

Aprovechamiento de la poda de olivar para su bioconversión a etanol y xilitol

Juan Gabriel Puentes Campos

Memoria presentada para la obtención del
TÍTULO DE DOCTOR



UNIVERSIDAD DE JAEN

diciembre, 2019



Universidad de Jaén

Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales

TESIS DOCTORAL

MENCIÓN INTERNACIONAL

Aprovechamiento de la poda de olivar para su bioconversión a etanol y xilitol

Juan Gabriel Puentes Campos
Aspirante al Grado de Doctor

PUENTES
CAMPOS
JUAN GABRIEL
- 53591685Y

Firmado digitalmente por
PUENTES CAMPOS
JUAN GABRIEL -
53591685Y
Fecha: 2019.12.13
16:23:36 +01'00'

DIRECTORES DE LA MEMORIA

SANCHEZ
VILLASCLARA
S SEBASTIAN
- 24838731L

Firmado digitalmente
por SANCHEZ
VILLASCLARA
SEBASTIAN -
24838731L
Fecha: 2019.12.13
17:58:19 +01'00'

Sebastián Sánchez Villasclaras

MOYA LOPEZ
ALBERTO
JOSE -
25995954C

Firmado digitalmente por MOYA
LOPEZ ALBERTO JOSE - 25995954C
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES,
serialNumber=IDCES-25995954C,
givenName=ALBERTO JOSE,
sn=MOYA LOPEZ, cn=MOYA LOPEZ
ALBERTO JOSE - 25995954C
Fecha: 2019.12.13 17:13:46 +01'00'

Alberto J. Moya López

SEBASTIÁN SÁNCHEZ VILLASCLARAS, Catedrático de Universidad y
ALBERTO J. MOYA LÓPEZ, Profesor Titular de Universidad, ambos en el
Área de Ingeniería Química,


CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación “Aprovechamiento de la poda de olivar para su bioconversión a etanol y xilitol” ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén y en el Grupo de Investigación ‘Bioprocesos (TEP 138, Junta de Andalucía)’, bajo la dirección de los Doctores D. Sebastián Sánchez Villasclaras y D. Alberto J. Moya López por D. Juan Gabriel Puentes Campos para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Jaén. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral el Doctorando ha realizado una estancia de investigación, por un período de 3 meses, en los laboratorios del Departamento de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, perteneciente a la Universidad de *São Paulo* (Brasil), bajo la tutela de la Profesora Doctora. D^a Inês Conceição Roberto.

Jaén, diciembre de 2019

Sebastián Sánchez Villasclaras

MOYA
LOPEZ
ALBERTO
JOSE -
25995954C



Firmado digitalmente por
MOYA LOPEZ ALBERTO JOSE -
25995954C
Nombre de reconocimiento
(DN): c=ES,
serialNumber=IDCES-2599595
4C, givenName=ALBERTO
JOSE, sn=MOYA LOPEZ,
cn=MOYA LOPEZ ALBERTO
JOSE - 25995954C
Fecha: 2019.12.13 17:14:20
+01'00'

Alberto J. Moya López

Mi sincero agradecimiento a mis directores Sebastián Sánchez Villasclaras y Alberto J. Moya López.

A Inês Conceição Roberto, por su acertada tutela durante mi estancia de investigación en la Universidad de São Paulo (Brasil).

A las personas que me han aportado su experiencia Dras/es. Soledad Mateo, Rafael Órpez, Manuel Cuevas (Universidad de Jaén), Bruno Guedes, Daniela Cortez y Joao Paulo Silva (Universidad de São Paulo).

A mi familia

A vosotras, Ángela y Alicia.



Índice



1. RESUMEN	1
1. ABSTRACT	7
2. INTRODUCCIÓN	13
2.1. Biomasa lignocelulósica	15
2.1.1. La biomasa.....	15
2.1.2. Residuos lignocelulósicos.....	17
2.1.2.1. Celulosa	20
2.1.2.2. Hemicelulosa	21
2.1.2.3. Lignina	23
2.2. La poda de olivo como subproducto valorizable del olivar	24
2.2.1. El cultivo del olivo	24
2.2.2. La operación de poda	27
2.2.3. Producción y localización	29
2.2.4. Composición	31
2.2.5. Vías de aprovechamiento	32
2.3. Hidrólisis y fermentación de biomasa lignocelulósica	36
2.3.1. Antecedentes	36
2.3.2. Hidrólisis	37
2.3.3. Pretratamiento	38
2.3.4. Hidrólisis ácida.....	42
2.3.4.1. Variables de operación	43
2.3.4.2. Reactores empleados	45
2.3.5. Hidrólisis enzimática	46
2.4. Detoxificación de hidrolizados	50
2.4.1. Métodos físicos	52
2.4.2. Métodos físico-químicos	52
2.4.3. Métodos biológicos	54
2.5. Producción biotecnológica de etanol y xilitol	56
2.5.1. Etanol. Características, propiedades, usos y producción.	56
2.5.2. Xilitol. Características, propiedades, usos y producción.	60
2.5.3. Microorganismos utilizados	64
2.5.3.1. <i>Candida guilliermondii</i>	67
2.5.3.2. <i>Pichia stipitis</i>	69
2.5.4. Rutas metabólicas	71
2.5.5. Control de la producción de etanol y xilitol.....	74
2.5.5.1. Factor sustrato	74
2.5.5.2. Factor microorganismo	83
2.5.5.3. Factor condiciones de operación	84
3. OBJETIVOS	89

4. TÉCNICA EXPERIMENTAL	95
4.1. Reactivos químicos y otros productos utilizados	97
4.2. Descripción de las instalaciones experimentales	100
4.2.1. Instalaciones experimentales de hidrólisis ácida	100
4.2.1.1. Escala de laboratorio	100
4.2.1.2. Escala miniplanta	102
4.2.2. Instalaciones para la concentración de hidrolizados	103
4.2.3. Descripción de las instalaciones experimentales de fermentación	104
4.2.3.1. Fermentación en Erlenmeyer	104
4.2.3.2. Fermentación en biorreactores	105
4.3. Métodos analíticos	110
4.3.1. Caracterización de material lignocelulósico.....	110
4.3.1.1. Humedad y materia volátil.....	110
4.3.1.2. Cenizas	111
4.3.1.3. Lignina.....	111
4.3.1.4. Celulosa y hemicelulosa	112
4.3.1.5. Aplicación del método de Browning y Rocha	114
4.3.2. Caracterización de hidrolizados	117
4.3.2.1. Medida del pH.....	117
4.3.2.2. Determinación de azúcares monoméricos.....	117
4.3.2.3. Determinación de ácido acético.....	123
4.3.2.4. Determinación de furfural e hidroximetilfurfural (HMF)	125
4.3.3. Caracterización de fermentación	127
4.3.3.1. Determinación del crecimiento celular	127
4.3.3.2. Determinación del sustrato	129
4.3.3.3. Determinación de bioproductos.....	129
4.4. Microorganismos utilizados	130
4.4.1. <i>Candida guilliermondii</i>	131
4.4.2. <i>Pichia stipitis</i>	131
4.5. Procedimiento operatorio	133
4.5.1. Muestreo y acondicionamiento de la materia prima	133
4.5.2. Experimentos de hidrólisis ácida a escala de laboratorio	135
4.5.2.1. Variables de estudio y experimentos realizados.....	136
4.5.2.2. Severidad del tratamiento.....	136
4.5.3. Experimentos de hidrólisis ácida a escala miniplanta	139
4.5.4. Acondicionamiento y detoxificación de hidrolizados	140
4.5.5. Fermentación en Erlenmeyer	141
4.5.5.1. Fermentación en medio sintético	141
4.5.5.2. Fermentación de hidrolizados.....	143
4.5.6. Fermentación en biorreactor	143
4.5.6.1. Acondicionamiento de los hidrolizados	143

4.5.6.2. Preparación de inóculo	144
4.5.6.3. Proceso de fermentación	144
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	147
5.1. Caracterización del material de poda de olivar	149
5.2. Hidrólisis	154
5.2.1. Naturaleza del sustrato.....	155
5.2.2. Naturaleza y concentración del agente hidrolítico. Hidrólisis con ácido sulfúrico	158
5.2.2.1. Hidrólisis con ácido sulfúrico sobre material de poda completo ...	158
5.2.2.2. Hidrólisis con ácido sulfúrico sobre material de poda sin hoja.....	164
5.2.3. Naturaleza y concentración del agente hidrolítico. Hidrólisis con ácido clorhídrico	170
5.2.3.1. Hidrólisis con ácido clorhídrico sobre material de poda completo	170
5.2.3.2. Hidrólisis con ácido clorhídrico sobre material de poda sin hoja ..	176
5.2.4. Efecto del tipo de ácido.....	181
5.2.4.1. Influencia del tipo de ácido sobre el material de poda completo ...	181
5.2.4.2. Influencia del tipo de ácido sobre el material de poda sin hoja	183
5.2.5. Generación de compuestos inhibidores	185
5.2.5.1. Generación de compuestos fenólicos totales (CFT)	185
5.2.5.2. Generación de ácido acético	187
5.2.5.3. Generación de furanos	190
5.3. Fermentación.....	194
5.3.1. Selección y acondicionamiento de los hidrolizados hemicelulósicos	194
5.3.1.1. Hidrolizado de poda de olivar	194
5.3.1.2. Hidrolizado de poda de olivar sin hoja.....	196
5.3.1.3. Acondicionamiento de los hidrolizados	197
5.3.2. Selección de la levadura y medio de cultivo.....	199
5.3.2.1. <i>Candida guilliermondii</i>	209
5.3.2.2. <i>Pichia stipitis</i>	218
5.3.3. Fermentaciones en biorreactor tipo tanque agitado con <i>C. guilliermondii</i> .	224
5.3.3.1. Concentración inicial de inóculo	224
5.3.3.2. Efecto del nivel de aeración.....	231
5.3.3.3. Fermentación de hidrolizados con poda completa	234
6. CONCLUSIONES	237
6. CONCLUSIONS	245
NOMENCLATURA	253
REFERENCIAS.....	263

APÉNDICE 1. LEYENDAS DE LAS TABLAS 2.25 Y 2.26	303
AP1.1. Leyenda de la Tabla 2.25. Estudios de fermentación con diferentes cepas de <i>C. guilliermondii</i>	305
AP1.2. Leyenda de la Tabla 2.26. Estudios de fermentación con diferentes cepas de <i>P. stipitis</i>	309
APÉNDICE 2. DATOS PRIMARIOS DE HIDRÓLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA	313
AP2.1. Caracterización de la biomasa	315
AP2.2. Hidrólisis de poda de olivar completa	317
AP2.2.1. Tratamientos térmicos	317
AP2.2.2. Experimentos realizados con HCl	324
AP2.2.3. Experimentos realizados con H ₂ SO ₄	346
AP2.3. Hidrólisis de poda de olivar sin hoja	368
AP2.3.1. Experimentos realizados con HCl	368
AP2.3.2. Experimentos realizados con H ₂ SO ₄	386
AP2.4. Cálculo de severidades	404
AP2.4.1. Material de poda de olivar completa	404
AP2.4.2. Material de poda de olivar sin hoja	407
APÉNDICE 3. DATOS PRIMARIOS DE FERMENTACIÓN	409
AP3.1. Selección de la levadura <i>C. guilliermondii</i>	411
AP3.1.1. Ensayos con diferentes medios de cultivo	411
AP3.1.2. Plan experimental	413
AP3.1.3. Influencia del pH	418
AP3.1.4. Influencia de la concentración inicial de inóculo	420
AP3.1.5. Fermentación en biorreactor tipo tanque agitado	422
AP3.1.5.1. Tabla de resultados	422
AP3.1.5.2. Cálculo del K ₂ a	423
AP3.2. Selección de la levadura <i>P. stipitis</i>	424
AP3.2.1. Ensayos con diferentes medios de cultivo	424
AP3.2.2. Plan experimental	427
AP3.2.3. Influencia del pH	432
AP3.2.4. Influencia de la concentración inicial de inóculo	434
AP3.3 Fermentaciones en condiciones controladas con <i>C. guilliermondii</i>	436
AP3.3.1. Utilizando hidrolizado de poda de olivar sin hoja	436
AP3.3.2. Utilizando hidrolizado de poda de olivar completa	447

CAPÍTULO



Resumen

1

En esta Memoria se describen los trabajos de investigación realizados con objeto del aprovechamiento por vía bioquímica de la biomasa generada durante la operación de poda de olivar. Este trabajo está ligado al Programa de Doctorado en Aceites de Oliva por la Universidad de Jaén y se ha desarrollado mayormente en las dependencias del Dpto. de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de dicha Universidad y, a través de una estancia de investigación, en las dependencias del Dpto. de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, perteneciente a la Universidad de *São Paulo* (Brasil).

Las dos grandes etapas en las que puede dividirse este estudio son: hidrólisis ácida y fermentación de material lignocelulósico procedente de poda de olivar completa y poda de olivar deshojada. El primer proceso es de suma importancia de cara al estudio del fraccionamiento de la hemicelulosa, heteropolímero que proporcionará la fuente de carbono necesaria, principalmente D-glucosa y D-xilosa, para el desarrollo del subsiguiente proceso. En consonancia, la obtención de bioproductos, etanol y xilitol, a partir de los hidrolizados generados, es el objetivo de las fermentaciones realizadas. En este sentido, se han empleado dos levaduras mesófilas, por un lado *P. stipitis* NRRL Y-7124, considerada como buena productora de etanol, y por otro *C. guilliermondii* FTI 20037, reportada como buena productora de etanol y xilitol.

Previamente, al desarrollo de los experimentos de hidrólisis, se realizó un acondicionamiento físico del material (secado, molienda y clasificación). Los procesos de hidrólisis se han desarrollado en dos fases, en la primera se utilizó material de poda sin hoja, que se sometió a tratamientos hidrotérmicos y de hidrólisis ácida (empleando HCl y H₂SO₄). Los tratamientos realizados con agua caliente se llevaron a cabo fijando temperaturas entre 75 y 95 °C y tiempos de ensayo entre 0 y 240 min; en todos los casos las conversiones poliméricas fueron muy bajas. En los experimentos de hidrólisis ácida se modificó el tiempo de operación entre 0 y 240 min, la temperatura entre 75 y 95 °C y la concentración de ácido (HCl y H₂SO₄) desde 0,1 a 1,0 N, encontrando cómo la solubilización completa de la hemicelulosa se obtiene para valores de Log R₀ altos (2,88 – 3,34). En la segunda fase se utilizó material de poda sin hoja y las variables de operación fijadas fueron más severas (tiempos de ensayo de 240 min, temperaturas entre 85 y 100 °C, y concentración de ácidos entre 0,5 y 2,0 N) y como es lógico, el número de experimentos en lo que se consigue solubilizar totalmente la hemicelulosa (Log R₀ entre 2,97 – 3,69) es mayor que en la primera etapa.

Los hidrolizados se caracterizaron en monosacáridos, a través de sus respectivos rendimientos, y también en compuestos capaces de inhibir o dificultar el crecimiento de las levaduras. En este sentido, para mejorar la economía del proceso y con objeto de obtener hidrolizados fermentables con altos rendimientos en azúcares, se debe llegar a un compromiso entre altos rendimientos en monosacáridos y baja concentraciones de inhibidores. Esta premisa condujo a la elección de dos hidrolizados, el primero a partir de poda con hoja, obtenido a 240 min, empleando 1 N de H₂SO₄ y 95 °C, y en el que se alcanzan rendimientos al final del experimento de 16 % en D-glucosa y del 10 % en D-xilosa. En el segundo experimento, a partir de poda sin hoja, a 180 min, con H₂SO₄ 0,5 N y 100 °C, se alcanzaron rendimientos del 16 % en D-xilosa y 10 % en D-glucosa.

En los laboratorios de la Escuela de Ingeniería de Lorena (Brasil), se realizaron una serie de fermentaciones, con las dos levaduras mencionadas, con objeto de obtener información respecto al comportamiento de estas sobre el hidrolizado de poda de olivar. Se utilizó hidrolizado de poda sin hoja por su menor carga en inhibidores y se pudieron comprobar varias cosas. En primer lugar, en relación a los nutrientes suplementados, los propuestos por Lindegren *et al.* (1958) al 50 %, Cuevas (2007), ofrecen los mejores resultados en cuanto a rendimiento global en bioproductos (los valores máximos alcanzados con *C. guilliermondii* fueron de $Y_{E/s}^G = 0,38 \text{ kg kg}^{-1}$ y $Y_{X/s}^G = 0,46 \text{ kg kg}^{-1}$). En segundo lugar, se pone de manifiesto la dificultad de *P. stipitis* para fermentar el hidrolizado, necesitando de una etapa de detoxificación (en este trabajo se realizó una detoxificación con carbón activo). En tercer lugar, puede notarse como ambas levaduras poseen mayor especificidad por D-glucosa, siendo el primer monosacárido en ser consumido. Finalmente, una vez analizadas las principales variables capaces de afectar la producción biotecnológica de etanol y xilitol (concentración inicial de inóculo, composición del medio de cultivo, condiciones de aeración o pH inicial del medio de cultivo), se realizó una fermentación en biorreactor de bancada utilizando *C. guilliermondii*. En este experimento los rendimientos globales en bioproductos alcanzados fueron: $Y_{E/s}^G = 0,28 \text{ kg kg}^{-1}$ y $Y_{X/s}^G = 0,37 \text{ kg kg}^{-1}$; las condiciones del proceso fueron: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ °C}$, $\text{pH} = 5,5$, $\text{AE} = 0,4 \text{ vvm}$, $A = 350 \text{ rpm}$, $K_{La} = 17 \text{ h}^{-1}$.

Finalmente, debido a la dificultad de *P. stipitis*, para fermentar el hidrolizado sin hoja, en los laboratorios del Dpto. de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén, se realizaron series en biorreactor, tipo tanque agitado, utilizando

solo *C. guilliermondii*. En este sentido, se realizaron diferentes series experimentales para analizar tanto la influencia de la aeración, como de la concentración inicial de inóculo. Para llevar a cabo estas series se empleó hidrolizado sin hoja, aunque finalmente, en vistas de los resultados obtenidos, se utilizó hidrolizado procedente de material de poda con hoja. El experimento en el que se alcanzan los rendimientos más elevados ($Y_{E/s}^G = 0,45 \text{ kg kg}^{-1}$ y $Y_{xi/s}^G = 0,67 \text{ kg kg}^{-1}$) fue el realizado con hidrolizado obtenido a partir de poda sin hoja, bajo las siguientes condiciones de operación: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$, $\text{AE} = 0,15 \text{ vvm}$, $A = 250 \text{ rpm}$.

CHAPTER



Abstract

1

Olive tree pruning biomass biochemical treatment is described in this research work. This biomass is generated year after year during the agricultural work applied mainly on braches and leaves. This Thesis Memory is linked to 'Olive Oils' Doctorate Program from University of Jaen and it have been realized mainly in the Department of Chemical, Environment and Materials Engineering laboratories and also, through a research stay, in the Department of Biotechnology of the Lorena School of Engineering, belonging to the University of São Paulo (Brazil).

This study can be divided in two main stages: acid hydrolysis and fermentation of lignocellulosic material from pruning biomass with leaves and leafless. The first process is of utmost importance for the study of the fractionation of hemicellulose, a heteropolymer that will provide the necessary carbon source, mainly D-glucose and D-xylose, for the development of the subsequent process. Accordingly, obtaining bioproducts, ethanol and xylitol, from the hydrolysates generated, is the main objective of the fermentations carried out. In this sense, two mesophilic yeasts have been used, on the one hand *P. stipitis* NRRL Y-7124, considered as a good ethanol generator, and on the other hand, *C. guilliermondii* FTI 20037, reported as producer of ethanol and xylitol.

Prior to the development of the hydrolysis experiments, a physical conditioning of the material (drying, grinding and classification) was performed. The hydrolysis processes have been developed in two phases, in the first, leafless pruning biomass was used, and was subjected to hydrothermal and acid hydrolysis treatments (using HCl and H₂SO₄). Hot water treatments were carried out by setting temperatures between 75 and 95 °C and test times between 0 and 240 min; in all cases the polymer conversions were very low. In the acid hydrolysis experiments, the operating time was modified between 0 and 240 min, the temperature between 75 °C and 95 °C and the acid concentration (HCl and H₂SO₄) from 0.1 N to 1.0 N, finding how the complete hemicellulose solubilization, is achieved at high values of Log R₀' (2.88 to 3.34). In the second phase, leafless pruning material was used and the fixed operating variables were more severes (test times of 240 min, temperatures between 85 and 100 °C, and acid concentration between 0.5 N and 2.0 N) and logically, the number of experiments in which the complete solubilization of the hemicellulose (Log R₀' between 2.97 to 3.69) is higher, compared to the first phase.

The hydrolyzates were characterized by calculating the respective monosaccharides yields, and also the concentrations of those compounds capable of inhibiting or hindering the growth of the yeasts. In this sense, in order to improve the economy of the process and to obtain fermentable hydrolysates with high sugars yields, a compromise must be reached between high yields in monosaccharides and low concentrations of inhibitors. This premise led to the choice of two hydrolyzates, the first from pruning with leaf, obtained at 240 min, using H₂SO₄ 1.0 N and 95 °C, and in which yields were 16 % in D-glucose and 10 % in D-xylose. In the second experiment, from leafless pruning material, at 180 min, with H₂SO₄ 0.5 N and 100 °C, yields of 16 % in D-xylose and 10% in D-glucose were achieved.

