación. Como no es posible distinguir experimentalmente entre ambos rendimientos, se ha considerado 0,49 como el valor máximo para el rendimiento de fermentación (que sería un poco más bajo del 0,51 teórico ya que el microorganismo utiliza parte de la glucosa en un metabolismo oxidativo. A partir de este rendimiento de fermentación, es posible deducir el rendimiento de hidrólisis enzimática en el proceso de SFS. Por ejemplo, con un 15% de sustrato y 15 FPU de enzima el rendimiento de hidrólisis es 45% (Tabla III), lo que equivale a 10,4 g/l de glucosa. En el proceso de SFS con la pulpa en las mismas condiciones se obtiene 0,34 de rendimiento, es decir de los 10,4 g/l de glucosa podríamos obtener 5,1 g/l de etanol, y en cambio en las pruebas reales obtenemos 8,1 g/l (Tabla V). Esto quiere decir, que al obtener más etanol que el esperado, tiene que haber aumentado la hidrólisis enzimática. Este aumento en el rendimiento de hidrólisis es la mayor ventaja del proceso de SFS.

Tabla V

Efecto de la concentración de sustrato inicial (pulpa sin pretratar) sobre el proceso de SFS. Carga de enzima: 15 FPU/g sustrato

Sustrato (%)	Etanol (g/l)	Glucosa potencial (g/l)	Rendimiento SSF	% del Rendimiento Teórico
5	8,1	23,7	0,34	66,6
20	10,5	31,6	0,33	64,7
25	11,8	39,5	0,30	58,9

Tabla VI

Efecto de la concentración inicial de sustrato (hueso pretratado) sobre el proceso de SFS. Carga de enzima: 15 FPU/g sustrato

Pretratamiento (210^{0}C, 4 min)	Sustrato (%)	Glucosa potencial (g/l)	Etanol (g/l)	Rto. SSF	% Rto. teórico
Sin	10	40,5	7,8	0,19	37,2
catalizador	20	81,0	14,5	0,18	35,3
0,5 % (p/v)	10	42,3	12,9	0,30	58,8
H_2SO_4	20	84,6	17,9	0,21	41,2

En los ensayos con pulpa, los rendimientos de SFS disminuyen al aumentar la concentración de sustrato. Esto se debe principalmente a una disminución del rendimiento en la etapa de fermentación y no de hidrólisis ya que, como se muestra en la Tabla III, los rendimientos de hidrólisis no se ven afectados por el incremento en la concentración de sustrato.

Tabla VII
Experimentos de sacarificación y fermentación simultáneas con adición secuencial de sustrato

Sustrato	Concentración de sustrato (%)	Etanol (g/l)	Glucosa Potencial (g/l)	Glucosa residual (g/l)	Rto. SSF	% Rto. Teórico
Pulpa	25 (15+5+5)	15,5	39,5	2,1	0,39	76,5
Pulpa	30 (15+7,5+7,5)	18,6	47,4	6,3	0,39	76,5
Hueso	30 (10+10+10)	17,5	121,5	56,2	0,14	28,2
Hueso*	30 (10+10+10)	19,7	126,9	63,2	0,16	31,4

*Huesos impregnados con 0.5 % (p/v) H_2SO_4 antes del pretratamiento de explosión a vapor.

Este hecho puede estar relacionado con la presencia de sustancias fenólicas en la pulpa, que a una mayor concentración, resultan tóxicas para el microorganismo (Rodriguez, M. et al., 1988). Los mejores rendimientos de SFS, cuando se utiliza pulpa sin pretratar, se obtienen con una concentración inicial de sustrato de 15 %. Los valores obtenidos están en el rango de los obtenidos en otros materiales lignocelulósicos utilizando Celluclast 1,5L y la levadura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* CECT 10895 (Ballesteros *et al.*, 1994, 1998). No se han encontrado referencias bibliográficas de datos de producción de etanol utilizando como sustrato las fracciones residuales de la extracción de aceite de oliva.

Análogamente a los experimentos con la pulpa, el rendimiento de hidrólisis aumenta en el proceso de SFS en comparación con la hidrólisis que no está acoplada a la fermentación. Asimismo, el rendimiento en etanol utilizando hueso pretratado decrece cuando se aumenta la concentración de sustrato inicial (Tabla VI). Los mejores resultados se obtienen cuando se utiliza un 10 % de hueso pretratado con ácido sulfúrico.

El hecho de que tanto en la pulpa como en el hueso se necesiten bajas concentraciones de sustrato para conseguir los máximos rendimientos de SSF, implica que la concentración de glucosa susceptible de transformación a etanol sea baja. En consecuencia, es necesario optimizar las condiciones del ensayo de SFS con el fin de proporcionar una concentración de sustrato adecuada, que a su vez sea compatible con un elevado rendimiento del proceso. Para ello se ensayó la adición secuencial de sustrato en intervalos de 24 horas, cuyos resultados se muestran en la Tabla VII. En los ensayos con la pulpa se obtienen mejores rendimientos (76,5 %) cuando el sustrato se añade a intervalos de 24 h que cuando se añadía todo el sustrato al comienzo del proceso (58,9 %), por lo que en el caso de utilizar esta fracción sería recomendable este patrón de adición. Por el contrario, en los experimentos con los fragmentos de huesos, la adición secuencial de sustrato no mejora los rendimientos obtenidos en los ensayos en que todo el sustrato se añadía al comienzo del proceso, observándose un claro efecto inhibitorio a concentraciones de sustrato del 30%. En este sentido, es muy significativo el alto contenido de glucosa residual, alrededor de 60 g/l, determinado en el medio de ensayo una vez terminado el proceso de SFS.