In the laboratories of the Engineering School of Lorena (Brazil), a series of fermentations were carried out, with the two yeasts mentioned, in order to obtain information regarding the behaviour of these on the olive pruning hydrolyzate. Leafless pruning hydrolyzate was used because of its lower inhibitor loading and several conclusions could be checked. First, in relation to supplemented nutrients, those proposed by Lindegren et al. (1958) at 50%, Cuevas (2007), offer the best results in terms of overall performance in bioproducts (the maximum values achieved with *C. guilliermondii* were $Y_{E/s}^G = 0.38 \text{ kg kg}^{-1}$ and $Y_{Xl/s}^G = 0.46 \text{ kg kg}^{-1}$). Secondly, the difficulty of *P. stipitis* to ferment the hydrolyzate is revealed, needing a detoxification stage (in this work an active carbon detoxification was performed). Thirdly, it can be seen how both yeasts have greater specificity for D-glucose, being the first monosaccharide to be consumed. Finally, once analysed the main variables capable of affecting the biotechnological production of ethanol and xylitol (initial inoculum concentration, composition of the culture medium, aeration conditions or initial pH of the culture medium), fermentation was carried out in a bench bioreactor using *C. guilliermondii*. In this experiment, the overall yields in bioproducts reached were: $Y_{E/s}^G = 0.28 \text{ kg kg}^{-1}$ and $Y_{Xl/s}^G = 0.37 \text{ kg kg}^{-1}$; the process conditions were: $x_0 = 2.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ °C}$, $\text{pH} = 5.5$, $\text{AE} = 0,4 \text{ vvm}$, $A = 350 \text{ rpm}$, and $K_{La} = 17 \text{ h}^{-1}$.

Finally, due to the difficulty of *P. stipitis* to ferment leafless hydrolyzate, in the laboratories of the Department of Chemical, Environmental and Materials Engineering of the University of Jaén, some experiments were carried out in bioreactor, stirred tank type, using only *C. guilliermondii*. In this sense, different experimental series were carried

out to analyse both the influence of the aeration and the initial concentration of inoculum. To carry out these series, leafless hydrolyzate was used, although finally, in view of the results obtained, hydrolyzate from pruning material with leaves was used. The experiment in which the highest yields are reached ($Y_{E/s}^G = 0.45 \text{ kg kg}^{-1}$ and $Y_{X_i/s}^G = 0.67 \text{ kg kg}^{-1}$) was the one carried out with hydrolyzate obtained from pruning without leaf, under the following operating conditions: $x_0 = 2.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5.5$, $\text{AE} = 0.15 \text{ vvm}$, and $A = 250 \text{ rpm}$.

CAPÍTULO



Introducción

2

2.1. Biomasa lignocelulósica

2.1.1. La biomasa

La biomasa vegetal y los materiales derivados de esta han sido utilizados por el hombre desde el origen de la especie, acentuándose aún más cuando éste consiguió utilizar el fuego. Desde entonces, la biomasa sigue siendo la mayor fuente de energía disponible, empleándose, además de la madera, otros recursos biomásicos tales como: cultivos energéticos, plantas herbáceas y leñosas, residuos agrícolas y forestales, microalgas y macroalgas ricas en materia grasa y la fracción orgánica de los residuos urbanos e industriales; incluso los gases producidos en vertederos pueden ser usados como fuente para la producción de energía a partir de biomasa, NREL (2013).

El concepto de biomasa ha sido definido por diversos autores, por consiguiente, se pueden encontrar definiciones del concepto según el campo de estudio al que se refiera. Así, y en sentido amplio, conviene citar la definición dada por las Naciones Unidas, “Framework Convention on Climate Change”, NFCCC (2005), *“La biomasa se define como la materia orgánica biodegradable y no fosilizada originada a partir de plantas, animales y microorganismos. También están incluidos productos, bioproductos, residuos y basuras generados en la industria agrícola, forestal o relacionadas; además de las fracciones no fosilizadas y orgánicas biodegradables de basuras industriales y urbanas. La biomasa también incluye los gases y líquidos recuperados a partir de la descomposición de materiales no fosilizados y orgánicos biodegradables”*. Ahora bien, atendiendo al contexto de la biotecnología, se podría definir la biomasa como: *“Toda materia orgánica generada por conversión fotosintética de la energía solar”*.

La biomasa aparece como una energía alternativa a la de origen fósil y ha constituido desde hace años el foco sobre el que se centran múltiples investigaciones científicas, cuyo objetivo es avanzar en la puesta a punto de nuevas tecnologías que permitan la desvinculación del abastecimiento energético a partir de combustibles de origen no renovable.

Por otro lado, Balat (2007) y Demirbas (2008), sostienen que los recursos biomásicos incluyen: residuos madereros y agrícolas y derivados de estos, residuos urbanos, residuos animales, residuos del procesado de alimentos y plantas acuáticas y algas. En este sentido, la energía producida a partir de biomasa se genera en un 64% de residuos madereros, en un 24% de residuos urbanos, en un 5% de residuos agrícolas y en un 5% a partir de gases producidos en plantas de tratamiento de residuos.

La biomasa también puede clasificarse según su origen. Atendiendo a este criterio se puede diferenciar entre: biomasa primaria, secundaria y terciaria. Mientras que la primaria o de calidad es la originada de forma natural (biomasa forestal) o cultivada (cultivos energéticos terrestres o marinos), la secundaria (residuos de la industria agrícola, forestal o animal) y terciaria (residuos urbanos e industriales) se originan a partir de la primaria y presentan carácter residual. Un cuarto grupo correspondería a la biomasa no renovable, es decir, la biomasa fosilizada. Así, la poda de olivar, se encuadraría dentro del grupo de la biomasa secundaria. La Tabla 2.1, muestra una clasificación de la biomasa atendiendo a su origen

Tabla 2.1: Clasificación de la biomasa según su origen.

Seca	Húmeda
Residuos forestales y agrícolas (poda de olivar)	Residuos ganaderos
Residuos industriales (ind. agrícola y maderera)	Residuos industriales biodegradables
Residuos sólidos urbanos	
Biogás de vertederos	

2.1.2. Residuos lignocelulósicos

Actualmente, existe una gran controversia por la deriva de biomasa de calidad alimentaria para su uso energético. Esto conlleva a grandes problemas socioeconómicos en cuanto al encarecimiento de precios de materias de primera necesidad. En efecto, este acontecimiento ha supuesto el tema central de numerosas convenciones e investigaciones y merece ser tratado en profundidad con objeto de paliar los efectos negativos sobre el desarrollo social. En este sentido, Naik *et al.* (2010), sostienen que para paliar los efectos negativos de la competencia entre los biocombustibles generados a partir de alimentos y los propios alimentos, debería optarse por la producción de biocombustibles derivados de material lignocelulósico (biomasa residual), aunque para conseguir este objetivo debería desarrollarse la tecnología adecuada.

Desde hace años, ha habido un creciente interés científico hacia el uso de biomasa lignocelulósica como materia de partida para producir biocombustibles y productos químicos, Galbe y Zacchi (2002). Los materiales lignocelulósicos constituyen la mayor fuente de biomasa del planeta y comprenden: residuos forestales y agrícolas, residuos sólidos urbanos y derivados del papel. La característica fundamental de esta abundante y económica materia prima es su composición, pudiendo diferenciar entre tres compuestos macromoleculares como son: celulosa (CEL) y hemicelulosa (HEM), dos polisacáridos unidos a un tercer polímero de carácter fenólico como es la lignina (LIG), Olsson y Hahn-Hägerdal (1996), Palmqvist y Hahn-Hägerdal (2000), Pérez *et al.* (2002).

En la composición de estos residuos también se pueden incluir pectinas, glicoproteínas, suberina y cutina. Además pueden encontrarse compuestos de bajo peso molecular como son: las cenizas, de carácter inorgánico, y los extractos. Estos últimos son compuestos solubles en disolvente orgánicos neutros, representan una fracción entorno al 1-5 % del material y pueden ser clasificados en: terpenoides y esteroides, grasas y ceras, fenoles y, componentes inorgánicos, Tahezardeh y Karimi (2007a).

Uno de los principales inconvenientes del aprovechamiento conjunto de este tipo de materiales es la heterogeneidad composicional, Tabla 2.2, por lo que cada material, debido a su diferente origen, debe ser caracterizado específicamente para poder darle un aprovechamiento adecuado. Por otra lado, ha de tenerse en cuenta que la producción de estos materiales es generalmente estacional, lo que podría suponer problemas de almacenamiento para un uso prolongado. Finalmente, existe el problema de la localización de este tipo de biomasa, ya que su dispersión influye directamente sobre los costes de aprovisionamiento, Moya (1997).

Tabla 2.2: Composición de diferentes materiales lignocelulósicos.

Material	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Referencias
Bagazo de caña de azúcar	32 - 44	27 - 32	19 - 24	Rowel <i>et al.</i> (1992)
Mazorca de maíz	38 - 45	25 - 35	15 - 22	Howard <i>et al.</i> (2003), Cherubini <i>et al.</i> (2010)
Paja de trigo	29 - 35	26 - 32	16 - 21	Howard <i>et al.</i> (2003), Cherubini <i>et al.</i> (2010)
Paja de arroz	32 - 47	19 - 27	5 - 24	Maiorella <i>et al.</i> (1985), Garrote <i>et al.</i> (2002a), Saha (2003), Zhu <i>et al.</i> (2005),
Carrizo	35	23	20	Scordia <i>et al.</i> (2012)
Pino	42 - 50	19 - 22	25 - 30	Aguilera <i>et al.</i> (1985), Sannigrahi <i>et al.</i> (2010)
Eucalipto	44 - 46	17 - 19	23 - 28	Garrote <i>et al.</i> (2007), Romaní <i>et al.</i> (2010)
Poda de olivar	30 - 32	18 - 27	15 - 18	Mateo (2011)
Poda de olivar sin hoja	36 - 39	22 - 26	14 - 17	García (2007)
Maderas duras	40 - 55	20 - 40	16 - 25	Malherbe <i>et al.</i> (2002), Howard <i>et al.</i> (2003), Moshkelaniet <i>al.</i> (2013)
Maderas blandas	45 - 50	15 - 35	23 - 35	Malherbe <i>et al.</i> (2002), Howard <i>et al.</i> (2003), Moshkelani <i>et al.</i> (2013)

El aprovechamiento de los materiales lignocelulósicos puede realizarse mediante diferentes tecnologías, Seidur *et al.* (2011), que podrían resumirse en: combustión, gasificación, pirolisis, licuefacción, extracción, digestión y, por último, hidrólisis y fermentación, Figura 2.1. Según esta última vía bioquímica, las fracciones hemicelulósica y celulósica pueden ser hidrolizadas por la acción de ácidos y enzimas para producir soluciones de pentosas y hexosas fermentables, Palmqvist y Hahn Hägerdal (2000), Jensen *et al.* (2010), para la producción de bioproductos tales como etanol y xilitol. En la presente memoria se trata esta vía de aprovechamiento para el caso de la poda de olivar.

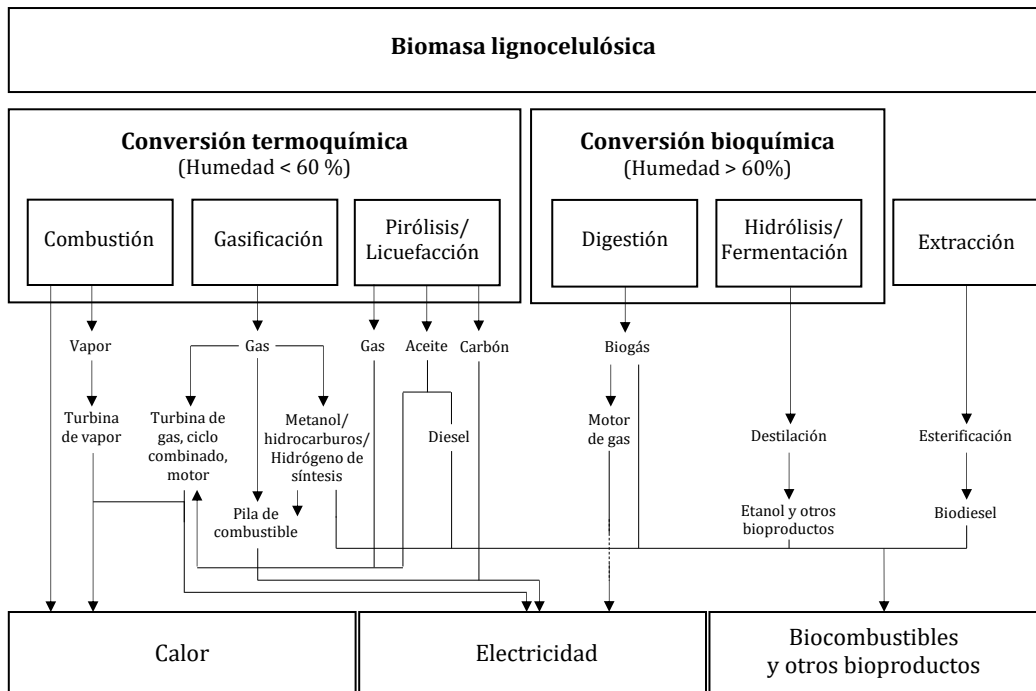


Figura 2.1: Tecnologías para el aprovechamiento de material lignocelulósico, adaptado de Seidur *et al.* (2011).

2.1.2.1. Celulosa

La celulosa, Figura 2.2, es el principal componente de la pared celular de las plantas verdaderas. Esto último unido a la abundancia de material vegetal, hace que la celulosa sea el mayor compuesto orgánico sobre la Tierra, Henriksson y Lennholm (2009). En este sentido, es el compuesto mayoritario en los materiales lignocelulósicos (60 %), seguido de la hemicelulosa (15-35 %) y la lignina (5-25 %), Moya (1997).

Se trata de un polímero lineal compuesto por subunidades de D-glucosa unidas mediante enlace β -1,4 glucosídico formando dímeros denominados celobiosa. Estas dímeros forman largas cadenas, denominadas fibrillas elementales que se unen unas a otras mediante puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals para formar fibrillas, Sánchez (2009). Estas fibrillas poseen zonas en las que las cadenas glucánicas están organizadas en una estructura altamente ordenada, de tal manera que son rígidas e insolubles, se denominan zonas cristalinas, y están encajadas en una fase amorfa, una matriz compuestas por el resto de componentes, Mateo (2011).

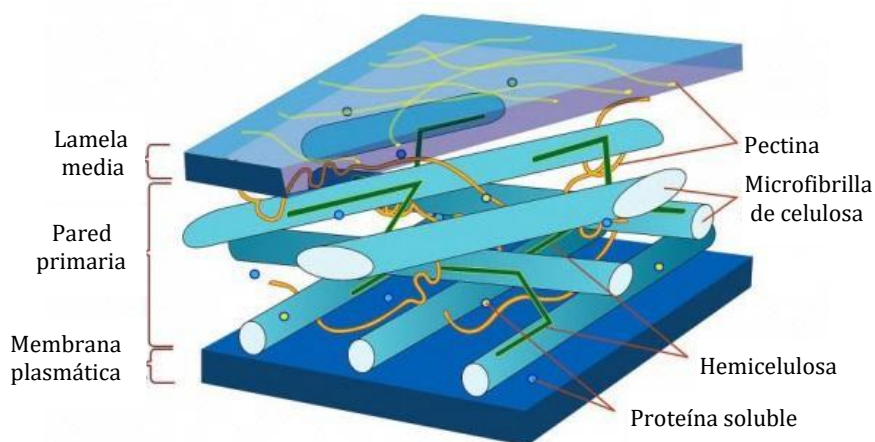


Figura 2.2: Estructura de la pared de una célula de la madera, adaptación de Dodson (2012).

El alto grado de polimerización, las fuertes y regulares interacciones entre cadenas y la organización de las fibrillas, otorgan a la celulosa propiedades específicas, Henriksson y Lennholm (2009). Estas propiedades se pueden resumir en cuatro aspectos:

- ✿ La celulosa es un material muy fuerte, se ha afirmado que las fibrillas de celulosa son más fuertes que el acero en sus correspondientes dimensiones.
- ✿ La celulosa es totalmente insoluble en agua bajo condiciones fisiológicas. Incluso un corto oligosacárido como la celoheptosa es virtualmente insoluble. Esto no significa que la celulosa no interactúe con el agua, ya que la superficie de la celulosa es hidrofílica. También es insoluble en disolventes orgánicos como etanol, benceno, éter, cloroformo y tetracloruro de carbono; siendo muy soluble en ácido sulfúrico del 72 %, ácido clorhídrico del 44 % y en menor medida en ácido fosfórico del 85 %.
- ✿ Es relativamente resistente a la derivatización química, aunque la reactividad química difiere según los métodos de preparación de la celulosa.
- ✿ Interactúa bien con compuestos aromáticos. Esto puede llevar a confusiones cuando se estudia la superficie hidrofílica de la celulosa, pero la parte superior e inferior de D-glucosa son hidrofóbicas y tienen un tamaño similar al de los anillos aromáticos. Esta propiedad puede ser importante para la interacción de compuestos aromáticos procedentes de la lignina con la celulosa. Para la unión entre celulosa y proteínas suelen usarse grupos aromáticos.

2.1.2.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa, es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, Saha (2003). Se trata de un polímero heterogéneo de pentosas (D-xilosa, L-arabinosa), hexosas (D-manosa, D-glucosa, D-galactosa) y los ácidos: 4-O-metil-glucuronido, D-galacturónico y D-glucurónico. Por otro lado, cabe citar la presencia de grupos acetilo.

La hemicelulosa de las gimnospermas (maderas blandas) y angiospermas (maderas duras) no es la misma, Tabla 2.3. La fracción hemicelulósica de las maderas duras contiene principalmente heteroxilanos altamente acetilados, mientras que la de las maderas blandas contiene principalmente glucomananos, McMillan (1994). Se trata en cualquier caso de heteropolisacáridos con un grado de polimerización mayor a 200,

Teleman (2009). Todos estos componentes se encuentran entre las fibrillas de celulosa dentro de la matriz de la pared celular, Teleman (2009) y pueden formar asociaciones polisacárido-polisacárido mediante puentes de hidrógenos y fuerzas de Van der Waals, Mateo (2011). A continuación se comentan los grupos más relevantes.

Tabla 2.3: Principales componentes de la hemicelulosa en maderas duras y blandas, Teleman (2009).

Material	Hemicelulosa	Peso seco, %
Madera blanda	Galactoglucomanano	5-8
Madera blanda	Glucomanano	10-15
Madera blanda	Arabinoglucuronoxilano	7-15
Madera dura	Glucuronoxilano	15-35
Madera dura	Glucomanano	2-5

Los xilanos son esencialmente polisacáridos lineales con una estructura vertebral formada por β -(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranosil, pudiendo desarrollar cadenas laterales donde se posicionan moléculas de ácido 4-O-metil-D-glucurónido. El polisacárido más abundante en maderas duras es O-acetil-(4-O-metilglucurono)-xilano, denominado comúnmente glucuronoxilano. Sin embargo, en maderas blandas el más abundante es el arabinoglucuronoxilano. En este sentido, en las maderas blandas L-arabinosa sustituiría en parte al ácido 4-O-metil-D-glucurónido, lo que supone la pérdida de carácter ácido frente a las maderas duras.

Los Galactoglucomananos son polisacáridos lineales formados por residuos β -D-manopiranosil y β -D-glucopiranosil unidos por enlace (1 \rightarrow 4). En maderas blandas, los galactoglucomananos pueden dividirse en dos fracciones con diferente cantidad de unidades de α -D-galactopiranosil unidas a D-manosa mediante enlace (1 \rightarrow 6), para simplificar, ambas se denominan glucomananos, aunque habría que atender al ratio composicional para dar un nombre correcto. En maderas duras, D-galactosa está generalmente ausente o es infrecuente, por lo que se habla de glucomananos y se diferencia según el ratio D-glucosa:D-manosa, Teleman (2009).

En tercer lugar, se pueden describir los xiloglucanos como el mayor componente de la pared primaria de las plantas superiores, donde puede suponer cerca del 20% del peso

seco total. Son heteropolisacáridos con una cadena principal consistente en residuos de β -(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranosil sobre la se encuentra α -D-xilopiranosil a modo de ramificaciones laterales.

La mayor diferencia entre la hemicelulosa y la celulosa es que la primera posee cadenas laterales cortas donde se posicionan diferentes azúcares, mientras que en la celulosa se encuentran oligómeros fácilmente hidrolizables, Sánchez (2009), mediante la precipitación con ácidos diluidos o por extracción con álcalis diluidos, Moya (1997). En este sentido, la hemicelulosa procedente de maderas duras es fácilmente hidrolizables en medio ácido, mediante autohidrólisis, en condiciones de severidad media, mientras que la de las maderas blandas, por su mayor contenido en hexosanos (glucomanos y galactoglucomanos) frente a xilanos, son más resistentes a la hidrólisis ácida, Mateo (2011). Finalmente, de acuerdo con Teleman (2009), se puede afirmar que los grupos acetilo son fácilmente fraccionados por la acción de un álcali, en esta línea, Inalbon *et al.* (2009) estudiaron la desacetilación de la madera de eucalipto usando NaOH en concentraciones de 0,01 a 0,1 N, temperatura de 20 a 90 °C y tiempo de reacción de 0 a 50 min.

2.1.2.3. Lignina

La lignina, es un polímero amorfo, heterogéneo, insoluble en los disolventes usuales y ópticamente inactivo. Se encuentra unido a la celulosa y a la hemicelulosa formando un sello físico en la célula vegetal a modo de barrera impenetrable, por consiguiente, se encarga de dar soporte estructural, impermeabilidad, resistencia frente al ataque microbiano y frente al estrés oxidativo. Está formada por unidades de fenilpropano unidas mediante enlaces no hidrolizables. Es sintetizado por la generación de radicales libres, los cuales son liberados por la deshidrogenación de alcoholes hidroxicinámicos: coniferílico, *p*-cumarílico y sinapílico. Esta estructura heterogénea se une mediante enlaces C-C y enlaces aril-éter, con aril-glicerol β -aril éter siendo las estructuras predominantes, Sánchez (2009).

2.2. La poda de olivo como subproducto valorizable del olivar

La poda de olivo, es aquel material de carácter lignocelulósico que se genera cada año en las tierras dedicadas a este tipo de cultivo como consecuencia de las operaciones de tala a las que son sometidas diferentes partes de la planta, Figura 2.3.

2.2.1. El cultivo del olivo

El olivo (*Olea europea*) es un árbol perennifolio perteneciente a la familia de las oleáceas que puede alcanzar los 15 m de altura. Posee un tronco erecto de superficie lisa y de color gris claro que cambia a rugosa, con protuberancias y fisuras a medida que la planta se desarrolla. Sus hojas son opuestas, lanceoladas, de hasta 8 cm de longitud, 2 de anchura y con un corto peciolo. Presentan color verde por el haz y plateado por el envés.



Figura 2.3: Restos de poda de olivo hilerados sobre el terreno de cultivo. Elaboración propia en un olivar situado en Arjona (Jaén).

Las flores, denominadas ‘rapas’, son muy pequeñas y se reúnen en inflorescencias. Presentan cuatro pétalos de color blanquecino y una fuerte fragancia. El tipo de polinización es anemófilo. Los frutos son las aceitunas, drupas de forma ovoidea, en cuyo interior aparece un solo hueso. Presentan tamaños y formas diferentes, según la variedad. En general, el color es verde tornándose a negro en plena maduración.

El cultivo del olivo está ligado biogeográficamente a zonas de clima mediterráneo, Figura 2.4. Es una planta con gran resistencia y capacidad de adaptación, sobre todo a zonas xéricas con suelos arcillosos, silíceos y calcáreos.



Figura 2.4: Zonas aptas para el cultivo del olivo. Elaboración propia.
Fuente: FAOSTAT (2011).

Dada la presencia multiterritorial del olivo, se pueden encontrar un gran número de variedades, las cuales poseen adaptaciones morfológicas y fisiológicas que las hacen características para unas condiciones ecológicas específicas. El número de variedades diferentes reconocidas actualmente es de 1741, Provedo (2013).

Las diferentes explotaciones de olivar se pueden clasificar bajo tres modalidades: explotación extensiva (también llamada tradicional o marginal), intensiva y superintensiva. Las diferencias entre estas tipologías de plantaciones atienden al marco de plantación, grado de mecanización, disponibilidad de recursos hídricos y grado de profesionalización, entre otros. Así pues, se puede encontrar la típica, más extendida y condenada “plantación tradicional, extensiva o marginal”, donde los marcos de plantación pueden sobrepasar los 10x10 m, con un número igual o superior a 100 plantas por hectárea, Figura 2.5.



Figura 2.5: Olivar tradicional. Activa Jaén (2011).

Lo más común hoy día en plantaciones nuevas y en reconversiones de marcos tradicionales es optar por un marco “intensivo”, predominando los de tipo rectangular con plantas de un solo pie y de 200 a 700 plantas por hectárea, de manera que se pueda mecanizar al máximo la plantación. Finalmente, el tipo de plantación más revolucionario es el de marco superintensivo, en el cual se superan las 1.500 plantas por hectárea, y donde los inconvenientes en cuanto a su manejo se equilibran con su alta rentabilidad a corto plazo, Figura 2.6.



Figura 2.6: Olivar superintensivo en recolección. El País (2011).

2.2.2. La operación de poda

Se entiende por poda una serie de operaciones aplicadas a los árboles, por las que se modifica la forma natural de su vegetación, vigorizando o restringiendo el desarrollo de las ramas, con el fin de darles forma y maximizar la productividad o incluso de restaurar parte o la totalidad del árbol. De esta forma, la poda es fundamental para mantener el equilibrio entre las funciones vegetativas y reproductivas, haciendo compatible la máxima producción con la plena vitalidad, alargando así el período productivo y retardando al máximo la decadencia, vejez y muerte del árbol, Fernández y Puerta (1995).

Junto con las labores, el abonado, los tratamientos fitosanitarios y la recolección, la poda es una de las cinco principales tareas que se realizan en un olivar, lo que supone uno de los principales gastos económicos para el agricultor. Por esta razón, debe realizarse por profesionales, ya que es una tarea difícil y son muchos los factores que se deben tener en cuenta y que influyen directamente en la planta (reacción varietal, fertilidad del suelo, condiciones climáticas, métodos de cultivo, riego, destino de la producción: mesa o aceite, densidad de plantación, métodos de recolección).

En función del grado de desarrollo de la planta se deben aplicar diferentes tipos de poda. De tal forma, se diferencian:

- ✿ Poda de formación. Poda de baja intensidad que se realiza durante el período juvenil con el objetivo de no retrasar el crecimiento y la entrada en producción.
- ✿ Poda de producción. Poda de intensidad ligera o aclareo que se realiza durante el período adulto. El aclareo que se realiza durante este período será más intenso en los olivos dedicados a aceituna de mesa y en las variedades de alta relación hoja/madera.
- ✿ Poda de renovación. Se aplica en el momento que se aprecia un desequilibrio en la relación hoja/madera. Consiste en la sustitución progresiva de las ramas principales con el objetivo de mantener las cosechas uniformes.
- ✿ Poda de regeneración. Se lleva a cabo sobre olivos viejos o que han sufrido daños físicos, químicos o biológicos. Se extirpa todo el tronco dejando solamente la base del mismo y las raíces.

- ✿ Poda en verde. Consiste en eliminar las varetas y “chupones” no aprovechables por el árbol, eliminando las nacidas en la peana del olivo. Se efectúa cada año, generalmente a finales de agosto.

La época y el turno de la poda transcurre entre diciembre y febrero, aunque se puede retrasar por cuestiones microclimáticas. Lo normal es podar cada año o cada dos, recomendándose cada año para podas de formación y en caso de suelos fértiles o en aquellos donde se usa riego, Ortega (1969).

Para conseguir una poda correcta se deben considerar las siguientes bases agronómicas:

- ✿ Equilibrar el crecimiento y la fructificación.
- ✿ Acortar al máximo el período improductivo.
- ✿ Alargar el período productivo.
- ✿ No producir un envejecimiento prematuro del olivo.
- ✿ Tener en cuenta el principal factor limitante de los cultivares, el agua.
- ✿ Máximo aprovechamiento de la luz y el aire.
- ✿ Renovar o sustituir las ramas que muestren signos de decadencia o vejez.
- ✿ Regenerar árboles decrepitos e improductivos.

2.2.3. Producción y localización

Según fuentes de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la superficie mundial dedicada al cultivo del olivo superó las $10 \cdot 10^6$ ha en 2016, Tabla 2.4. Del reparto de la superficie cultiva, la mayor parte se encuentra en España, con un 24,16 % del total mundial, le siguen Túnez (15,46 %), Italia (10,94 %) y Marruecos (9,47 %). Un tercer grupo lo forman Grecia, Turquía, Siria, Argelia, Libia y Portugal; la representación del resto de países es baja. Cabe destacar el rápido crecimiento de superficie cultivada que ha tenido Marruecos en los últimos años.

Tabla 2.4: Superficie de olivar por países (2016).
Fuente: FAOSTAT (2018).

País	Superficie, ha	Superficie, %	País	Superficie, ha	Superficie, %
España	2573473	24,16	Chile	20343	0,19
Túnez	1646060	15,46	Croacia	18184	0,17
Italia	1165562	10,94	Francia	17354	0,16
Marruecos	1008365	9,47	Perú	17119	0,16
Grecia	887177	8,33	E.E.U.U.	14164	0,13
Turquía	845542	7,94	Chipre	10612	0,10
Siria	765603	7,19	Serbia	5852	0,05
Argelia	424028	3,98	El Salvador	5227	0,05
Libia	357797	3,36	México	5094	0,05
Portugal	355075	3,33	Uruguay	2985	0,03
Egipto	67293	0,63	Azerbaiyán	2979	0,03
Irán	66915	0,63	Iraq	2294	0,02
Palestina	66645	0,63	Afganistán	2200	0,02
Jordania	63963	0,60	Eslovenia	1173	0,01
Líbano	62297	0,58	Brasil	574	0,01
Argentina	61942	0,58	China	318	0,01
Albania	38889	0,37	Bosnia H.	254	0,01
Israel	33700	0,32	Uzbekistán	117	0,01
Australia	32747	0,31	Montenegro	90	0,01

En España, la mayor parte de la superficie dedicada al cultivo del olivo se encuentra en la Comunidad Autónoma de Andalucía, con el 62,5 % del total nacional. Por debajo se sitúan Castilla La Mancha y Extremadura, con un 14,59 % y un 10,08 % respectivamente; mientras que el resto posee una representación menor al 5 %. Tabla 2.5.

La provincia de Jaén, con 583.613 ha, es la región andaluza con mayor superficie dedicada al cultivo del olivo, Córdoba, Sevilla, Granada y Málaga le siguen en orden decreciente. Si se consideran los estudios realizados por Jiménez *et al.* (1990) y Sánchez *et al.* (2002b) en los que se relaciona la superficie cultivada con la producción de biomasa, se está en disposición de conocer la cantidad de material de poda producido cada año, Tabla 2.6.

Tabla 2.5: Superficie de olivar en España por regiones (2017).
Fuente: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, (2018).

Región	Superficie, ha	Superficie, %
Andalucía	1.596.717	62,50
C. La Mancha	372.744	14,59
Extremadura	257.553	10,08
Cataluña	113.069	4,43
Valencia	91.843	3,59
Aragón	45.760	1,79
Madrid	26.609	1,04
Murcia	20.428	0,80
Baleares	8.524	0,33
Castilla y León	8.086	0,32
Navarra	6.877	0,27
La Rioja	5.641	0,22
P. Vasco	361	0,01
Canarias	345	0,01
Galicia	272	0,01
España	2.554.829	100,50

Puesto que las técnicas de cultivo son geográficamente diferentes, Vilar y Cárdenas (2012), y dado que los resultados que concluyen Jiménez *et al.* (1990) y Sánchez *et al.* (2002b) cumplen con unas tipologías de olivares con características propias, no se dispone actualmente de datos suficientes para calcular la producción mundial de biomasa de olivar.

Tabla 2.6: Producción de poda de olivo en Andalucía (2018).
Fuente: Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía (2018).

Provincia	Superficie, ha			Poda de olivo, t año ⁻¹ Sánchez <i>et al</i> (2002b).	Poda de olivo, t año ⁻¹ Jiménez <i>et al.</i> (1990).
	Almazara, ha	Mesa, ha	Total, ha		
Jaén	583563	50	583613	17,51	9,92
Córdoba	343946	4133	348079	10,44	5,92
Sevilla	142740	83196	225936	6,78	3,84
Granada	189508	15	189523	5,69	3,22
Málaga	123060	6469	129529	3,89	2,20
Huelva	28939	3929	32868	0,99	0,56
Cádiz	23409	3	23412	0,70	0,40
Almería	20489	82	20571	0,62	0,35
Andalucía	1455653	97877	1553530	46,61	26,41

2.2.4. Composición

La poda de olivar es un material heterogéneo. Está constituido por troncos, tallos (varetas) y hojas, Humanes (1994); se puede distinguir entre madera, cuando el diámetro es superior a unos 5 cm, y ramones, si el diámetro es inferior. La representación de cada una de estas fracciones varía en función del tipo y edad de la plantación, condiciones climáticas, zona de cultivo, etc. En definitiva, la composición variará según el tipo de poda que se realice. Así pues, por ejemplo, una poda de regeneración generará mayores cantidades de madera que una poda de formación.

La caracterización de la poda de olivo se realiza comúnmente en función de su contenido en fibras mediante las normas TAPPI (“Technical Association of the Pulp and Paper Industry”) y métodos estandarizados propuestos por Van Soest y Wine (1967), aunque existe otras metodologías como la propuesta por la NERL o la de Browning (1967) y Rocha (2000). En este sentido, la composición suele darse como el contenido en sus principales componentes: celulosa, hemicelulosa y lignina, aunque puede darse también en función a los polisacáridos celulósicos y hemicelulósicos que la componen: glucanos, xilanos, arabinanos, galactanos, mananos, etc., y resto de componentes como pueden ser los grupos acetilo.

Para tener una primera aproximación a la composición de la poda de olivar, puede atenderse a los datos facilitados por Mateo *et al.* (2013a), Tabla 2.7.

Tabla 2.7: Caracterización de poda de olivar, Mateo *et al.* (2013a).

Composición	%, materia seca
Glucosanos	28,6 ± 0,4
Pentosanos	13,9 ± 0,2
D-xilosa	10,1 ± 0,3
L-arabinosa	3,5 ± 0,2
Lignina insoluble en ácido	21,4 ± 0,5
Lignina soluble en ácido	2,3 ± 0,6
Grupos acetilo	1,5 ± 0,1
Cenizas	3,8 ± 0,3
Extractos	21,4 ± 0,2
En agua	18,8 ± 0,1
D-xilosa	2,7 ± 0,1
D-glucosa	5,8 ± 0,1
En etanol	2,6 ± 0,1

2.2.5. Vías de aprovechamiento

La biomasa del olivar, generada en la operación de poda, es a día de hoy un material infrautilizado. Esto es debido fundamentalmente a la baja viabilidad económica que se les atribuye a las distintas alternativas de aprovechamiento existentes desde el propio sector productor e industrias afines. Sin embargo, un aprovechamiento eficiente de los mismos podría suponer un potencial económico realmente importante que además tendría otras ventajas evidentes, entre las que se pueden citar: su eliminación fuera de los terrenos de cultivo, la sustitución parcial de combustibles convencionales, la mejora ambiental del entorno, etc., Moya (1997).

Tras la tala de las distintas partes de la planta se realiza el “escamujado”, cuyo objetivo es la separación de la madera y los ramones. La madera constituye un recurso aprovechable como combustible doméstico en hornos o en pequeñas industrias, mientras que los ramones son apilados e incinerados en los campos de cultivo con objeto de evitar la propagación de ciertas plagas como puede ser *Phloeotribus scarabaeoides*. La

incineración “in situ”, Figura 2.7, provoca un doble impacto negativo: económico y ambiental. Económico debido al no aprovechamiento y ambiental por contaminación atmosférica (alta producción de CO₂), molestia para las poblaciones cercanas, mineralización del suelo, incremento del riesgo de incendios, propagación de plagas, etc.



Figura 2.7: Incineración de poda de olivar sobre el terreno de cultivo. Elaboración propia.

Actualmente existe una tendencia hacia la incorporación al suelo de los restos de poda triturados con el objetivo de mejorar la estructura físico-química del suelo por el aporte de materia orgánica, protección contra la erosión y de la desecación, Ordóñez *et al.*, (2005), Figura 2.8. Sin embargo esta técnica contribuye al incremento y dispersión del inóculo de *Verticilium dahliae*, principal enfermedad para olivar en los últimos diez años, Cabeza y Bejarano (2005).



Figura 2.8: Restos de poda sobre el terreno de cultivo. Elaboración propia.

Por otro lado, la biomasa de olivar es susceptible de ser utilizada para la obtención de energía, puesto que:

- ✿ Las zonas de cultivo presentan grandes concentraciones, existiendo extensas superficies aprovechables.
- ✿ Representaría un ahorro/insumo económico para el agricultor, ya que actualmente su eliminación conlleva un coste económico.
- ✿ Es uno de los usos alternativos que actualmente pueden ser viables económicamente.

Así pues, la poda de olivo puede ser aprovechada fundamentalmente por dos vías:

- ✿ Conversión bioquímica.
- ✿ Conversión termoquímica.

La conversión bioquímica de residuos lignocelulósicos constituye la principal línea de investigación para numerosos grupos científicos de todo el mundo y aparece como una clara vía para su desarrollo a escala industrial. Los procesos de sacarificación vía hidrólisis ácida o enzimática de las fracciones hemicelulósica y celulósica de este tipo de residuos proporciona una disolución de azúcares que, por fermentación con los microorganismos adecuados, proporciona una serie de bioproductos (etanol, xilitol, etc.) de gran interés para la industria química y farmacéutica, Taherzadeh y Karimi (2007a).

De los procesos de conversión termoquímica, la combustión es el más conocido y ampliamente utilizado, la gasificación es la que representa mayores ventajas, mientras que la pirolisis es la menos aplicada, Sánchez *et al.* (2002b).

Dentro del aprovechamiento termoquímico, se podría destacar, el esfuerzo de distintas empresas nacionales cuya labor es la producción de “pellets” a partir de biomasa de olivar. La producción está destinada al uso en calderas domésticas, grandes comunidades, centros de educación y otras administraciones.

La hoja del olivo presenta actualmente gran repercusión dentro del mundo científico. En los últimos años ha sido objeto de numerosos estudios y experiencias piloto para el suplemento en nutrición animal. De esta forma, pueden encontrarse estudios destinados a la alimentación de rumiantes, Molina-Alcaide y Yáñez-Ruiz (2008), cerdos, Paiva-Martins *et al.* (2009) o conejos, Ribeiro *et al.* (2012). Por otro lado, se pueden destacar los beneficios sobre la salud de la oleuropeína y otros antioxidantes presentes en la hoja de olivo y los avances científicos alcanzados en torno a su extracción y aplicación, Covas (2007), Singh *et al.* (2008), Aouidia *et al.* (2012).

2.3. Hidrólisis y fermentación de biomasa lignocelulósica

2.3.1. Antecedentes

El aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica por conversión bioquímica tiene como etapas fundamentales la hidrólisis del material y la fermentación de la solución resultante. La primera etapa puede ser de tipo químico (mediada por ácido concentrado o diluido) o bioquímico (mediada por enzimas), mientras que la fermentación está mediada por microorganismos. Los primeros trabajos encontrados en bibliografía están relacionados con la producción de etanol vía hidrólisis ácida y datan de principios del siglo XX, mientras que la vía enzimática es relativamente reciente, último tercio del siglo pasado, García (2007).

De acuerdo con Tahezardéh y Karimi (2007a), los primeros procesos de conversión bioquímica de la biomasa lignocelulósica datan de 1819, cuando Braconnot descubre la posibilidad de conversión de la celulosa en azúcares fermentables mediante la hidrólisis con ácido concentrado.

Aunque presenta ciertos inconvenientes, la hidrólisis con ácido concentrado sigue siendo una etapa viable en el proceso de obtención de bioetanol. Esto se demuestra con el desarrollo de nuevos procesos basados en la utilización de ácido concentrado, como es el caso del proceso "Biosulfurol" propiedad de la empresa Biosulfurol Energy. Este proceso consiste en la impregnación de la biomasa lignocelulósica con ácido sulfúrico al 70 %, añadiendo agua posteriormente para hidrolizar el material y finalizando con una recuperación del ácido sulfúrico mediante membranas aniónicas y parcialmente como ácido sulfhídrico por tratamiento anaeróbico. A pesar de la existencia de este tipo de procesos, la aplicación a gran escala está aún bajo desarrollo.

El método de hidrólisis química más extendido es la hidrólisis con ácido diluido. Sin embargo, actualmente se considera un pretratamiento común en la hidrólisis enzimática, Kumar y Wyman (2009), Jensen *et al.* (2010), o también como el método generalizado para la hidrólisis selectiva de la hemicelulosa, Mussatto *et al.* (2004).

Según Tahezardeh y Karimi (2007a), uno de los primeros procesos para la hidrólisis con ácido diluido sería el proceso Scholler, descrito en 1945 por Faith, consistente en el tratamiento del material con ácido sulfúrico al 0,5 % y 11-12 bar durante 45 minutos. Las condiciones de hidrólisis empleadas hasta el último tercio del siglo XX fueron temperaturas entre 170-200 °C y concentraciones de ácido sulfúrico entre 0,5 y 2,0 %, mientras que a finales de este mismo siglo se alcanzaron temperaturas de 230 °C, Lee *et al.* (1999).

Finalmente, según Cuevas (2007), los trabajos científicos precursores de la hidrólisis enzimática de la celulosa fueron los de Seillière (1906) y Reese *et al.* (1950). Sin embargo, hasta 1970, con la aparición de preparados comerciales, no se empiezan a utilizar sobre sustratos lignocelulósicos. En este sentido, se pueden citar los trabajos de Chahak *et al.* (1982), los cuales estudian la producción de celulasas a partir de *Trichoderma reesei*, o los trabajos de Marchal *et al.* (1984) donde se aplica la hidrólisis enzimática y fermentación simultáneas sobre forraje, con un pretratamiento alcalino. En sus comienzos, la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica estaba dirigida a la conversión de la celulosa en monómeros de D-glucosa, sin embargo, en la actualidad se ha extendido hacia la conversión de todos los monosacáridos presentes en el material de partida para su posterior fermentación gracias a mezclas comerciales, Kumar y Wyman (2009), o el denominado bioproceso consolidado, en el cual se emplean microorganismos para producción de complejos enzimáticos, Wyman (2007).

2.3.2. Hidrólisis

El término hidrólisis señala un proceso que consiste en la reacción del agua con otra molécula para generar al menos dos productos. La aplicación de este concepto a los materiales lignocelulósicos se ha extendido a los mecanismos de rotura de enlaces moleculares mediante un agente químico (hidrólisis ácida o alcalina) o bioquímico (hidrólisis enzimática). La hidrólisis de los polímeros contenidos en los materiales lignocelulósicos es un proceso complejo, consistente en el fraccionamiento de los materiales que integran el sustrato a través de la acción del agente hidrolítico. Sin embargo y pese a la dificultad de estos procesos se ha realizado un esfuerzo para modelizarlos, desarrollando varios modelos empíricos, Aguilar *et al.* (2002).

Debido a la diferente naturaleza química de los polímeros que integran la biomasa lignocelulósica, los procesos de hidrólisis deben ser controlados en función del aprovechamiento que requiera la solución resultante. En este sentido, es de gran importancia atender a los compuestos identificados como inhibidores del metabolismo microbiano (principalmente ácido acético, furanos y fenoles) y que se generan a medida que se degradan estos tipos de materiales. Por tanto, los objetivos de la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos pueden ser:

- ✿ Liberación de monosacáridos fermentables por hidrólisis de la hemicelulosa.
- ✿ Liberación de monosacáridos fermentables por hidrólisis de la hemicelulosa y la celulosa.
- ✿ Liberación de compuestos fenólicos, a partir de la lignina, y de compuestos furánicos, generados por degradación de los monosacáridos que componen la hemicelulosa y la celulosa, por hidrólisis completa del material.

2.3.3. Pretratamiento

El pretratamiento de la biomasa lignocelulósica es un proceso de gran importancia de cara a la efectividad del subsecuente proceso de hidrólisis. De tal forma, se deberá proceder a la aplicación del pretratamiento adecuado en función de la transformación que se quiera producir sobre el material. Además, hay que considerar que el método de aplicación de un pretratamiento no es algo generalizado y si específico a la naturaleza del material de partida, Claassen *et al.* (1999), por lo que debe ir acompañado de ensayos previos.