4. CONCLUSIONES

Considerando la composición en azúcares fermentables de la pulpa y los fragmentos de huesos y el rendimiento obtenido en el pretratamiento y el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas, se puede concluir que los subproductos generados en la extracción del aceite de oliva por el proceso de centrifugación en dos fases son materias primas adecuadas para la producción de etanol.

El esquema más adecuado para obtener etanol de la pulpa consiste en un proceso de SFS con alimentación secuencial utilizando pulpa sin pretratar cada 24 horas con el siguiente patrón: 15% + 7,5% + 7,5%. En estas condiciones se puede obtener 1 litro de etanol por cada 9 kg de pulpa seca.

Con respecto a los fragmentos de hueso, el pretratamiento por explosión a vapor, previa impregnación con ácido sulfúrico, mejora los rendimientos del proceso de SFS. Concentraciones de sustrato superiores al 20% no son adecuadas ya que se observa una fuerte inhibición en la producción de etanol. Las mejores condiciones para realizar el proceso de SFS son 10 % de fragmentos de huesos pretratados con ácido y una carga de enzima de 15 FPU/g de sustrato. En estas condiciones puede obtenerse 1 litro de etanol por cada 6 kg de hueso pretratado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología la financiación de este trabajo (Proyecto nº. 1FD97-0449-C02-02).

BIBLIOGRAFÍA

Abdi, N., Hamdache, A., Belhocine, D., Grib, H., Lounici, H., Piron, D.L., y Mameri, N. (2000). Enzymatic

sachharification of solid residue of olive mill in a batch reactor. *Biochemical Engineering Journal,* **6**, 177-183.

Alba Mendoza J., Hidalgo Casado, F., Ruiz Gómez, Mª A., Martínez Román, F., Moyano Pérez, Mª J., Cert Ventulá, A., Pérez Camino, Mª C. y Ruiz Méndez, Mª V. (1996). Características de los aceites de oliva de primera y segunda centrifugación. *Grasas y Aceites* **47**, 163-181.

Aguilera., J.M. y San Martín, R. (1985). Steam explosion of pine (*Pinus radiata*) sawdust. *Biomass* **8**, 301-313.

ASTM (1995). Designations D1107-84, D1110-84, D1106-84. En: *Annual Book of ASTM Standards*. Vol. **04.10** American Society for Testing and Materials. Philadelphia.

Ballesteros, I., Oliva, J.M., Ballesteros, M. y Carrasco J. (1993). Optimization of the simultaneous saccharification and fermentation process using thermotolerant yeasts. *Appl. Biochem. Biotech*. **39/49**, 201-211.

Ballesteros, I., Ballesteros, M., Oliva, J.M. y Carrasco, J. (1994). Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of pretreated woody biomasses. En: *Biomass for Energy, Environ. Agric. Ind.* Ed. Chartier, Ph., Beenackers, A.A.C.C. y G. Grassi, Pergamon Press, 1953-1958.

Ballesteros, I., Oliva, J.M., Carrasco, J., Cabañas, A., Navarro, A.A. y Ballesteros, M. (1998). Effect of surfactants and zeolites on simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded poplar biomass to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70/72**, 369-381.

Ballesteros, I., Oliva, J.M., Navarro, A.A., Gonzalez, A., Carrasco, J. y Ballesteros, M. (2000). Effect of chip size on steam explosion pretreatment of softwood. *Appl. Biochem. Biotechnol*. **84/86**, 97-110.

Carrasco, J.E., Martínez, J.M., Negro, M.J., Manero, J., Mazón, M.P., Sáez, F. y Martín, C. (1989). Evaluation of steam explosion as pretreatment for dilute acid and enzymatic hydrolysis of sweet shorgum bagasse. En: *Biomass for Energy and Industry, 5th Conference*. Eds: G. Grassi, G. Gosse, G. Dos Santos. Elsevier Appl. Sci. Essex (England) vol **2**, 38-44.

Fernández-Bolaños, J., Felizón, B., Brenes, M., Guillén, R., y Heredia, A. (1998). Hydroxytyrosol and tyrosol as the main compounds found in the phenolic fraction of steam-exploded olive stones. *J. Am.Oil Chem. Soc.* **75/11**, 1643-1649.

Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Appl. Chem*. **59:2**, 257-268.

Puls, J., Poutanen, K., Körner, H.V. y Viikari, L. (1985). Biotechnical utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment. *Appl. Microbiol. Biotech*. **22**, 416-423.

Rodriguez, M.M., Pérez, J., Ramos-Cormenzana, A. y Martínez, J. (1987). Effect of extracts obtained from olive mill waste on Bacillus megaterium ATCC 33085. *J. Appl. Bacteriol*, **64**, 219-226.

Ropars, M., Marchal, M., Pourquie, J., Vandecasteele, J.P. (1992). Large-scale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass. Part 1: Pretreatment procedures. *Bioresource Technol*. **42 (3)**, 197-204.

Recibido: Febrero 2001
Aceptado: Noviembre 2001