Los pretratamientos que se realizan al material lignocelulósico tienen como objetivos principales:

- ✿ La eliminación del efecto cementante de la lignina, Varnai *et al.* (2010).
- ✿ La solubilización total o parcial de la hemicelulosa para facilitar, en el caso de la hidrólisis enzimática, el acceso de las celulasas.
- ✿ La reducción de la cristalinidad de la celulosa y su grado de polimerización.
- ✿ La reducción del tamaño de partícula del material, Chundawat *et al.* (2007) o alterar la porosidad del mismo, Galbe y Zacchi (2002).

En este sentido, Van Dyk y Pletschke (2012) consideran la importancia de tener en cuenta las siguientes pautas a la hora de elegir el pretratamiento adecuado:

- ✿ Coste del pretratamiento. Energía, reactivos químicos y recuperabilidad de los mismos.
- ✿ Porcentaje de deslignificación. En este sentido, mantienen la innecesaridad de eliminar el 100 % de la lignina, ya que una severa deslignificación puede acarrear problemas de digestibilidad de la celulosa por agregación de las microfibrillas. Estos mismos autores proponen simplemente un cambio en la estructura de la lignina con objeto de facilitar el acceso de las enzimas.
- ✿ Rendimiento en hidrólisis. En el pasado, los objetivos se centraban en la degradación del material para dejar acceso libre a la celulosa por parte de los enzimas, lo que conlleva a la eliminación de la hemicelulosa (pretratamientos por vía ácida). Sin embargo, actualmente la orientación ha cambiado hacia la mejora y optimización del rendimiento en monosacáridos.
- ✿ Prevenir la generación de compuestos de degradación de los azúcares y de la lignina, los cuales aparecen con los pretratamientos de alta severidad y conllevan problemas en las etapas subsecuentes (inhibición del metabolismo microbiano en los procesos de fermentación).
- ✿ Elegir el pretratamiento adecuado para el aumento de los rendimientos de hidrólisis, es decir, dirigir el pretratamiento para el ataque a un determinado sustrato con objeto de disminuir la necesidad de grandes cargas de enzima.
- ✿ Posibilidad de recuperación de la lignina para aumentar la viabilidad económica del proceso.

Los pretratamientos realizados sobre los materiales lignocelulósicos pueden clasificarse en: físicos, físico-químicos, químicos y biológicos, Tablas 2.8 a 2.11.

Tabla 2.8: Pretratamientos físicos.

Proceso	Material	Referencias
Congelación	Paja de arroz	Chang <i>et al.</i> (2009)
Irradiación por microondas	Paja de arroz	Ma <i>et al.</i> (2009)
	Pasto varilla	Hu <i>et al.</i> (2008)
Irradiación rayos γ	Álamo blanco	Chung <i>et al.</i> (2012)
Irradiación por haz de electrones	Paja de arroz	Bak <i>et al.</i> (2009a)
Molienda	Mezcla de maderas duras	Sentur-Ozer <i>et al.</i> (2011)
	Rastrojo de maíz	Zhanga <i>et al.</i> (2012)
Pirólisis	Madera	Sun y Cheng (2002)
	Rastrojo de algodón	Yu y Zhang (2003)

Tabla 2.9: Pretratamientos físico-químicos.

Proceso	Material pretratado	Referencias
Agua líquida caliente (LHW)	Paulonia imperial	Wang <i>et al.</i> (2012)
	Paja de centeno	Ingram <i>et al.</i> (2012)
Explosión con CO ₂ supercrítico	Álamo temblón, pino amarillo	Kim <i>et al.</i> (2001)
	Pasto varilla, rastrojo de maíz	Narayanaswamy <i>et al.</i> (2011)
Explosión con SO ₂	Bagazo de sorgo	Shen <i>et al.</i> (2011)
	Paja de trigo	Alfani <i>et al.</i> (2000)
	Paja de sorgo	Li <i>et al.</i> (2010)
Explosión con fibra de amoníaco (AFEX)	Ensilado y rastrojo de maíz, álamo, paja de trigo, paja de trigo, bagazo de caña, forraje de sorgo, pasto varilla, poáceas, alfalfa	Bals <i>et al.</i> (2010)
Explosión con vapor	Rastrojo de maíz	Liu <i>et al.</i> (2013)
Oxidación húmeda	Paja de colza	Arvaniti <i>et al.</i> (2012)
	Bagazo de caña	Martín <i>et al.</i> (2012)
Ultrasonidos	Bagazo de caña	Yachmenev <i>et al.</i> (2009)

Tabla 2.10: Pretratamientos químicos.

Proceso	Material pretratado	Referencias
Deslignificación oxidativa (H ₂ O ₂)	Bagazo de manzana	Da Costa <i>et al.</i> (2013)
Extracción de la lignina con disolventes	Bagazo de caña y astillas de pino	Pasquini <i>et al.</i> (2005)
Hidrólisis con ácido concentrado	Bagazo de caña	Cuzens y Millar (1997), Teixeira <i>et al.</i> (1999)
Hidrólisis con ácido diluido	Rastrojo de maíz	Avci <i>et al.</i> (2013)
	Paja de cebada	Yang <i>et al.</i> (2013)
Hidrólisis alcalina	Gramma	Wang <i>et al.</i> (2010)
	Poáceas (KGB)	Chaudhary <i>et al.</i> (2012)
Organosolv	Pino	Park <i>et al.</i> (2010)
	Pino	Sannigrahi <i>et al.</i> (2010)
Ozonolisis	Bagazo de caña	Travaini <i>et al.</i> (2013)
	Paja de trigo y de centeno	García-Cubero <i>et al.</i> (2009)

Tabla 2.11: Pretratamientos biológicos.

Proceso	Material pretratado / microorganismo utilizado	Referencias
Hongos de degradación	Paja de arroz / <i>Phaerochaete chrysosporium</i>	Bak <i>et al.</i> (2009b)
	Paja de arroz / <i>Pleurotus ostreatus</i>	Taniguchi <i>et al.</i> (2005)
	Rastrojo de maíz / <i>Irpex lacteus</i>	Xu <i>et al.</i> (2010)
	Caña de bambú / <i>Coriolus versicolor</i>	Zhang <i>et al.</i> (2007)
	Pino rojo japonés / <i>Stereum hirsutum</i>	Lee <i>et al.</i> (2007)
	Madera de pino / <i>C. puteana</i> , <i>P. placenta</i> , <i>T. versicolor</i> , <i>C. globosum</i> , <i>T. viride</i> y <i>Mucor sp.</i>	Ray <i>et al.</i> (2010)

2.3.4. Hidrólisis ácida

Según Aguilar *et al.* (2002), la hidrólisis ácida de los materiales lignocelulósicos es un proceso que puede resumirse bajo el siguiente mecanismo:

- ✿ Difusión de los protones a través de la matriz del material lignocelulósico.
- ✿ Protonación del oxígeno de un enlace glucosídico entre monosacáridos.
- ✿ Rotura de estos enlaces.
- ✿ Generación de un carbocatión intermediario.
- ✿ Solvatación del carbocatión con agua.
- ✿ Regeneración del protón por cogeneración del monosacárido, oligosacárido o polisacárido, dependiendo de la posición del enlace glucosídico.
- ✿ Difusión de los productos en la fase líquida siempre que su tamaño y forma lo permita.
- ✿ Reanudación del proceso a partir del segundo paso.

Al hablar de hidrólisis ácida, como se ha indicado en apartados anteriores, se puede atender principalmente a la hidrólisis con ácido concentrado o diluido. Las características de ambos tratamientos, así como sus ventajas e inconvenientes, se pueden observar y comparar en la Tabla 2.12.

Tabla 2.12: Características de la hidrólisis con ácido concentrado y diluido. Adaptado de Sánchez (1990) en García (2007), y Taherzadeh y Karimi (2007a).

Hidrólisis	Ácido concentrado	Ácido diluido
Concentración de ácido	> 20%	< 5%
Tiempo de residencia	> 1 h	< 1 h
Temperatura de operación	< 100 °C	> 180 °C
Rendimiento en azúcares	Alto (90%)	Medio/bajo (50-65%)
Corrosión de equipos	Alta	Media/alta
Generación de inhibidores	Baja	Alta
Necesidades energéticas	Elevadas	Medias
Acondicionamiento de la disolución resultante	Necesario	Necesario

2.3.4.1. Variables de operación

Las variables que más influyen en el control del proceso de hidrólisis ácida del material lignocelulósico son: concentración de ácido, temperatura y tiempo de reacción. Es fundamental el control y el análisis adecuado de estas variables ya que el efecto sinérgico entre ellas marcará el grado de ataque sobre el material de partida, Tabla 2.13.

Tabla 2.13: Estudios de hidrólisis ácida sobre distintos materiales.

Material	Variables de operación				Referencia
	Ácido	Concentración	Temperatura	Tiempo	
Madera de eucalipto	H ₂ SO ₄	3 %	130 °C	60 min	Parajó <i>et al.</i> (1995)
Mazorca demaíz	HCl	2 %	100 °C	2 h	Domínguez <i>et al.</i> (1997b)
Paja de arroz	H ₂ SO ₄	0,07 M	145 °C	20 min	Mayerhoff <i>et al.</i> (1997)
Paja de trigo	H ₂ SO ₄	1,85 %	90 °C	18 h	Nigam (2001)
Paja de sorgo	H ₂ SO ₄	2 %	122 °C	71 min	Téllez <i>et al.</i> (2002a)
Paja de sorgo	H ₂ SO ₄	6 %	100 °C	60 min	Téllez <i>et al.</i> (2002b)
Poda de olivar	HCl	0,37 – 5,74 %	90 °C	180 min	Mateo <i>et al.</i> (2015)
Poda de olivar	H ₂ SO ₄	0,00 – 0,05 M	180-230 °C	0-30 min	Mateo <i>et al.</i> (2013b)
Eucalipto	H ₂ SO ₄	3 %	130 °C	60 min	Diz <i>et al.</i> (2002)
Caña de azúcar	H ₂ SO ₄	2 %	122 °C	24 min	Aguilar <i>et al.</i> (2002)
Jacinto de agua	H ₂ SO ₄	2 %	Ambiente	7 h	Nigam (2002)
Paja de arroz	H ₂ SO ₄	0,1 M	121 °C	20 min	Mussatto <i>et al.</i> (2004)
Paja de sorgo	HCl	6 %	100 °C	83 min	Herrera <i>et al.</i> (2004)
Madera de eucalipto	H ₂ SO ₄	0,65 %	157 °C	20 min	Villarreal <i>et al.</i> (2006)
Restos de palma	H ₂ SO ₄	6 %	120 °C	15 min	Rahman <i>et al.</i> (2006)
Madera de eucalipto	H ₂ SO ₄	0,65 %	157 °C	20 min	Canettieri <i>et al.</i> (2007)
Bagazo de caña	H ₂ SO ₄	1,25 %	121 °C	2 h	Cheng <i>et al.</i> (2008)
Jacinto de agua	H ₂ SO ₄	2 %	Ambiente	7 h	Kumar <i>et al.</i> (2009)
Tronco de sagú	H ₂ SO ₄	8 %	121 °C	60 min	Kamal <i>et al.</i> (2011)
Caña común	H ₂ SO ₄	1,27 %	141,6 °C	30,4 min	Shatalov y Pereira (2012)
Caña común	C ₂ H ₂ O ₄	5 %	150 °C	25 min	Scordia <i>et al.</i> (2012)
Tallos de girasol	H ₃ PO ₄	25,3 %	95 °C	240 min	Martínez <i>et al.</i> (2012)
Mazorca de maíz	H ₂ SO ₄	1 %	121 °C	60 min	Misra <i>et al.</i> (2013)
Mazorca de maíz	H ₂ SO ₄	1 %	125 °C	60 min	Ping <i>et al.</i> (2013)

En cuanto al tipo y concentración de ácido, varios pueden ser utilizados (fórmico, sulfuroso, fosfórico, trifluoroacético, nítrico, sulfúrico o clorhídrico) por su capacidad para romper los enlaces glucosídicos de unión de los monómeros que integran las

cadena polisacáridicas que forman la celulosa y la hemicelulosa. El ácido sulfúrico, Nguyen *et al.*, (1999), Sun and Cheng, (2002), Muktham *et al.* (2016) y el ácido clorhídrico, Sun and Cheng (2002), Hernández *et al.* (2009), Mateo *et al.* (2010), son ácidos potencialmente utilizables para la hidrólisis de material lignocelulósico, habiendo sido los únicos ácidos empleados a nivel industrial, Galbe y Zacchi (2007). En este sentido, Moya (1997) y García (2007) señalan la importancia, a nivel industrial, de la recuperación del ácido, indicando la ventaja económica del ácido sulfúrico sobre el clorhídrico, al presentar un menor coste por mol de protones, ser menos corrosivo y más volátil. De cualquier forma, la concentración de ácido a emplear varía en función de los objetivos marcados e influyente de diferente manera según el monosacárido que se trate; así, por ejemplo, Domínguez *et al.* (1997b), mantienen la mayor susceptibilidad a la degradación de D-xilosa frente a D-glucosa o L-arabinosa cuando emplean una secuencia creciente de concentraciones de HCl.

En cuanto la temperatura de operación, es importante su control debido a que la descomposición de los azúcares se acelera cuando se emplean altas temperaturas de operación, generándose compuestos tóxicos, tales como: furfural, 5-hidroximetil-2-furfuraldehído, ácido acético o ácido fórmico, entre otros; y que podrán afectar negativamente en el posterior proceso de fermentación, Aguilar *et al.* (2002), Lavarak *et al.* (2002). En este sentido, cabe señalar la desventaja de la hidrólisis con ácido diluido, en la que se emplean altas temperaturas de operación, frente a la hidrólisis con ácido concentrado. De este modo, el empleo de una hidrólisis con ácido diluido conlleva generalmente la realización de un pretratamiento al material de partida o un tratamiento de detoxificación del hidrolizado resultante con objeto de aumentar la fermentabilidad.

El tiempo de operación o tiempo de residencia en el reactor está generalmente relacionado con el tipo de contactor y las demás variables del proceso. Aunque en bibliografía pueden encontrarse trabajos en los que se emplean diferentes tiempos de operación, a escala industrial, debido a cuestiones económicas, priman los tiempos de residencia cortos, Moya (1997). En la bibliografía pueden encontrarse diversos tiempos de operación, que van desde 15 min, Rahman *et al.* (2006), a 18 h, Nigam (2001).

2.3.4.2. Reactores empleados

En los procesos de hidrólisis se puede operar con reactores discontinuos y continuos. Sin embargo, a escala de laboratorio se emplean comúnmente los de tipo discontinuo y con volúmenes por debajo de 5 dm³, a escala industrial se recomienda operar en continuo con objeto de economizar el proceso, Moya (1997). En cuanto a reactores a escala de planta piloto, sus volúmenes varían desde 50 dm³ hasta 350 dm³, Roberto *et al.* (2003).

Los digestores rotatorios, con bajos rendimientos en azúcares, fueron los primeros reactores empleados para llevar a cabo procesos de hidrólisis, sustituyéndose por el método de percolación a presión por etapas propuesto por Schöller a principios del siglo XX, consistente en reactores cilíndricos verticales por los que la disolución ácida percolaba desde la parte superior. Este método ha sido periódicamente modificado, de modo que la empresa 'Forest Products Laboratory' pasó a denominar el proceso original como proceso Madison, consistente en un proceso semicontinuo, con menores tiempos de operación y con rendimientos en D-glucosa sobre un 65%, Hajney (1981). Más tarde y con nuevas innovaciones este método pasaría a denominarse proceso 'New Zealand'. Actualmente, este tipo de reactores proporcionan ciertas ventajas como la de proporcionar un hidrolizado bajo en productos de degradación debido a que los azúcares son retirados continuamente, llegando a rendimientos del 95% con la posibilidad de trabajar con relaciones sólido-líquido elevadas y no necesitando una separación sólido-líquido. Actualmente se emplean los procesos denominados: 'two-stage step-change' y 'two-stage reverse-flow'; los cuales se fundamentan en la aplicación de cambios de temperatura por etapas, Taherzadeh y Karimi (2007a).

En procesos continuos, también se han utilizado reactores con configuración de flujo de pistón, que presentan rendimientos de entre 50-60% y tiempos de residencia menores a 30 s, Thompson y Grethlein (1979), Grethlein y Converse (1983), McParland *et al.* (1982). Sin embargo, presenta ciertos inconvenientes como la dificultad para controlar el tiempo de retención y la transferencia de calor entre las partículas de la biomasa.

En las últimas décadas del siglo XX, las innovaciones se dirigieron hacia el desarrollo de reactores rápidos. Así, pueden citarse los reactores tubulares en los que se combinaban altas temperaturas con tiempos de residencia de entre 6 y 12 s. Los rendimientos en azúcares son relativamente altos debido a las altas relaciones S/L con las

que se trabaja. Los denominados reactores de hidrólisis ultrarrápidos presentan la ventaja de emplear menores tiempos de residencia, junto a un menor coste energético de producción ligado a la menor presión de trabajo necesaria.

2.3.5. Hidrólisis enzimática

Consiste en un proceso catalizado mediante enzimas cuya característica común y principal es la especificidad para degradar diferentes componentes del material lignocelulósico (celulosa, hemicelulosa y lignina).

A este respecto, se pueden citar los siguientes procesos para la hidrólisis enzimática y fermentación de la biomasa lignocelulósica:

- ✿ Hidrólisis y fermentación separadas ('Separate Hydrolysis and Fermentation', SHF).
- ✿ Hidrólisis y fermentación simultáneas ('Simultaneous Saccharification and Fermentation', SSF) y sus variantes: 'Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation' (SSCF), Teixeira *et al.* (2000) y 'Non-isothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation' (NSSF), Taherzadeh y Karimi (2007b).
- ✿ Bioproceso consolidado ('Consolidated Bioprocessing', CBP). Consiste en la producción de complejos enzimáticos, por parte de microorganismos termófilos, para la fermentación de todos los azúcares liberados, Wyman (2007).

De acuerdo con Lynd *et al.* (2002) y Elkins *et al.* (2010), este último proceso (CBP) es el que presenta la menor relación coste:efectividad, con un coste menor de capital y con una mejora significativa en la interacción sinérgica agente microbiano/enzima.

Una las principales características de la hidrólisis enzimática es la especificidad enzima-sustrato. De acuerdo con Van Dyk y Pletschke (2012), se citan a continuación las enzimas específicas para la hidrólisis de los diferentes componentes del material lignocelulósico:

- ✿ Celulasas. La degradación de la celulosa esta mediada por tres tipos de enzimas, denominadas: exo-1,4- β -glucanasas (celobiohidrolasa) (EC 3.2.1.91 y EC 3.2.1.176), endo-1,4- β -glucanasas (EC 3.2.1.4) y β -glucosidasas (celobiasas) (EC

3.2.1.21). Las celobiohidrolasas atacan los extremos de las cadenas de celulosa, mientras que las endoglucanasas tienen la capacidad de degradar las zonas intermedias de baja cristalinidad, reduciendo el grado de polimerización y generando nuevos extremos libres. Por último, mediante las celobiasas se obtiene D-glucosa a partir de celobiosa, de esta manera se consigue reducir la posible inhibición por producto de la etapa de hidrólisis por la presencia de este último disacárido, Cuevas (2007).

- Hemicelulasas. La degradación efectiva de la hemicelulosa requiere diferentes tipos de enzimas. Las encargadas de degradar los xilanos son endoxilanasas y β -xilosidasas, para la degradación de los mananos se requieren endomananasas y β -manosidasas. Sin embargo, debido a que estos polímeros pueden contener sustituyentes tales como: L-arabinosa, grupos acetilo, D-galactosa o D-glucosa, se requiere de enzimas capaces de degradar los enlaces a la cadena principal. Estas enzimas pueden ser: α -L-arabinofuranosidasas, α -glucoronidasa, ácido ferúlico esterasa, α -galactosidasa, feruloil esterasa, acetil xilano esterasa y acetil manano esterasa.
- La degradación de la pectina está mediada por: poligalacturonasa, pectina metil esterasa, pectato liasa, ramanogalacturonasa, ramanogalacturonano liasa y acetilesterasa.
- La lignina puede ser degradada por: lacasas, manganeso peroxidasas y lignina peroxidasas.

Frente a la hidrólisis ácida, la hidrólisis enzimática es un proceso que se desarrolla en condiciones suaves (temperaturas entre 40 y 50 °C y pH entre 4,0 y 5,0), permitiendo obtener rendimientos en azúcares superiores a los obtenidos por vía ácida, con menor generación de inhibidores y menor degradación de las instalaciones, Taherzadeh y Karimi (2007b). Por el contrario, el coste de las enzimas es muy elevado y depende de la realización de un pretratamiento tan necesario como costoso, Eggeman y Elander (2005).

La optimización de la hidrólisis enzimática requiere el conocimiento de diferentes aspectos como son: la carga de enzima a utilizar, la composición de la mezcla de enzimas y las condiciones de hidrólisis (temperatura y pH, principalmente). El hecho de trabajar con mezclas de enzimas se debe a la elevada complejidad de los sustratos, por lo que se requieren numerosos enzimas actuando sinérgicamente para lograr altos rendimientos

de hidrólisis, Tabla 2.14. La complejidad de los tratamientos aumenta también debido a la heterogeneidad composicional de los materiales lignocelulósicos. En este sentido, existen numerosos estudios donde se ha investigado la sinergia entre enzimas empleando mezclas comerciales, Tabla 2.15, aunque muchos de estos trabajos se centran más en el análisis del grado de sinergia entre enzimas que en la optimización de los rendimientos en hidrólisis.

Tabla 2.14: Hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos.
Adaptado de Van Dyk y Pletschke (2012).

Material	Pretratamiento	Enzimas	Rendimiento	Referencia
Rastrojo de maíz	AFEX	CBH1, CBH2, EG, EX, β G, β X	80 % D-glu, 56 % D-xil	Gao <i>et al.</i> (2010)
	AFEX	CBH1, CBH2, EG, β G, EX, β X	38,5 % D-glu	Banerjee <i>et al.</i> (2010)
	Ball-milled	Mezcla comercial	95 % azúcares	Lin <i>et al.</i> (2011)
Panizo	Líquido iónico	Spezyme y Primafast, Novozyme 188	91 % D-glu	Samayan y Schall (2010)
	NaOH	Spezyme, Multifect xylanase, Multifect pectinase y Novozyme 188	73 % D-glu, 84 % D-xil	Sills y Gossett (2011)
Álamo	AFEX, ARP, control de pH, ácido diluido, FT, lime, SO ₂	Spezyme, Multifect	84,9 % azúcares	Kumar y Wyman (2009)
	Líquido iónico	Sepezyme, Primafast (suplementado con xilanasa) y Novozyme 188	85 % D-glu	Samayan y Schall (2010)
Eucalipto	Explosión de vapor	Cel. (<i>T. viride</i>) y β G (1.5:1)	80 % de celulosa	Martin y Aguilera (1988)
	Líquido a alta temperatura	Celluclast (Novozyme)	94 % mono y oligosacáridos	Romaní <i>et al.</i> (2010)
Paja de arroz	NaOH	Enzimas de <i>Trametes hirsuta</i>	85 % D-glu	Jeya <i>et al.</i> (2009)
	Hidrólisis ácida	Celluclast 1.5, Novozyme 188	85 % D-glu	Hsu <i>et al.</i> (2010)

Tabla 2.15: Enzimas comerciales y rango de actividad ensayado.
Adaptado de Van Dyk y Pletschke (2012).

Mezcla comercial	Proveedor	Actividad enzimática (U/ml)	Referencias
Celluclast 1.5 L FG	Novozyme	65 FPU, 12 β -glucosidasa, 660 xilanasa (bwx) 60,7 FPU, 6,5 β -glucosidasa	Sorensen <i>et al.</i> (2003) Pryor y Nahar (2010)
Novozyme 188	Novozyme	8,5 FPU, 665 β -glucosidasa, 123 xilanasa (osx), 29,3 α -arabinofuranosidasa, 16,6 β -xilosidasa, 116 α -galactosidasa, 0,6 feruloil esterasa (U/mg) 1 endoglucanasa, 0,35 exoglucanasa, 14,75 β -glucosidasa, 10 β -xilanasa, 0,22 β -xilosidasa, 0,09 α -arabinofuranosidasa c 0,1 FPU, 661 β -glucosidasa	Dien <i>et al.</i> (2008) Pryor y Nahar (2010)
Spezyme CP	Genecor	58,2 FPU/ml, 128 β -glucosidasa, 2622 xilanasa (osx), 22,6 α -arabino-furanosidasa, 7,3 β -xilosidasa, 0,39 α -galactosidasa (u/mg) 1,4 FPU, 21,8 CMCase, 0,09 exoglucanasa, 1,82 β -glucosidasa, 15 β -xilanasa, 0,56 β -xilosidasa, 0,38 α -arabinofuranosidasa 55,2 FPU, 15,4 β -glucosidasa	Dien <i>et al.</i> (2008) Prior y Day (2008) Pryor y Nahar (2010)
Multifect (xilanasa)	Genecor	0,77 FPU, 35,9 β -glucosidasa, 25,203 xilanasa (osx), 9,44 α -arabino-furanosidasa, 22,6 β -xilosidasa, 2,39 α -galactosidasa, 1,3 <i>p</i> -cumaroil esterasa (U/mg) 6,3 endoglucanasa, 0,46 exoglucanasa, 3,3 β -glucosidasa, 209 β -xilanasa, 4,9 β -xilosidasa, 3,21 α -arabinofuranosidasa	Dien <i>et al.</i> (2008) Prior y Day (2008)
Multifect (pectinasa)	Genecor	4,18 FPU, 345,8 β -glucosidasa, 1664 xilanasa (osx), 1862 α -arabino-furanosidasa, 186,2 β -xilosidasa, 31,9 α -galactosidasa, 9,67 feruloil esterasa, 21,7 <i>p</i> -cumaroil esterasa	Dien <i>et al.</i> (2008)
Accelerase 1000	Genecor	93 FPU, 7,3 CMCase, 1632 β -glucosidasa, 849-xilanasa 67,3 FPU, 84,2 β -glucosidasa	Lin <i>et al.</i> (2011) Pryor y Nahar (2010)
Primafast Luna CL	Genecor	Endoglucanasas, no exoglucanasa	Samayan y Schall (2010)
GC220	Genecor	92,8 FPU, 99,7 β -glucosidasa, 2782 xilanasa 9 (osx), 3,06 α -arabino-furano-sidasa, 7,3 β -xilosidasa, 3,9 α -galactosidasa.	Van Dyk y Pletschke (2012)
Shearzyme	Novozyme	27 FPU, 5,0 β -glucosidasa, 2293 xilanasa (bwx)	García-Aparicio <i>et al.</i> (2007)
NS50013	Novozyme	63 FPU, 8 β -glucosidasa, 111c7 xilanasa (bwx)	García-Aparicio <i>et al.</i> (2007)
NS50010	Novozyme	992 β -glucosidasa, 124 xilanasa (bwx)	García-Aparicio <i>et al.</i> (2007)
NS50030	Novozyme	1,0 β -glucosidasa, 3760 xilanasa (bwx)	García-Aparicio <i>et al.</i> (2007)
Viscozyme	Novozyme	β -glucanasa	Sorensen <i>et al.</i> (2007)

2.4. Detoxificación de hidrolizados

Uno de los principales escollos en la investigación y explotación industrial de procesos para la obtención de bioproductos, a partir de material lignocelulósico, es el impacto de los compuestos tóxicos e inhibitorios del metabolismo microbiano procedentes de estos materiales y que se generan en la etapa de sacarificación. En este sentido, debido a la naturaleza heterogénea de la biomasa lignocelulósica, los compuestos inhibidores pueden variar significativamente en cuanto a tipología y concentración, existiendo dependencia directa de las condiciones del tratamiento: tiempo de operación, temperatura, presión y pH.

El conocimiento y clasificación de los inhibidores según su grupo funcional es importante de cara al análisis, comprensión e investigación de los mecanismos de inhibición y métodos de detoxificación. En este sentido, más de 100 compuestos han sido detectados como potenciales inhibidores, aunque muchos no han sido estudiados fehacientemente, Luo *et al.* (2002). Los inhibidores procedentes de la biomasa lignocelulósica se pueden clasificar, según su grupo funcional, en cuatro grupos: ácidos orgánicos, aldehídos, cetonas, y compuestos fenólicos. Junto a estos se pueden citar metales y otros compuestos como puede ser SO₂, que aparecen como resultado de la corrosión de equipos o aditivos, Liu y Blaschek (2010). Estos autores recogen una clasificación de los inhibidores más representativos según su grupo funcional, Tabla 2.16. Donde también se ha indicado el peso molecular de cada uno de estos, de gran relevancia dado que según Clark y Mackie (1984) y Sierra-Álvarez y Lettinga (1991), los compuestos con menor peso molecular muestran un mayor efecto tóxico, a lo que Liu y Blaschek (2010), añaden que podría deberse a la facilidad de transporte de las pequeñas moléculas mediante varios mecanismos, incluyendo la difusión ordinaria.

Los mecanismos para la detoxificación de hidrolizados se pueden clasificar en: físicos, químicos y biológicos. Se desarrollan a continuación.

Tabla 2.16: Clasificación de los principales compuestos inhibidores basada en su grupo funcional. Fuente: Liu y Blaschek, 2010.

Grupo	Compuesto	P.M. (g/mol)
Aldehídos	Furano-2-carbaldehído (Furfural)	96,09
	5-(hidroximetil)furano-2-carbaldehído (5-(hidroximetil)furfural; HMF)	126,11
	4-hydroxibenzaldehído (HBA)	122,12
	4-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído (vainillina)	152,15
	4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído (siringaldehído)	182,17
	Cetonas	1-(4-hydroxifenil)etanona (4-hidroxiacetofenona)
1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)atanona (acetovainillina)		166,17
1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)etanoni (acetosiringona)		196,20
Fenoles		Fenol
	Benceno-1,2-diol (catecol)	110,11
	Benceno-1,4-diol (hidroquinona)	110,11
	4-etilbenceno-1,2-diol (etilcatecol)	138,16
	2-metoxifenol (guayacol)	124,14
	2-metoxi-4-(prop-2-en-1-il)fenol (eugenol)	164,20
	4-(hidroximetil)-2-metoxifenol (alcohol vainilico)	154,16
Ácidos orgánicos	Ácido acético	60,05
	Ácido fórmico	46,03
	Ácido 4-Oxopentanoico (ácido levulínico)	116,12
	Ácido (2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-prop-2-enoico (ácido ferúlico)	194,18
	Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico (Ácido vainilico)	168,15
	Ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (Ácido gálico)	170,12
	Ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico (ácido siríngico)	198,17

2.4.1. Métodos físicos

Los métodos físicos más empleados son: evaporación a vacío y extracción con disolventes orgánicos, Tabla 2.17.

Tabla 2.17: Métodos de detoxificación físicos.

Método	Fundamento	Efectos	Referencias
Evaporación	Concentración de los hidrolizados mediante vacío con objeto de eliminar compuestos volátiles.	Eliminación total o parcial de furfural, HMF, ácido acético y otros compuestos volátiles. Concentración de inhibidores no volatilizados.	Parajó <i>et al.</i> (1997b), Silva y Roberto (1999), Rodrigues <i>et al.</i> (2001), Rivas <i>et al.</i> (2002), Mussatto y Roberto (2004), Mateo (2011).
Extracción	Uso de disolventes orgánicos (dietiléter, acetato de etilo, triclorometano, tricloroetano o hexano) para transferir los inhibidores desde la fase acuosa a la fase orgánica, de la que son retirados.	Eliminación total o parcial de ácido acético, ácido fórmico y ácido levulínico, furfural, HMF y derivados del ácido hidroxibenzoico. Es un método con alta especificidad.	Parajó <i>et al.</i> (1997a), Converti <i>et al.</i> (1999), Cruz <i>et al.</i> (1999), Stoutenburg <i>et al.</i> (2011), Mateo <i>et al.</i> (2013a).

2.4.2. Métodos físico-químicos

Durante estas últimas décadas, los métodos físico-químicos más empleados han sido: adsorción con carbón activo, utilización de compuestos reductores, resinas de intercambio iónico, 'liming' o alcalinización, neutralización y 'overliming' o alcalinización combinada, Tabla 2.18.

Tabla 2.18: Métodos de detoxificación físico-químicos.

Método	Fundamento	Efectos	Referencias
Adsorción con carbón activo	Las variables que controlan el proceso son: pH, concentración de adsorbente, temperatura y agitación. Una vez realizado el tratamiento, se separan ambas fases por centrifugación o filtración a vacío. El carbón puede regenerarse.	Reducción en la concentración de compuestos tóxicos: furfural, HMF, fenoles y ácido acético. Según el procedimiento pueden darse reducciones de la concentración en monosacáridos y volumen.	Parajó <i>et al.</i> (1997b), Parajó <i>et al.</i> (1997a), Canilha <i>et al.</i> (2004), Carvalheiro <i>et al.</i> (2005), Villareal <i>et al.</i> (2006), Kamal <i>et al.</i> (2011), Mateo <i>et al.</i> (2013a)
Compuestos reductores	Adición de compuestos reductores tales como: borohidrato sódico, diatonta sódica, bisulfito o sulfito sódico; directamente al biorreactor. El proceso es controlado por la concentración de agente reductor. No es necesaria una separación post-tratamiento.	Reducción de la reactividad de: ácido ferúlico, p-benzoquinona, coniferil aldehído, 2,6-di-metoxi-benzoquinona y furfural. Existe cierta contracción en cuando a su efectividad.	Parajó <i>et al.</i> (1997a, 1997b), Alriksson <i>et al.</i> (2011), Cavka <i>et al.</i> (2011), Cavka y Jönsson (2013).
Intercambio iónico	Las resinas pueden ser catiónicas o aniónicas y pueden ser regeneradas. El proceso puede ser de una o varias etapas, continuo o discontinuo y alternando el tipo de resina. Las resinas se contienen en columnas.	Pérdidas en monosacáridos menores o similares a la adsorción con carbón activo, presenta un mayor rendimiento en reducción de ácidos alifáticos y fenoles, y similar en furanos. Alto coste.	Canilha <i>et al.</i> (2004), Carvalheiro <i>et al.</i> (2005), Villareal <i>et al.</i> (2006)
'Liming'	En la detoxificación alcalina o "liming" se añade: CaO, Ca(OH) ₂ , o NaOH; al hidrolizado para, tras alcanzar un pH y durante un tiempo de contacto determinado, separar las fases por filtración o centrifugación.	Eliminación parcial por precipitación de ácidos alifáticos, fenoles e iones metálicos. Según el procedimiento pueden incrementarse las pérdidas en azúcares y pérdidas de volumen.	Mateo <i>et al.</i> (2013a)
Neutralización	El objetivo es provocar la precipitación de compuestos tóxicos por neutralización del hidrolizado utilizando: hidróxidos de bario, calcio, sodio y potasio, carbonato cálcico y dióxido de calcio.	Precipitación total o parcial de metales pesados, furfural, HMF, ácido acético, levulínico y fórmico, taninos, terpenos y fenoles.	Parajó <i>et al.</i> (1997a), Carvalheiro <i>et al.</i> (2005), Tian <i>et al.</i> (2009)
'Overliming'	La detoxificación alcalina combinada, se ha llevado a cabo bajo diferentes procedimientos. Con el denominador común de un aumento de pH (≈10) y posterior acidificación (≈5,5). Ambos tratamientos conllevan un tiempo de contacto determinado y posterior separación.	Eliminación parcial por precipitación de ácidos alifáticos, fenoles e iones metálicos; además de provocar la conversión de otros compuestos (ej. furfural a ácido furfúrico). Las pérdidas de azúcares son mayores que al aplicar 'liming'. También existe pérdida de volumen.	Parajó <i>et al.</i> (1997a), Carvalheiro <i>et al.</i> (2005), Mateo <i>et al.</i> (2013a)

2.4.3. Métodos biológicos

Consisten en la utilización de enzimas o microorganismos específicos que actúan sobre los compuestos tóxicos presentes en los hidrolizados o microorganismos que ofrecen tolerancia por adaptación al hidrolizado o por modificación genética, Tabla 2.19. Estos métodos son los menos empleados, debido a sus inconvenientes: coste y lentitud del proceso, García (2007).

Tabla 2.19: Métodos de detoxificación biológicos.

Método	Fundamento	Efectos	Referencias
Microorganismos o enzimas	Tratamiento del hidrolizado con enzimas o microorganismos específicos.	Eliminación total o parcial o cambio en la estructura de compuestos tóxicos tales como: furanos, ácidos aromáticos y alifáticos.	Palmqvist <i>et al.</i> (1997), Martin <i>et al.</i> (2002), Chandel <i>et al.</i> (2007), Jurado <i>et al.</i> (2009), Fonseca <i>et al.</i> (2013).
Adaptación	Adaptación del microorganismo al hidrolizado mediante la reutilización del inóculo en sucesivas fermentaciones.	Aumento de la disponibilidad de distintas cepas de levadura capaces de fermentar diferentes hidrolizados con grandes productividades y rendimientos.	Keller <i>et al.</i> (1998), Silva y Roberto (2001a), Liu <i>et al.</i> (2005), Linde <i>et al.</i> (2008).
Modificación genética o metabólica	Empleo de la ingeniería genética o metabólica para potenciar la resistencia o detoxificación de compuestos tóxicos.	Potenciación de la resistencia o capacidad para la detoxificación de compuestos tóxicos.	Petersson <i>et al.</i> (2006), Laadan <i>et al.</i> (2008), Liu <i>et al.</i> (2008).

Una correcta detoxificación del hidrolizado no conlleva a una exitosa fermentación posterior. Para conseguir un adecuado desarrollo celular y rendimientos elevados se deben conocer los umbrales de toxicidad específicos para el microorganismo que se vaya a utilizar y detoxificar el hidrolizado respecto a los mismos. De tal forma, se debe atender a consideraciones como son los beneficios de la concentración de los azúcares presentes en el hidrolizado, ya que favorecería la bioproducción de xilitol, aunque presenta el inconveniente de concentrar los compuestos tóxicos no volátiles, Parajó *et al.* (1998a). Otra alternativa es la ejecución de métodos de detoxificación combinados, Converti *et al.* (1999), con el objetivo de ampliar el número de compuestos detoxificados o la eficacia del tratamiento conjunto. En este sentido, pueden citarse los trabajos de Canilha *et al.* (2004),

donde emplean conjuntamente neutralización y adsorción con carbón activo en comparación con una secuencia en serie con cuatro tipos de resinas de intercambio iónico utilizando hidrolizado hemicelulósico concentrado de madera de eucalipto. Estos autores señalan la ventaja, en cuanto a producción de xilitol, del tratamiento con resinas (0,76 kg kg⁻¹) sobre el tratamiento con carbón activo (0,66 kg kg⁻¹). Esta misma conclusión es señalada más tarde por Viñals *et al.* (2006), los cuales fermentan bagazo de caña de azúcar con la levadura *C. guilliermondii* para obtener: xilitol, etanol y glicerol. Sin embargo, el tratamiento con resinas es un proceso costoso comparado con otros tratamientos, Lee *et al.* (1999). Por último, cabe citar los trabajos de Mateo *et al.* (2013a), los cuales emplean hidrolizados hemicelulósicos de poda de olivo concentrado, usando métodos de neutralización, precipitación, adsorción y extracción; en este último trabajo se determina como tratamiento más prometedor la adsorción con carbón activo en las siguientes condiciones de operación: 2 % de adsorbente, pH = 2, 30 °C, 200 rpm y 30 min. Estas mismas condiciones se han empleado en el presente estudio cuando ha sido requerido.

2.5. Producción biotecnológica de etanol y xilitol

La producción de etanol y xilitol por vía bioquímica, utilizando como fuente de carbono los azúcares (hexosas y pentosas) contenidos en los materiales lignocelulósicos, constituye una estrategia potencial pero no sencilla. Como se viene argumentado en los apartados anteriores, requiere la aplicación de diferentes tratamientos con objeto de preparar un caldo de cultivo adecuado para el desarrollo de los microorganismos intermediarios en la producción de dichos bioproductos.

La fermentación va a ser el proceso de transformación al que se van a someter los hidrolizados hemicelulósicos de poda de olivo en el presente estudio. Consiste en la transformación de un sustrato (compuesto orgánico o inorgánico) por acción de enzimas, bien in vivo o in vitro, Camacho *et al.* (1986). De acuerdo con Moya (1997), en la fermentación in vivo, los microorganismos, van a requerir de un medio de cultivo adecuado, donde se van a desarrollar y, en función de la finalidad del proceso, se obtendrán bioproductos (ácidos orgánicos, alcoholes, aminoácidos, antibióticos, cetonas, enzimas, esteroides y vitaminas) o biomasa. Esta última opción resulta de interés para obtener levaduras de panadería o para el tratamiento secundario de aguas residuales.

2.5.1. Etanol. Características, propiedades, usos y producción.

El etanol, Tabla 2.20, también es conocido como: alcohol etílico, etanol absoluto, alcohol anhidro, alcohol de fermentación o alcohol de grano. Presenta un precio aproximado en el mercado de 0,65 € kg⁻¹, Mussatto *et al.* (2013) o 0,70 € kg⁻¹, Global Petrol Prices (2019) y se utiliza principalmente en la industria química (combustible directo o por mezcla, producción de acetaldehído, butadieno, cloruro de etilo, nitrocelulosa, etc.), alimentaria (bebidas, vinagre, etc.) y farmacéutica y cosmética. También se emplea en el ámbito de la biología (preservación de especímenes fisiológicos y patológicos) y medicina (antiséptico en cirugía). Un tipo de etanol altamente tóxico es el denominado alcohol desnaturalizado, consistente en etanol al que se agregan sustancias como metanol, isopropanol e incluso, piridinas o benceno.

Tabla 2.20: Características físico-químicas, termodinámicas y de peligrosidad del etanol.
Fuente: Universidad Nacional Autónoma de México (2018).

Fórmula química	C ₂ H ₆ O
Peso molecular	46,07 g/mol
Apariencia	Líquido inflamable
Olor	Característico
Color	Incoloro
Sabor	Picante
Densidad	0,7893 kg/m ³ (20 °C)
Momento dipolar	1,699 debyes
Constante dieléctrica	25,7 (20 °C)
Densidad de vapor	1,59 g/cm ³
Solubilidad	Agua, éter, metanol, cloroformo y acetona
Viscosidad	1,17 cP (20 °C)
Índice de refracción	1,361 (20 °C)
Tensión superficial	231 din/cm (25 °C)
Conductividad térmica	0,17 W/m K (20 °C)
Temperatura crítica	243,1 °C
Presión crítica	63,116 atm
Volumen crítico	0,167 dm ³ /mol
Punto de fusión	-130 °C
Punto de ebullición	78,3 °C
Presión de vapor	59 mm de Hg (20 °C)
Calor específico	2,42 J/g °C (20 °C)
Calor de vaporización en el punto normal de ebullición	839,31 J/g
Calor de combustión	29677,69 J/g (20 °C)
Calor de fusión	104,6 J/g
Temperatura de ignición	363 °C
Temperatura de autoignición	793 °C
Punto de congelación	-114,1 °C
Punto de inflamación	12 °C (al 100 %), 17 °C (al 96 %), 20 °C (al 80 %), 21 °C (al 70 %), 24 °C (al 50 %), 36 °C (al 20 %), 49 °C (al 10 %), 62 °C (al 5 %).
Límite de explosividad	3,3 - 19 %

De entre todos estos usos, la mayoría de los estudios reportan principalmente su aplicación como combustible y en menor medida para la industria de bebidas. Pese a los primeros intentos europeos, Brasil, aparece como país pionero en la puesta a punto de proyectos para la producción industrial y venta directa de etanol, ya que con anterioridad

a la Segunda Guerra Mundial comenzaron a producir este tipo de combustible, Mussatto *et al.* (2010). Por este motivo, ha sido durante años líder mundial en producción, contando actualmente con más de dos millones de coches y estaciones de servicio donde se vende etanol del 95 % o una mezcla de etanol y gasolina (25:75). Sin embargo, según fuentes de la Agencia para la Información Energética de los Estados Unidos de América (EIA), Tabla 2.21, hoy día E.E.U.U. ocuparía la primera plaza en cuanto a producción se refiere, seguido por: Brasil, países de la Unión Europea en conjunto, China, Canadá y Tailandia. En el caso de España, según los datos más recientes publicados por el Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDAE), habría producido en 2016 un total de 146 millones de galones, repartidos entre las comunidades autónomas de Galicia, Murcia, Castilla-La Mancha y Castilla y León.

Tabla 2.21: Producción mundial de etanol en los principales países y regiones productoras. Fuente: Agencia para la Información Energética de los E.E.U.U. (EIA) (2017).

País	Producción	
	Millones de Galones	Representación, %
E.E.U.U.	15800	58
Brasil	7060	26
Unión Europea	1415	5
China	875	3
Canadá	450	2
Tailandia	395	2
Argentina	310	1
India	280	1
Resto del mundo	465	2
Mundial	29084	100

La producción biotecnológica de etanol a partir de materias primas ricas en carbohidratos es una industria histórica cuyos procesos han sido heredados de la industria de producción de bebidas, Inui *et al.* (2010), Demirbas (2011). A otro lado queda la producción por síntesis química que, según Hamelinck *et al.* (2003), quedaría relegada a un 7% del total.

La producción sintética de etanol puede llevarse a cabo por las siguientes vías:

- i) Producción por hidratación del etileno. En un reactor de columna se hace reaccionar etileno con ácido sulfúrico. El monosulfato resultante se hidroliza con agua y, finalmente, se procede a la separación del etanol y el ácido sulfúrico.
- ii) Producción por hidratación directa. En un reactor de lecho fijo con presencia de un catalizador, se hace reaccionar un gas rico en etileno con agua. El etanol generado se recupera por destilación.
- iii) Producción por hidrogenación de acetileno. Se hace reaccionar acetileno y agua, empleando ácido sulfúrico y sulfato de mercurio. El etanol es producido por hidrogenación catalítica a partir del acetileno producido.
- iv) Proceso Fischer-Tropsch (1920). Es un proceso genérico de producción de hidrocarburos. Consiste en la adsorción de monóxido de carbono sobre la superficie de un catalizador, seguido de dos etapas de polimerización: la primera por disociación de monóxido de carbono e hidrogenación (formación de radicales metilo), y la segunda por adición de monóxido de carbono e hidrógeno molecular con la consecuente liberación de agua (polimerización por condensación). Finalmente se lleva a cabo la desorción del producto.

Actualmente, la producción biotecnológica de etanol se lleva a cabo industrialmente a partir de biomasa primaria utilizando como materias primas principales caña de azúcar (Brasil), maíz (E.E.U.U.), Balat y Balat (2009), trigo, remolacha (Europa) y otros, Hamelinck (2013). La producción de este bioproducto a partir de biomasa lignocelulósica o microalgas, Chisti (2008), es a día de hoy objeto de múltiples proyectos de investigación y cuyo traslado a escala industrial es muy reciente.

2.5.2. Xilitol. Características, propiedades, usos y producción.

El xilitol (1,2,3,4,5-pentahidroxi pentano), Tabla 2.22, es un alcohol de azúcar edulcorante con una gran presencia en el mercado. La producción mundial fue de aproximadamente 190.900 t en 2016 y se prevé que alcance 266.000 t año⁻¹ en 2022, Industry Experts (2017). Su precio de mercado ha evolucionado desde 2,14 € kg⁻¹ en 2013, Mussatto *et al.* (2013), hasta 3,5 € kg⁻¹ en 2019, según revisión de la fuente de precios dada por esta autora. Su descubrimiento, en 1891, se atribuye al premio Nobel de Química, Emil Fisher y a su alumno Rudolf Stahel, Fisher y Stahel (1891). Tras su descubrimiento fue olvidado hasta la aparición de estudios que demostraron el poder del xilitol como intermediario en el metabolismo humano. A partir de aquí, surgen numerosos trabajos con el objetivo de estudiar y mejorar las tecnologías de producción y nuevas aplicaciones. Desde 1994, con la Directiva Europea 94/35/EC sobre uso de edulcorantes en productos alimentarios, queda codificado como E967.

Tabla 2.22: Características físico-químicas del xilitol

Fórmula química	C ₅ H ₁₂ O ₅
Peso molecular	152,15 g/mol
Densidad	1,50 kg/m ³ (15 °C)
Color	Blanco
Sabor	Dulce
Olor	Inodoro
Apariencia	Cristales ortorrómbicos o monoclinicos
Viscosidad	A 20 °C, 1,23 cP (a 10%), 20,63 cP (a 60%)
Solubilidad	En agua a 20 °C: 64,2 g/100 g H ₂ O
Estabilidad	Estable a 120 °C y en condiciones normales. Carameliza cuando se calienta varios minutos y próximo a su punto de ebullición.
Poder edulcorante relativo	Igual a la sacarosa, superior al sorbitol y manitol
Calor de disolución	-34,8 cal/g
Valor calórico	2,4 kcal/g
Punto de fusión	92 – 96 °C
Punto de ebullición	216 °C (760 mmHg)
Hidroscopicidad	Superior a la sacarosa, pero menos que el sorbitol (con una humedad relativa alta)

El xilitol presenta diferentes propiedades, y por consiguiente, diferentes aplicaciones, de ahí su importancia económica. Entre sus principales propiedades y aplicaciones cabe citar:

- ✿ Poder edulcorante con menor aporte calórico que la sacarosa. El xilitol posee un poder edulcorante similar a la sacarosa, 1,7 veces superior al sorbitol y 2 veces superior al manitol. Por ello, es un perfecto sustituto de azúcares convencionales en: postres y productos similares, productos de confitería, panadería, goma de mascar sin azúcares añadidos, salsas, mostaza, productos de alimentación especial y complementos alimenticios integradores de regímenes dietéticos sólidos (Directiva 94/35/EC).
- ✿ Poder anticariogénico. Al no ser fermentado por los microorganismos de la flora bucal, evita: el crecimiento de los mismos (placa bacteriana), la aparición de caries, la reducción de pH y por tanto previene el ataque del esmalte dental, mejora la remineralización de los efectos adversos de la caries, Parajó *et al.* (1998b).
- ✿ Metabolismo no dependiente de la insulina. Su metabolismo no depende de la insulina y no necesita del enzima D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, por lo que junto a D-fructosa, el xilitol aparece como un azúcar recomendado para el tratamiento de desórdenes metabólicos: diabetes o anemia hemolítica, Canilha (2006).
- ✿ Calor de disolución negativo. Provoca un efecto refrescante en la cavidad oral y nasal, por lo que se emplea en la fabricación de pastas dentales, expectorantes o complementos dietéticos entre otros, Parajó *et al.* (1998b).
- ✿ No sigue la reacción de Maillard. Al no poseer aldehídos o cetonas en su molécula no sigue dichas reacciones, las cuales, provocan el oscurecimiento y pérdida de valor nutricional de proteínas. Su uso en la preparación de alimentos es muy favorable, pudiendo incluso prescindir de la pasteurización u otros aditivos, Canilha (2006).
- ✿ Poder antibacteriano. Se emplea en fármacos para tratar la otitis (*Streptococcus pneumoia*, *Haemophilus influenzae*), Canilha (2006), García (2007) y en pacientes con trasplante de pulmón ante la infección causada por microorganismos oportunistas (*Burkholderia cepaciae*), Canilha (2006).

- Tratamiento contra la osteoporosis. Algunos estudios reportan los tratamientos con xilitol para la prevención de la pérdida de densidad y el contenido en minerales en el sistema óseo, Canilha (2006).

Puede encontrarse xilitol de manera natural en algunas frutas (fresas, frambuesas y ciruelas), verduras (espinacas, lechuga, coliflor, etc.), Prakasham *et al.* (2009) y también como intermediario en el metabolismo de los carbohidratos en mamíferos, con una producción diaria, por ejemplo: en el caso de un humano adulto, de entre 5 y 15 g de xilitol, Parajó *et al.* (1998b).

A pesar de estar disponible en los productos anteriores, no es posible su extracción directa (extracción sólido-líquido) debido a las bajas concentraciones de xilitol presentes en las mismas (900 mg - 100 g), Parajó *et al.* (1998b), Soleimani *et al.* (2006), Prakasham *et al.* (2009). De tal forma, la obtención de xilitol comercial se lleva a cabo por vía química, mediante la hidrogenación catalítica de D-xilosa. Las etapas básicas son las siguientes:

- i) Obtención de D-xilosa.
 - i.i) Hidrólisis del material lignocelulósico para obtener una disolución heterogénea rica en azúcares y otros compuestos.
 - i.ii) Purificación de la disolución obtenida (fraccionamiento por cromatografía) y concentración para obtener altas concentraciones de D-xilosa.
- ii) Reacción de hidrogenación. En presencia de un catalizador (aleación Ni-Raney, Cuevas (2007)) y empleando una corriente de hidrógeno gaseoso a temperaturas de entre 80-140 °C y presiones de entre 40 y 70 atm, Mateo (2011).
- iii) Purificación de la disolución de xilitol obtenida. Indispensable para eliminar los restos de catalizador, debido a su carácter tóxico para la salud humana.
- iv) Recuperación del xilitol.
- v) Cristalización del xilitol.

El empleo de equipos tecnológicamente avanzados (donde se opera a altas temperaturas, elevadas presiones y con catalizadores caros), los bajos rendimientos de conversión (50-60 % de la fracción correspondiente a xilano), la necesidad de aplicar diferentes unidades de operación (equipos complementarios) previas y posteriores a la propia reacción de hidrogenación, provocan que la producción vía química del xilitol sea

una operación cara, Saha (2003), Soleimani *et al.* (2006). Por estos motivos, una nueva vía de producción está siendo estudiada por numerosos investigadores, consistente en la producción mediada por microorganismos.

La producción biotecnológica de xilitol aparece como una alternativa atractiva a la producción por vía química. Persigue reducir costes y el impacto ambiental, respecto al proceso químico, empleando condiciones más suaves de presión y temperatura, Kim *et al.* (2004), Soleimani *et al.* (2006), Domínguez *et al.* (2012). Las etapas básicas del proceso son las siguientes:

- i) Obtención de D-xilosa.
 - i.i) Hidrólisis del material lignocelulósico para obtener una disolución heterogénea rica en azúcares y otros compuestos.
 - i.ii) Acondicionamiento del hidrolizado. Varía en función del material de partida y del microorganismo a utilizar (ajuste de pH, detoxificación,...).
- ii) Fermentación de D-xilosa. Su optimización conlleva el control de diferentes variables (apartado 2.5.5), las cuales son específicas para cada microorganismo y para cada hidrolizado.
- iii) Recuperación del xilitol. Es una etapa difícil debido al reducido tamaño de las moléculas de xilitol (960-990 μm de longitud y 300-330 pm de radio), Soleimani *et al.* (2006), a la composición compleja y heterogénea del licor resultante y a la generalizada baja concentración del producto, De Faveri *et al.* (2002). La tecnología para la recuperación del xilitol se basa en métodos tales como: resinas de intercambio iónico, carbón activado y cromatografía. Pueden emplearse etapas previas de purificación como son: extracción sólido-líquido de fenoles, Mussatto *et al.* (2005), o tecnologías de membrana, Mateo (2011).
- iv) Cristalización del xilitol. La elección del proceso (enfriamiento, evaporación, precipitación o proceso 'salting-out') se basa en las curvas de solubilidad y saturación, Acosta *et al.* (2008). En este sentido, De Faveri *et al.* (2002), emplearon una secuencia basada en: evaporación, enfriamiento, centrifugación y filtración. Esta secuencia fue aplicada a los licores resultantes de la fermentación de medios sintéticos e hidrolizados hemicelulósicos, para obtener en el mejor de los casos disoluciones de hasta 730 kg xilitol m^{-3} a temperatura de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.5.3. Microorganismos utilizados

Los microorganismos más utilizados y de mayor importancia técnica se distribuyen entre: bacterias, hongos, levaduras (hongos unicelulares) y microalgas. En su mayoría son mesófilos (25 – 40 °C) y en general anaerobios no estrictos y muy sensibles al oxígeno, Moya (1997). Este mismo autor señala como bacterias de mayor interés industrial las pertenecientes a las órdenes: Eubacteriales, Pseudomonales y Actinomycetales. Aunque son las levaduras, los microorganismos más estudiados por su alta eficiencia fermentativa, Ping *et al.* (2013). En la Tabla 2.23, se recogen las levaduras y hongos pertenecientes a la clase Ascomycetes con interés industrial en los procesos de fermentación, aunque la literatura reporta como los más influyentes: *Candida boidinii*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis* o *Debaryomyces hanseni*; para la bioconversión de D-xilosa a xilitol, Saha (2003), Ping *et al.* (2013). En cuanto a la bioconversión a etanol pueden citarse: *Saccharomyces cerevisiae* (hexosas) y *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* o *Pachysolen tannophilus* (hexosas y pentosas), Agbogbo *et al.* (2006), Silva *et al.* (2010).

Tabla 2.23. Levaduras y hongos de la clase Ascomycetes con interés Industrial en procesos de fermentación.

Familia	Género	Especie
Saccharomycetae	<i>Candida</i>	<i>guilliermondii</i>
	<i>Candida</i>	<i>tropicalis</i>
	<i>Candida</i>	<i>shehatae</i>
	<i>Candida</i>	<i>boidinii</i>
	<i>Debaryomyces</i>	<i>hanseni</i>
	<i>Hansenula</i>	<i>polymorpha</i>
	<i>Kluyveromyces</i>	<i>marxianus</i>
	<i>Pachysolen</i>	<i>tannophilus</i>
	<i>Pichia</i>	<i>stipitis</i>
	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
Eurotiaceae	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>pombe</i>
	<i>Apergillus</i>	<i>flavus</i>
	<i>Apergillus</i>	<i>niger</i>
	<i>Apergillus</i>	<i>terreus</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>chrysogenum</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>griseoflovum</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>notatum</i>

El bioproducto final deseado, junto a las características del material de partida (monosacáridos mayoritarios, tipo y concentración de inhibidores), es también clave a la hora de escoger un microorganismo u otro, por tal motivo, se ha elaborado la Tabla 2.24, donde se muestran antecedentes bibliográficos donde se recogen datos referentes: al microorganismo empleado, al material de partida, a los rendimientos y a las productividades volumétricas.

Por último, citar la alternativa que supone la utilización de microorganismos genéticamente modificados, cuyo objetivo es permitir que el microorganismo pueda fermentar monosacáridos que en su forma natural no metaboliza. En este sentido, se pueden citar los estudios realizados por: Deng y Ho (1990), los cuales introducen genes de *P. stipitis* en una especie híbrida del género *Saccharomyces* resultando la cepa pLNH32, capaz de metabolizar D-xilosa; los realizados por Hahn-Hägerdal y Pamment (2004), donde obtuvieron un rendimiento en etanol de 0,43 kg kg⁻¹ (azúcares totales) y una productividad de 0,27 kg m⁻³ h⁻¹, a partir de la cepa TMB 3400 de *S. cerevisiae*; o los realizados por Öhgren *et al.* (2006), donde obtienen un rendimiento en azúcares totales de 0,32 kg kg⁻¹, a partir de rastrojo de maíz por hidrólisis y fermentación simultáneas, sin necesidad de detoxificación. En cualquier caso, según Saha (2003) y Hahn-Hägerdal *et al.* (2007), los estudios en este campo deben continuar para que la utilización a escala industrial sea posible, y esto pasa por crear organismos resistentes a inhibidores generados en los pretratamientos y capaces de fermentar todos los monosacáridos hemicelulósicos.

Tabla 2.24: Estudios de fermentación para la producción de etanol y xilitol con levaduras.

Microorganismo	Sustrato	Producto	$Y_{p/s}$, kg kg ⁻¹	Q_p , kg m ⁻³ h ⁻¹	Referencia
<i>C. boidinii</i> UFMG14	(1)	E	0,40 ^E	0,25 ^E	Gonçalves <i>et al.</i> (2013)
<i>C. shehatae</i> NCIM 3501	(2)	E	0,48 ^E	0,36 ^E	Chandel <i>et al.</i> (2007)
<i>C. shehatae</i>	(3)	E/Xi	0,40 ^E /0,13 ^{Xi}	-	Hickert <i>et al.</i> (2013)
<i>C. shehatae</i> – <i>S. cerevisiae</i> ^(a)	(3)	E/Xi	0,51 ^E /0,13 ^{Xi}	-	Hickert <i>et al.</i> (2013)
<i>C. shehatae</i> – <i>S. cerevisiae</i> ^(b)	(3)	E	0,48 ^E	-	Hickert <i>et al.</i> (2013)
<i>C. shehatae</i> – <i>S. cerevisiae</i> ^(c)	(3)	E/Xi	0,44 ^E /0,11 ^{Xi}	-	Hickert <i>et al.</i> (2013)
<i>C. tropicalis</i>	(4)	Xi	0,78 ^{Xi}	0,37 ^{Xi}	Kamal <i>et al.</i> (2011)
<i>C. tropicalis</i> ^(d)	(5)	Xi	0,45 ^{Xi}	-	Rao <i>et al.</i> (2006)
<i>C. tropicalis</i> ^(d)	(6)	Xi	0,43 ^{Xi}	-	Rao <i>et al.</i> (2006)
<i>C. tropicalis</i> ^(e)	(7)	Xi	0,65 ^{Xi}	-	Rao <i>et al.</i> (2006)
<i>C. tropicalis</i> ^(e)	(7)	Xi	0,58 ^{Xi}	-	Rao <i>et al.</i> (2006)
<i>C. tropicalis</i> NBRC 0618	(9)	E/Xi	0,44 ^E /0,13 ^{Xi}	-	García <i>et al.</i> (2010)
	(10)	E/Xi	0,38 ^E /0,23 ^{Xi}	-	Mateo (2011)
<i>Debaryomyces hansenii</i> ^(f)	(11)	Xi	0,76 ^{Xi}	0,44 ^{Xi}	Prakash <i>et al.</i> (2011)
<i>Debaryomyces hansenii</i> ^(f)	(12)	Xi	0,69 ^{Xi}	0,28 ^{Xi}	Prakash <i>et al.</i> (2011)
<i>D. hansenii</i>	(13)	Xi	0,77 ^{Xi}	1,10 ^{Xi}	Sampaio <i>et al.</i> (2006)
<i>K. marxianus</i>	(14)	E	0,39 ^E	-	Pessani <i>et al.</i> (2011)
<i>K. marxianus</i> CECT 10875	(15)	E	0,40 ^E	0,31 ^E	Moreno <i>et al.</i> (2013)
<i>P. tannophilus</i> NRRL Y-2460	(16)	E/Xi	0,77 ^E /0,20 ^{Xi}	0,30 ^E /0,04 ^{Xi}	Converti <i>et al.</i> (2001)
<i>P. tannophilus</i> ATCC 32691	(17)	E/Xi	0,39 ^E /0,14 ^{Xi}	-	Sánchez <i>et al.</i> (2004)
<i>P. tannophilus</i> MTCC 1077	(18)	E	0,28 ^E	0,77 ^E	Sathesh-Prabu y Murugesan (2011)
<i>S. cerevisiae</i> MTCC 173	(18)	E	0,34 ^E	0,94 ^E	Sathesh-Prabu y Murugesan (2011)

(a) Co-cultivo en relación 1:1,25 de *C. shehatae* y *S. cerevisiae*, realizada en agitador orbital, (b) Idem a (a) pero en biorreactor en condiciones anaerobias. (c) Idem a (b) pero con oxígeno limitado. (d) Células aisladas a partir de muestra de suelo. (e) Idem a (d) pero con células adaptadas al hidrolizado. (f) Células aisladas para este estudio a partir de uvas maduras. (1) hidrolizado hemicelulósico detoxificado y suplementado de pasta de macauba. (2) y (12) hidrolizado hemicelulósico, detoxificado y suplementado de bagazo de caña. (3) hidrolizado hemicelulósico concentrado, detoxificado y suplementado de cáscara de arroz. (4) hidrolizado hemicelulósico detoxificado y concentrado de madera de sago. (5) y (7) hidrolizado hemicelulósico suplementado de bagazo de caña. (6) y (8) hidrolizado hemicelulósico suplementado de fibra de maíz. (9) y (10) hidrolizado hemicelulósico suplementado de poda de olivo. (11), (13) y (17) medio sintético. (14) sacarificación y fermentación simultáneas a partir de pasto varilla pretratada. (15) sacarificación y fermentación simultáneas de paja de arroz pretratada y detoxificada. (16) hidrolizado hemicelulósico. (18) hidrolizado hemicelulósico y celulósico suplementado de paja de sorgo.

2.5.3.1. *Candida guilliermondii*

La levadura *Candida guilliermondii* aparece en la bibliografía como un microorganismo altamente eficiente en la producción de xilitol a partir de D-xilosa. Si bien, es capaz de metabolizar hexosas y pentosas, para producir etanol y xilitol, Schirmer-Michel *et al.* (2008), Aguiar *et al.* (2002).

Para entender con detalle el comportamiento de la levadura, frente a diferentes sustratos y frente a diferentes valores de las variables de operación más influyentes, se ha elaborado la Tabla 2.25, donde se recopilan una serie de antecedentes indicándose: colección a la que pertenece cada cepa, medio de cultivo y los tratamientos a que se ha sometido éste, concentración inicial de inóculo, agitación, pH, temperatura, variables referentes a la transferencia de oxígeno, rendimiento en bioproductos, productividad volumétrica en producto y tiempo experimental. Aproximándose a los datos aportados en la Tabla 2.25, pueden sacarse una serie de conclusiones como son: el hecho de que la levadura procedente de la colección FTI 20037 sea la más utilizada, el empleo de una concentración de inóculo inicial superior a 1 kg m^{-3} , una agitación superior a 120 rpm con un valor de ω superior a 0,2, una temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, y un coeficiente de transferencia de oxígeno variable ($18\text{-}100 \text{ h}^{-1}$). En cuanto a los resultados, puede citarse, por su elevado valor, los rendimientos en xilitol obtenidos Aguiar *et al.* (2002) y Pereira *et al.* (2011); con valores de: 0,86, 0,85, 0,84, kg kg^{-1} , respectivamente. En cuanto a productividad volumétrica en xilitol, Aguiar *et al.* (2002) aportan un valor de $1,52 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Otros resultados destacables, en cuanto a las productividades volumétricas en xilitol, son destacables las obtenidas por Silva *et al.* (2006), Arruda y Felipe (2009) y Pereira *et al.* (2011), con valores de 1,01, 1,13, y $0,96 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Tabla 2.25: Estudios de fermentación con diferentes cepas de *Candida guilliermondii*.

COLECCIÓN (MEDIO)	PARÁMETROS						RESPUESTAS				Referencia bibliográfica
	x_0	A	pH	ω	Q	T	K_{La}	$Y_{p/s}$	Q_p	t	
NRRL Y-2075 (1)	1-1,5	120	5,5	0,4	-	30	-	0,53 ^E	0,22 ^E	48	Schirmer-Michel <i>et al.</i> (2008)
NRRL Y-2075 (2)	1-1,5	120	5,5	0,4	-	30	-	0,46 ^E	0,24 ^E	24	Schirmer-Michel <i>et al.</i> (2008)
FTI 20037 (3)	0,5	200	6,0	0,4	-	30	-	0,59 ^{Xi}	0,42 ^{Xi}	72	Canilha <i>et al.</i> (2008)
IM 50088 (4)	1,0	-	6,0	-	-	30	20	0,70 ^{Xi}	0,67 ^{Xi}	57	Aguiar <i>et al.</i> (2002)
IM 50088 (4)	4,0	-	6,0	-	-	30	20	0,79 ^{Xi}	0,45 ^{Xi}	60	Aguiar <i>et al.</i> (2002)
IM 50088 (4)	4,0	-	6,0	-	-	30	45	0,86 ^{Xi}	0,91 ^{Xi}	45	Aguiar <i>et al.</i> (2002)
IM 50088 (4)	4,0	-	6,0	-	-	30	100	0,77 ^{Xi}	1,52 ^{Xi}	24	Aguiar <i>et al.</i> (2002)
ATCC 201935 (5)	3,0	200	5,5	0,4	-	30	-	0,81 ^{Xi}	0,87 ^{Xi}	72	Pereira <i>et al.</i> (2011)
ATCC 201935 (6)	3,0	200	5,5	0,4	-	30	-	0,79 ^{Xi}	0,82 ^{Xi}	72	Pereira <i>et al.</i> (2011)
ATCC 201935 (7)	3,0	200	5,5	0,4	-	30	-	0,84 ^{Xi}	0,96 ^{Xi}	72	Pereira <i>et al.</i> (2011)
FTI 20037 (8)	2,0	300	6,7	-	-	30	20	0,69 ^{Xi}	0,68 ^{Xi}	FC	Martínez <i>et at.</i> (2003)
FTI 20037 (9)	1,0	200	5,5	0,4	-	30	-	0,75 ^{Xi}	0,52 ^{Xi}	45	Felipe <i>et al.</i> (1997)
FTI 20037 (10)	1,0	200	6,0	0,4	-	30	-	0,24 ^{Xi}	0,09 ^{Xi}	136	Felipe <i>et al.</i> (1996)
FTI 20037 (10)	4,0	200	6,0	0,4	-	30	-	0,20 ^{Xi}	0,15 ^{Xi}	88	Felipe <i>et al.</i> (1996)
FTI 20037 (11)	-	200	6,5	0,4	-	30	-	0,48 ^{Xi}	0,23 ^{Xi}	130	Roberto <i>et al.</i> (1991)
FTI 20037 (12)	3,0	200	5,3	0,4	-	30	-	0,70 ^{Xi}	0,64 ^{Xi}	55	Roberto <i>et al.</i> (1995)
FTI 20037 (13)	1,0	200	5,3	0,4	-	30	-	0,71 ^{Xi}	0,56 ^{Xi}	72	Roberto <i>et al.</i> (1995)
FTI 20037 (14)	1,0	200	5,5	0,4	-	30	-	0,74 ^{Xi}	0,84 ^{Xi}	72	Arruda y Felipe (2009)
FTI 20037 (15)	1,0	200	5,5	0,4	-	30	-	0,78 ^{Xi}	1,13 ^{Xi}	72	Arruda y Felipe (2009)
FTI 20037 (16)	1,0	200	5,5	0,4	-	30	-	0,74 ^{Xi}	0,75 ^{Xi}	72	Arruda y Felipe (2009)
FTI 20037 (17)	3,0	200	5,5	0,4	-	30	-	0,65 ^{Xi}	0,45 ^{Xi}	72	Villarreal <i>et al.</i> (2006)
FTI 20037 (18)	3,0	200	5,5	0,4	-	30	-	0,57 ^{Xi}	0,68 ^{Xi}	48	Villarreal <i>et al.</i> (2006)
FTI 20037 (19)	1,0	200	6,5	0,4	-	30	-	0,65 ^{Xi}	0,38 ^{Xi}	30	Mussatto <i>et al.</i> (2005)
FTI 20037 (20)	1,0	200	6,5	0,4	-	30	-	0,79 ^{Xi}	0,86 ^{Xi}	96	Mussatto <i>et al.</i> (2005)
FTI 20037 (21)	1,0	200	6,5	0,4	-	30	-	0,37 ^{Xi}	0,13 ^{Xi}	96	Mussatto <i>et al.</i> (2005)
FTI 20037 (22)	1,0	200	6,5	0,4	-	30	-	0,55 ^{Xi}	0,18 ^{Xi}	96	Mussatto <i>et al.</i> (2005)
FTI 20037 (23)	1,0	200	6,5	0,4	-	30	-	0,67 ^{Xi}	0,78 ^{Xi}	96	Mussatto <i>et al.</i> (2005)
FTI 20037 (24)	3,0	200	6,5	0,4	-	30	-	0,72 ^{Xi}	0,55 ^{Xi}	116	Mussatto y Roberto (2004)
FTI 20037 (25)	3,0	400	6,5	-	0,2	30	22	0,53 ^{Xi}	0,32 ^{Xi}	116	Mussatto y Roberto (2004)
FTI 20037 (26)	5,0	250	6,4	0,4	-	30	-	0,61 ^{Xi}	0,64 ^{Xi}	60	Silva y Roberto (2001a)
FTI 20037 (27)	3,0	250	6,4	0,4	-	30	-	0,70 ^{Xi}	0,48 ^{Xi}	119	Silva y Roberto (2001a)
FTI 20037 (28)	1,0	200	6,5	0,4	-	30	-	0,76 ^{Xi}	0,57 ^{Xi}	96	Mussatto y Roberto (2008)
FTI 20037 (29)	3,1	250	6,4	0,4	-	30	-	0,65 ^{Xi}	0,54 ^{Xi}	96	Silva <i>et al.</i> (2006)
FTI 20037 (30)	3,1	250	6,4	0,4	-	30	-	0,59 ^{Xi}	0,54 ^{Xi}	96	Silva <i>et al.</i> (2006)
FTI 20037 (31)	3,1	550	6,4	-	0,73	30	18	0,64 ^{Xi}	1,01 ^{Xi}	65	Silva <i>et al.</i> (2006)
FTI 20037 (32)	5,5	150	5,5	0,2	-	30	-	0,37 ^{Xi}	0,68 ^{Xi}	24	Castro <i>et al.</i> (2013)
NRRL Y-2075 (33)	1,5	150	5,5	-	0	30	0	0,50 ^E	-	12	Schirmer-Michel <i>et al.</i> (2009)
NRRL Y-2075 (33)	1,5	300	5,5	-	1,3	30	8	0,40 ^E	-	24	Schirmer-Michel <i>et al.</i> (2009)
NRRL Y-2075 (33)	1,5	300	5,5	-	1,3	30	8	0,22 ^{Xi}	-	120	Schirmer-Michel <i>et al.</i> (2009)
NRRL Y-2075 (33)	1,5	600	5,5	-	1,3	30	46	0,20 ^E	-	12	Schirmer-Michel <i>et al.</i> (2009)
FTI 20037 (34)	1,0	300	-	-	1,0	30	-	0,78 ^{Xi}	0,62 ^{Xi}	71	Rodrigues <i>et al.</i> (1998)
FTI 20037 (35)	3,0	200	6,5	0,4	-	30	-	0,72 ^{Xi}	0,55 ^{Xi}	116	Mussatto <i>et al.</i> (2004)

x_0 (kg m⁻³), A (rpm), ω (aeración, expresada como: volumen del matraz/volumen del cultivo), Q (dm³ min⁻¹), T (°C). Respuestas: K_{La} (h⁻¹), $Y_{p/s}$ (kg kg⁻¹), Q_p (kg m⁻³ h⁻¹), t (h), E (etanol), Xi (xilitol). FC: fermentación en continuo. Ver medios de cultivo (MEDIOS) en el Apéndice 1.

2.5.3.2. *Pichia stipitis*

Esta levadura ha sido clasificada por diversos autores, Tabla 2.26, como la más eficiente en el proceso de fermentación de D-xilosa a etanol, por ofrecer altos rendimientos y productividades, por lo que aparece como un prometedor microorganismo para ser aplicado a escala industrial, Saha (2003), Agbogbo *et al.* (2006), Hahn-Hägerdal *et al.* (2007).

El comportamiento de esta levadura frente a diferentes sustratos y operando con distintos valores de las variables de operación más influyentes, puede observarse en la Tabla 2.26; se recopilan una serie de antecedentes indicándose: colección a la que pertenece cada cepa, medio de cultivo y los tratamientos a que se han sometido, concentración inicial de inóculo, agitación, pH, temperatura, variables referentes a la transferencia de oxígeno, tiempo experimental al que se refiere estas dos últimos parámetros. En concreto, pueden sacarse una serie de conclusiones como son el empleo generalizado de dos cepas procedentes de dos colecciones como son NRRL Y-7124 y CBS 6054, partir de una concentración de inóculo inicial superior a 1 kg m^{-3} , una agitación superior a 80 rpm con un valor de ω superior a 0,4, una temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, salvo un estudio en el que fijan $28 \text{ }^\circ\text{C}$ y, un coeficiente de transferencia de oxígeno de variable ($0,7 - 12,1 \text{ h}^{-1}$). En cuanto a los resultados, puede citarse, por su elevado valor, el rendimiento en etanol obtenido por Silva *et al.* (2010), con $0,47 \text{ kg kg}^{-1}$ en 48 h de fermentación con *P. stipitis* NRRL Y-7124. En cuanto a la productividad volumétrica en etanol, Roberto *et al.* (1991) aportan un valor de $0,96 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ en 24 h de fermentación con *P. stipitis* CBS 5373. Otros resultados destacables, en cuanto a rendimiento en etanol, son los obtenidos por Agbogbo *et al.* (2006), Arslan y Eken-Saraçoğlu (2010), con valores de $0,45 \text{ kg kg}^{-1}$, en cada caso. En cuanto a las productividades volumétricas en xilitol, se citarán las obtenidas por: Du Preez *et al.* (1986), Nigam (2001a) y Nigam (2001b), con valores de 0,86, 0,54 y $0,44 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Tabla 2.26: Estudios de fermentación con diferentes de cepas de *Pichia stipitis*.

COLECCIÓN (MEDIO)	FACTORES						RESPUESTAS				Referencia bibliográfica
	x_0	A	pH	ω	Q	T	K_{La}	$Y_{p/s}$	Q_p	t	
NRRLY-7124 (1)	1,0	150	5,5	0,4	-	30	-	0,47	0,34	48	Silva <i>et al.</i> (2010)
NRRLY-7124 (2)	1,0	200	5,5	0,4	-	30	-	0,37	0,39	120	Silva <i>et al.</i> (2010)
CBS 6054 (3)	2,0	100	6,3	0,4	-	30	-	0,42	0,24	96	Agbogbo <i>et al.</i> (2006)
CBS 6054 (4)	2,0	100	6,3	0,4	-	30	-	0,40	0,19	120	Agbogbo <i>et al.</i> (2006)
CBS 6054 (5)	2,0	100	6,3	0,4	-	30	-	0,44	0,19	120	Agbogbo <i>et al.</i> (2006)
CBS 6054 (6)	2,0	100	6,3	0,4	-	30	-	0,45	0,20	120	Agbogbo <i>et al.</i> (2006)
CBS 6054 (7)	2,0	100	6,3	0,4	-	30	-	0,44	0,20	120	Agbogbo <i>et al.</i> (2006)
NRRLY-7124 (8)	*	150	6,0	0,5	-	30	-	0,42	0,18	90	Arslan y Eken-Saraçoglu (2010)
NRRLY-7124 (9)	*	150	6,0	0,5	-	30	-	0,43	0,19	90	Arslan y Eken-Saraçoglu (2010)
NRRLY-7124 (10)	*	150	6,0	0,5	-	30	-	0,45	0,17	90	Arslan y Eken-Saraçoglu (2010)
NRRLY-7124 (11)	1,0	-	-	-	-	30	0,7	0,33	0,24	96	Silva <i>et al.</i> (2012)
NRRLY-7124 (11)	1,0	-	-	-	-	30	4,9	0,32	0,32	96	Silva <i>et al.</i> (2012)
NRRLY-7124 (11)	1,0	-	-	-	-	30	12,1	0,31	0,34	96	Silva <i>et al.</i> (2012)
CBS 6054 (12)	2,0	150	5,0	0,4	-	30	-	0,00	0,00	96	Scordia <i>et al.</i> (2012)
CBS 6054 (12)	2,0	150	5,5	0,4	-	30	-	0,27	0,01	72	Scordia <i>et al.</i> (2012)
CBS 6054 (12)	2,0	150	6,0	0,4	-	30	-	0,33	0,17	48	Scordia <i>et al.</i> (2012)
CBS 6054 (12)	2,0	150	6,5	0,4	-	30	-	0,33	0,17	48	Scordia <i>et al.</i> (2012)
NRRLY-7124 (13)	1,0	200	5,5	0,4	-	30	-	0,30	0,36	72	Silva <i>et al.</i> (2013)
NRRLY-7124 (14)	1,0	200	5,5	0,4	-	30	-	0,30	0,36	72	Silva <i>et al.</i> (2013)
CBS 6054 (15)	2,0	150	6,0	0,4	-	30	-	0,38	0,13	96	Scordia <i>et al.</i> (2013)
NRRLY-7124 (16)	1,0	200	5,5	0,4	-	30	-	0,17	0,09	96	Fonseca <i>et al.</i> (2013)
NRRLY-7124 (17)	1,0	200	5,5	0,4	-	30	-	0,14	0,06	96	Fonseca <i>et al.</i> (2013)
CBS 6054 (18)	1,8	100	6,3	0,4	-	30	-	0,36	0,11	192	Agbogbo <i>et al.</i> (2007)
CBS 6054 (18)	4,3	100	6,3	0,4	-	30	-	0,38	0,18	192	Agbogbo <i>et al.</i> (2007)
CBS 6054 (18)	6,5	100	6,3	0,4	-	30	-	0,38	0,21	192	Agbogbo <i>et al.</i> (2007)
CBS 6054 (19)	2,0	150	5,0	0,4	-	30	-	0,24	0,08	96	Scordia <i>et al.</i> (2010)
CBS 6054 (19)	2,0	150	5,5	0,4	-	30	-	0,29	0,12	72	Scordia <i>et al.</i> (2010)
CBS 6054 (19)	2,0	150	6,0	0,4	-	30	-	0,35	0,22	48	Scordia <i>et al.</i> (2010)
CBS 6054 (19)	2,0	150	6,5	0,4	-	30	-	0,30	0,19	48	Scordia <i>et al.</i> (2010)
NRRLY-7124 (20)	2,0	80	6,0	0,6	-	30	-	0,41	0,07	144	Eken-Saraçoglu y Arslan (2000)
NRRLY-7124 (21)	1,5	80	6,0	0,6	-	30	-	0,41	0,06	144	Eken-Saraçoglu y Arslan (2000)
NRRLY-7124 (22)	1,4	80	6,0	0,6	-	30	-	0,34	0,11	96	Eken-Saraçoglu y Arslan (2000)
NRRLY-7124 (23)	1,2	80	6,0	0,6	-	30	-	0,43	0,09	96	Eken-Saraçoglu y Arslan (2000)
CSIR-Y633 (24)	0,4	300	4,0	-	0,2	30	-	0,43	0,86	48	Du Preez <i>et al.</i> (1986)
NRRLY-7124 (25)	1,0	250	-	-	0,3	30	4,9	0,32	0,32	96	Silva <i>et al.</i> (2011)
CBS 5773 (26)	**	150	5,0	0,4	-	30	-	0,38	0,93	24	Roberto <i>et al.</i> (1991)
NRRLY-7124 (27)	1,0	250	6,0	-	0,05	30	-	0,35	0,18	24	Nigam (2002)
NRRLY-7124 (28)	1,0	350	6,5	-	0,06	28	-	0,36	0,30	60	Nigam (2001a)
NRRLY-7124 (29)	1,0	350	6,5	-	0,06	28	-	0,41	0,54	60	Nigam (2001a)
NRRLY-7124 (30)	5,0	550	6,5	-	0,01	30	-	0,41	0,44	46	Nigam (2001b)
NRRLY-7124 (30)	5,0	550	6,5	-	0,01	30	-	0,30	0,11	46	Nigam (2001b)

Factores: x_0 (kg m⁻³), A (rpm), ω (aeración, expresada como: volumen medio/volumen matraz), Q (dm³ min⁻¹), T (°C). Respuestas: K_{La} (h⁻¹), $Y_{p/s}$ (kg kg⁻¹), Q_p (kg m⁻³ h⁻¹), t (h). (*) 10 % v/v a partir del precultivo. (**) 3 · 10⁷ ml. Ver medios de cultivo (MEDIOS) en el Apéndice 1.

2.5.4. Rutas metabólicas

La fermentación, como vía para la obtención de bioproductos, consiste en una secuencia de transformaciones enzimáticas intracelulares, las cuales conforman el metabolismo del organismo en cuestión. El objetivo final de éste es la síntesis de los constituyentes que configuran su estructura y para conseguirlo deben extraer energía y poder reductor del medio que les rodea, Cuevas (2007). En el control del proceso de fermentación influyen una serie de variables (apartado 2.5.5), las cuales deben ser controladas según el objetivo de bioproducción.

La fermentación de D-glucosa a etanol se desarrolla, generalmente, por medio de la ruta metabólica de la glucólisis, explicada inicialmente por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y pudiendo incluir vías alternativas como la de Entner-Doudoroff, Figura 2.9. Es un bioproceso cuyo objetivo es la producción de energía (2 moléculas de ATP por cada molécula de D-glucosa) y poder reductor (2 moléculas de NADH por cada molécula de D-glucosa). El ATP actuará en reacciones metabólicas y el NADH puede intervenir en reacciones anabólicas, bien oxidándose en la respiración celular, si existen condiciones aerobias, o bien puede ser la fuente de poder reductor, bajo condiciones anaerobias, en la fermentación etanólica o láctica. Durante la fermentación etanólica D-glucosa requiere de un primer paso donde es fosforilada a D-glucosa-6-fosfato y posteriormente isomerizada por las enzimas hexoquinasa y fosfohexoisomerasa, respectivamente. Tras una serie de reacciones enzimáticas, según explica la vía de Embden-Meyerhof-Parnas o la vía de Entner-Doudoroff, D-glucosa se habrá degradado a piruvato, el cual será descarboxilado a acetaldehído por la enzima carboxilasa; finalmente, el acetaldehído será reducido a etanol por la enzima alcohol deshidrogenasa y el cofactor NADH, Nelson y Cox (2004), Figura 2.9.

La fermentación de D-xilosa hacia xilitol o etanol es un proceso que requiere de la reducción de una molécula de D-xilosa a xilitol mediada por la enzima xilosa reductasa (liberada por las levaduras) y los cofactores NADPH o NADH. El xilitol producido puede ser excretado de la célula, caso de la levadura *C. guilliermondii*, Barbosa *et al.* (1988), Roberto *et al.* (1999) o puede ser oxidado a D-xilulosa por la enzima xilitol deshidrogenasa y los cofactores NAD⁺ o NAD(P)⁺. Estas reacciones poseen gran importancia en la producción de xilitol, ya que la acumulación de este último está

condicionada, en primer lugar, por una alta relación entre la actividad de xilosa reductasa y D-xilitol deshidrogenasa, y, en segundo lugar, será requerida una aeración limitada que impida que la ruta metabólica derive hacia la respiración, Mateo (2011). Si la ruta continuara, como puede ser el caso de la levadura *P. stipitis*, tras la oxidación del xilitol a D-xilulosa, actuaría la enzima xiluloquinasa para fosforilar D-xilulosa a D-xilulosa-5-P. Esta molécula puede entrar o no en el ciclo de las pentosas fosfato. El objetivo es la formación de gliceraldehído-3-fosfato que entrará en la ruta de la glucólisis (ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas o Entner-Doudoroff), Agbogbo y Coward-Kelly (2008), Figura 2.9.

Por último, es importante señalar el rendimiento teórico (coeficiente de Gay-Lussac) o valor de eficiencia máxima alcanzable durante la conversión del sustrato a bioproducto. En el caso de la conversión a bioetanol, a partir de hexosas y pentosas, este coeficiente es de 0,51 kg kg⁻¹, Hamelinck *et al.* (2005), Hahn-Hägerdal *et al.* (2007), mientras que en la conversión a xilitol, a partir de pentosas, es de 0,905 kg kg⁻¹, Barbosa *et al.* (1988). Cabe indicar también la dificultad para alcanzar estos valores debido al consumo parcial de sustrato por parte de los microorganismos durante la fermentación con objeto del mantenimiento celular (aproximadamente 5% del sustrato) o para la producción de otros bioproductos, García (2007). Por otro lado, según Lee *et al.* (2009, 2011) y Lee y Jeffries (2011), puede darse el escenario en el que el rendimiento en etanol aparentemente sea superior al teórico y esto acontece cuando bajo hidrólisis y sacarificación simultáneas la levadura *P. stipitis* libera β -glucosidasa, con lo que se acelera la producción de etanol.

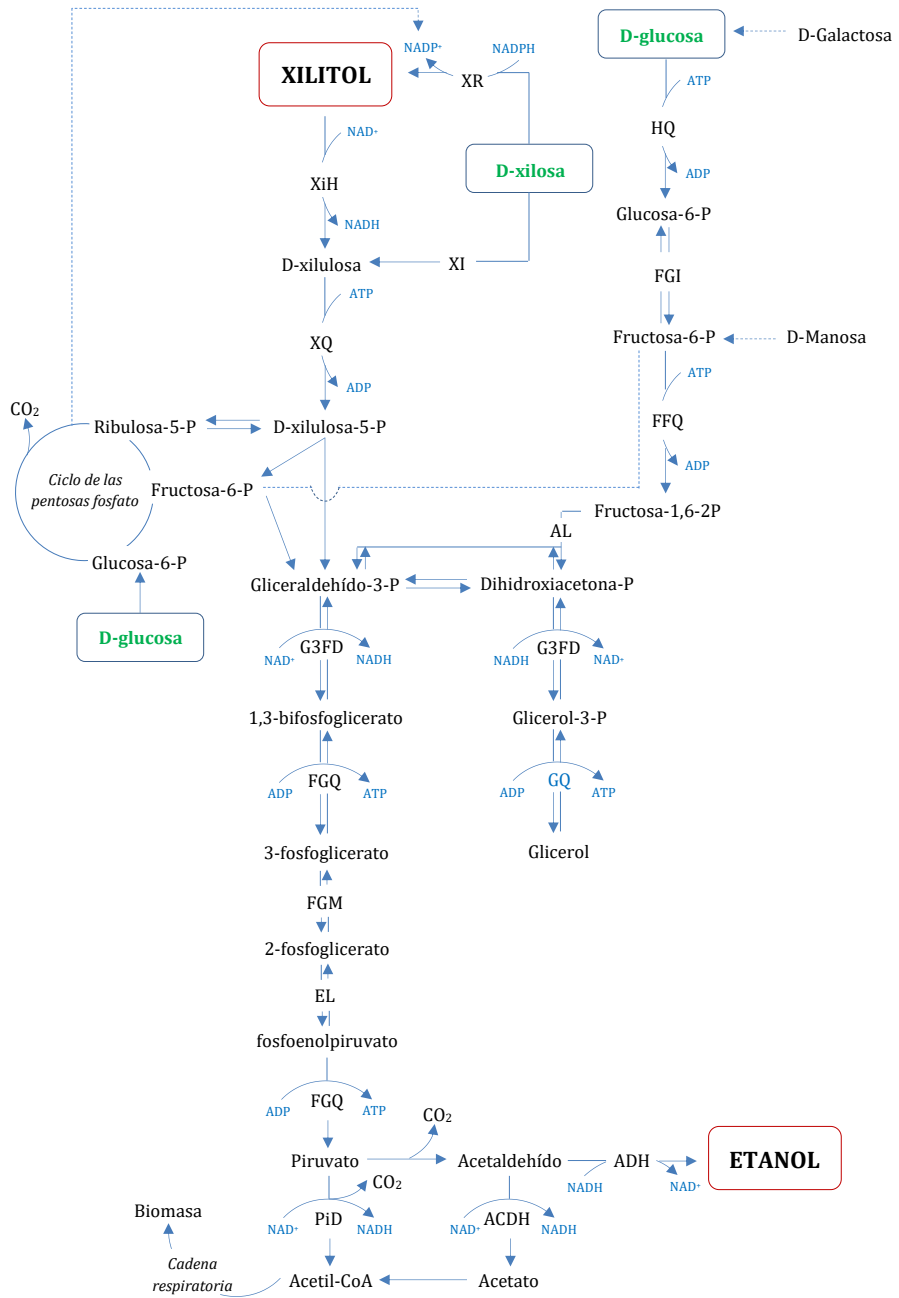
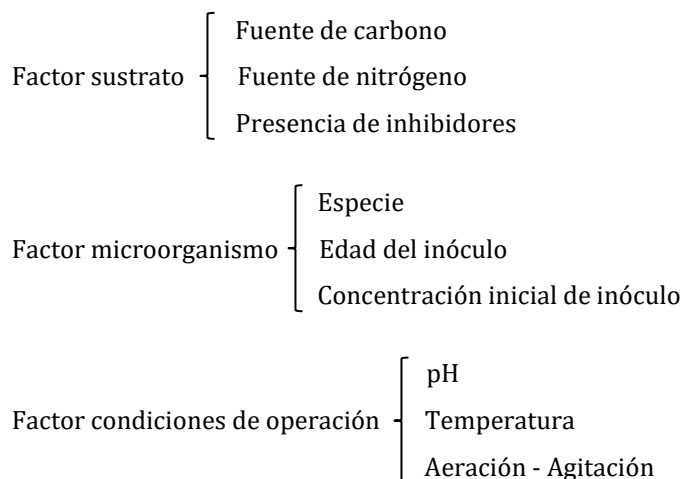


Figura 2.9: Aproximación al metabolismo de D-xilosa y D-glucosa para la obtención de xilitol y etanol.

2.5.5. Control de la producción de etanol y xilitol

Existen varios factores que controlan la bioproducción de etanol y xilitol a partir de hidrolizados hemicelulósicos. Estos factores engloban a su vez una serie de variables con un efecto directo sobre el resultado final del proceso. Pueden ser los siguientes:



2.5.5.1. Factor sustrato

El medio de cultivo utilizado en la fermentación puede ser sintetizado, propio de estudios a escala de laboratorio, o bien puede ser obtenido a partir de material biomásico de diferente origen, propio de los que se emplean en procesos industriales y también a escala de laboratorio. Mientras que en el primer caso se trataría de un medio definido, en el segundo, hay que enfrentarse a un medio heterogéneo de alta complejidad composicional. Por tal motivo, el estudio de los constituyentes del medio de cultivo (fuente de carbono, fuente de nitrógeno, inhibidores, sales minerales, etc.) es de alta relevancia, ya que influirá directamente sobre la viabilidad económica del proceso, Mussatto (2016). Este último puede verse afectado negativamente al hacerse necesaria la adición de algún nutriente o por la necesidad de una etapa extra como puede ser la detoxificación, Alriksson *et al.* (2011), Cavka y Jönsson (2013), Fonseca *et al.* (2013) y Mateo *et al.* (2013a).

a) Fuente de carbono. Tal como se ha indicado en el párrafo anterior, generalmente los medios de cultivo están compuestos por mezcla de sustratos. Por tanto, es necesario conocer de antemano la asimilación de estos componentes por parte del microorganismo utilizado. En este sentido, la asimilación de fuentes de carbono, junto a otros sustratos, por parte de *C. guilliermondii* y *P. stipitis*, microorganismos utilizados en este trabajo, se resumen en las Tablas 2.27 y 2.28, Kurtzman (1998).

Tabla 2.27: Asimilación de sustratos por *C. guilliermondii* (positivo (+), débil (d), variable (v), negativo (-))

D-glucosa	+	N-acetil-D-glucosamina	+
D-galactosa	+	Metanol	-
L-sorbosa	v	Etanol	+
Sucrosa	+	Glicerol	+
Maltosa	+	Eritritol	-
Celobiosa	+	Ribitol	+
Trehalosa	+	Galactitol	v
Lactosa	-	D-manitol	+
Melibiosa	+	D-glucitol	+
Rafinosa	+	α -metil-D-glucosido	+
Melecitosa	+	Salicina	+
Inulina	+	D-gluconato	v
Almidón soluble	-	DL-lactato	v
D-xilosa	+	Succinato	+
L-arabinosa	+	Citrato	v
D-arabinosa	+	Inositol	-
D-ribosa	+	Hexadecano	+
L-ramnosa	v	Nitrato	-
D-glucosamina	+	Vitamina libre	-

Tabla 2.28: Asimilación de sustratos por *P. stipitis* (positivo (+), débil (d), variable (v), negativo (-))

D-glucosa	+	<i>N</i> -acetil-D-glucosamina	+
D-galactosa	+	Metanol	-
L-sorbosa	V	Etanol	+
Sucrosa	+	Glicerol	+
Maltosa	+	Eritritol	+
Celobiosa	+	Ribitol	+
Trehalosa	+	Galactitol	-
Lactosa	V	D-manitol	+
Melibiosa	-	D-glucitol	+
Rafinosa	-	α -metil-D-glucosido	+
Melecitosa	+	Salicina	+
Inulina	-	D-gluconato	v
Almidón soluble	+	DL-lactato	+
D-xilosa	+	Succinato	+
L-arabinosa	V	Citrato	+
D-arabinosa	+	Inositol	-
D-ribosa	+	Hexadecano	+
L-ramnosa	+	Nitrato	-
D-glucosamina	+	Vitamina libre	-

En la fermentación etanólica las levaduras no tradicionales van a fermentar fácilmente D-glucosa, mientras que la asimilación de pentosas puede ser orientada a la producción de etanol (Chandel *et al.*, 2007, Silva *et al.*, 2012), xilitol (Rao *et al.*, 2006, Sampaio *et al.*, 2006, Kamal *et al.*, 2011, Prakash *et al.*, 2011), mezcla de estos (García *et al.* 2010, Hickert *et al.*, 2013, Gonçalves *et al.*, 2013) u otros compuestos. El objetivo actual es un consumo íntegro, utilizando microorganismos con esta capacidad o introduciendo modificaciones genéticas en los que no la poseen. En este último caso, podrían llevarse a cabo técnicas orientadas a la modificación del metabolismo microbiano, como puede ser la adaptación de *S. cerevisiae* para provocar la fermentación de D-xilosa y L-arabinosa y, una segunda vía consistente en la introducción de genes en microorganismos fermentadores de pentosas para su orientación hacia la producción de etanol (Saha, 2003). Cabe hacer una excepción cuando se pretendan llevar a cabo métodos de detoxificación biológica (apartado 2.4.3). En este caso sí que es beneficiosa la utilización de microorganismos específicos para limitar las pérdidas de sustrato. Se puede citar los trabajos de Fonseca *et*

al. (2013), incluidos en la Tabla 2.19, donde emplean *S. cerevisiae* para realizar una detoxificación biológica a hidrolizados hemicelulósicos de paja de arroz y poda de olivo, observando un consumo parcial de D-glucosa. Estos trabajos concluyen con una fermentación mediada por *P. stipitis* para producir etanol a partir de hexosas y pentosas. En este sentido, cuando los microorganismos usados son capaces de fermentar hexosas y pentosas, la mayoría de ellos utilizarán en primer lugar hexosas y no comenzarán a fermentar pentosas hasta un cierto umbral de concentración límite de hexosas. Este fenómeno se denomina 'carbon catabolite repression' (CCR) y afecta negativamente a la productividad, debido a que incrementa los tiempos de residencia y la fase 'lag', Inui *et al.* (2010).

De cualquier forma, el estudio de la combinación de varios sustratos ha sido investigado por diferentes autores. Felipe *et al.* (1993), en su trabajo sobre producción de xilitol a partir de hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar y utilizando como microorganismo la levadura *C. guilliermondii*, apreciaron el efecto inhibitorio causado por D-glucosa sobre el consumo de D-xilosa y, por consiguiente, sobre la productividad en xilitol. Según estos autores se produciría un efecto de represión catabólica a partir de una diferencia de concentraciones: D-glucosa/D-xilosa, superior al 10 %. Este mismo efecto es señalado por otros autores sobre D-manosa y D-glucosa, Yahashi *et al.* (1996), y Winkelhausen y Kuzmanova (1998).

De manera general, cuando existe mezcla de sustratos, D-glucosa será asimilada primero, Laplace *et al.* (1991) y será aprovechada por la levadura para su propio crecimiento y para la producción de etanol, Villarreal *et al.* (2006). En este punto, pueden ser considerados dos grupos de levaduras, las que realizan un consumo simultáneo de azúcares (entre las que se encuentra *C. guilliermondii*) y las que realizan un consumo secuencial (como es *P. stipitis*), Mateo (2011).

En cuanto a la concentración inicial de azúcares, y para hacer viable el proceso de fermentación, varios autores señalan la importancia de comenzar a fermentar una concentración de azúcares tan alta como sea posible. Esta afirmación se ve justificada con los estudios de Mussatto y Roberto (2003) e Ikeuchi *et al.* (1999), los cuales estudian el comportamiento de varios microorganismos productores de xilitol bajo concentraciones iniciales crecientes de D-xilosa, entre ellos *C. guilliermondii*. Para esta misma levadura,

Mussatto y Roberto (2008) argumentan la necesidad de trabajar con una concentración inicial de D-xilosa elevada sin llegar a provocar la inhibición por sustrato del crecimiento microbiano; por otro lado, sostienen que cuando se utiliza una baja concentración inicial de D-xilosa se obtienen bajos rendimientos en bioproductos debido a que la levadura invierte gran parte de la fuente de carbono en su propio desarrollo y, por último, señalan que la concentración inicial de azúcar depende de la fuente de biomasa y del microorganismo empleado, por lo que se necesita optimizar cada caso concreto. Como resultado de este estudio, en el que trabajaron con hidrolizado hemicelulósico de bagazo de malta de cebada, las autoras mantienen que la concentración inicial de D-xilosa óptima para este subproducto y el citado microorganismo es de 70 kg m^{-3} . Para esta misma levadura, Silva y Roberto (2001b), estudiando la producción de xilitol a partir de hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz, señalan que la concentración inicial de D-xilosa debe ser de 82 kg m^{-3} . Por último, Rodrigues *et al.* (2003) establecen una concentración inicial de D-xilosa de 51 kg m^{-3} cuando emplearon hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar. En el caso de la levadura *P. stipitis*, Silva *et al.* (2010), estudiando la concentración inicial máxima de D-xilosa, de acuerdo con el consumo de sustrato, el crecimiento celular y la producción de etanol; a partir de hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz, mantienen como concentración inicial máxima de D-xilosa 47 kg m^{-3} . Agbogbo *et al.* (2006), trabajaron con diferente relación D-glucosa/D-xilosa concluyendo que la producción de etanol mejora cuando disminuye dicha relación, en contraposición a lo que sucede con respecto a la producción de biomasa. Las concentraciones iniciales de azúcares utilizadas en fermentaciones con estos microorganismos pueden verse en el Apéndice 1, en el que se recogen las leyendas extendidas de las Tablas 2.25 y 2.26.

b) Fuente de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno pueden ser de naturaleza orgánica (urea, aminoácidos, extracto de levadura, peptona...), inorgánica (nitratos, nitritos, sales de amonio...) e incluso N_2 atmosférico en caso de algunos procariontes, y son requeridas por todos los organismos para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otros polímeros de la pared celular; aunque la asimilación de cada uno de estos compuestos varía en función del organismo en cuestión.

Generalmente, el caldo de cultivo proveniente de material lignocelulósico puede ser deficiente o prácticamente nulo en cuanto a la presencia de fuentes de nitrógeno. De tal

forma y con objeto de optimizar económicamente los procesos de fermentación, ha de conocerse el cultivo de partida en orden de añadir solo aquellos componentes no presentes y necesarios para el desarrollo celular.

Con objeto de tener una aproximación a las fuentes de nitrógeno empleadas en fermentaciones realizadas con las levaduras *C. guilliermondii* y *P. stipitis*, se han elaborado las Tablas 2.29 y 2.30, donde se recoge el nombre de la cepa, el tipo de hidrolizado hemicelulósico empleado y las diferentes fuentes de nitrógeno y concentraciones de las mismas usadas en varios estudios.

Tabla 2.29: Fuentes de nitrógeno (kg m^{-3}) suplementadas a hidrolizados hemicelulósicos fermentados con *C. guilliermondii*

Cepa	Extracto de levadura	E. de harina de arroz	Urea	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Referencia
FTI 20037	-	5,0	-	1,0	Canilha <i>et al.</i> (2008)
FTI 20037	0,5	-	1,25	-	Aguilar <i>et al.</i> (2002)
FTI 20037	-	20,0	-	3,0	Martínez <i>et al.</i> (2003)
FTI 20037	-	10,0	-	5,0	Roberto <i>et al.</i> (1995)

Tabla 2.30: Fuentes de nitrógeno (kg m^{-3}) suplementadas a hidrolizados hemicelulósicos fermentados con *P. stipitis*

Cepa	Extracto de levadura	Urea	Peptona	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Referencia
NRRL Y-7124	3	-	-	-	-	Silva <i>et al.</i> (2010)
CBS 6054	1,7	2,27	6,5	-	-	Agbogbo <i>et al.</i> (2006)
NRRL Y-7124	3	2,3	-	-	-	Silva <i>et al.</i> (2012)
NRRL Y-7124	2,5	-	-	1	2	Nigam (2001b)

c) Presencia de inhibidores. La presencia y caracterización de los inhibidores en un caldo de cultivo procedente de material lignocelulósico es una variable de gran importancia debido a que ejerce gran influencia sobre el comportamiento del microorganismos, Aguilar *et al.* (2002) y Lavarak *et al.* (2002). Tal es así, que la capacidad metabólica de los microorganismos, asociada a su tolerancia a los compuestos que presentan inhibición, determinará la eficiencia en el uso de los azúcares presentes en los hidrolizados, Palmqvist y Hahn-Hägerdal (2000).

La clasificación de los compuestos inhibidores se podría realizar considerando diferentes aspectos: origen, grupo funcional, etc. En el apartado 2.4, se incluyó la Tabla 2.16, 'Clasificación de los principales compuestos inhibidores basada en su grupo funcional'. En este apartado se ha considerado conveniente elaborar la Figura 2.10, donde se recogen los compuestos inhibidores más representativos y su origen dentro de las diferentes fracciones composicionales de los materiales lignocelulósicos.

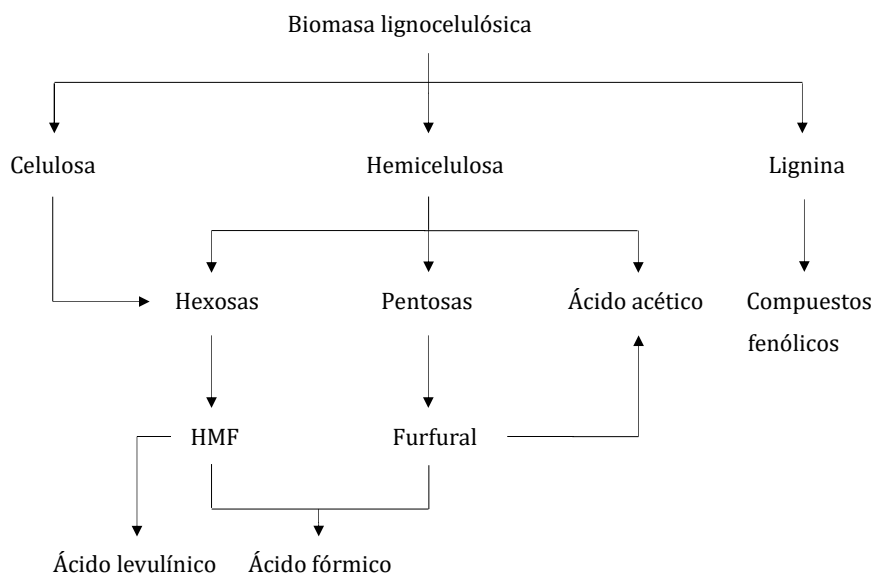


Figura 2.10: Compuestos generados durante la degradación de la biomasa lignocelulósica Adaptado de Palmqvist y Hahn-Hägerdal (2000).

El material con el que se ha trabajado en este estudio, poda de olivar, ha sido caracterizado en inhibidores por varios autores, siendo la caracterización más reciente la llevada a cabo por Mateo *et al.* (2013a) y que cita como principales inhibidores: compuestos fenólicos totales, ácido acético, ácido fórmico, HMF y furfural. Por otro lado, por corrosión de los equipos utilizados durante la etapa de hidrólisis, pueden generarse iones metálicos (cobre, cromo, hierro o níquel), Parajó *et al.* (1998a).

Para la levadura *C. guilliermondii*, Felipe *et al.* (1996), fermentando hidrolizado hemicelulósico de astillas de eucalipto con una concentración de ácido acético, furfural y HMF de 24,27, 0,25 y 0,42 kg m⁻³, respectivamente, señalan los efectos negativos de los furanos sobre el crecimiento celular. Este fue negativo cuando inicialmente inocularon 1

kg m⁻³ de células y positivo cuando inocularon 3 kg m⁻³. En el primer caso, los autores observan una fase 'lag' de unas 85 h. Este efecto, fue explicado por Sanchez y Bautista (1988), los cuales afirman que la inhibición causada por furfural e HMF se debe a la acción de estos sobre ciertos enzimas que intervienen en la glucólisis.

Respecto al ácido acético, Felipe *et al.* (1996), indican que es posible que pueda ser consumido por la levadura *C. guilliermondii*, después de haber observado una caída del 50 % respecto a la concentración inicial. Un comportamiento similar es demostrado por Castro *et al.* (2013), al aseverar un consumo de ácido acético del 62 % a partir de una concentración inicial de 8,1 kg m⁻³ en hidrolizado hemicelulósico de astillas de eucalipto. Por último, cabe señalar los estudios de Silva *et al.* (2004) y Pereira *et al.* (2011), los cuales señalan que una concentración inicial por debajo de 0,8 - 1 kg m⁻³ de ácido acético favorece la fermentación por parte de la levadura, mientras que la concentración máxima a la que comienza a inhibir dicho proceso podría situarse en torno a 2,6 - 3 kg m⁻³. De cualquier forma, los ácidos alifáticos deben su acción inhibitoria a su forma no disociada, que depende del pH del medio, viendo por tanto aumentada su inhibición cuando se registran valores de pH inferiores a su pK_a (4,75 para el ácido acético, 3,75 para ácido fórmico y 4,66 para ácido levulínico). Por su carácter liposoluble en su forma no disociada, estos compuestos lograrían penetrar la membrana celular, disociándose al pasar a un pH de 7,4, provocando la acidificación del plasma intracelular y la inactividad celular, Lohmeier-Vogel *et al.* (1998), Scordia *et al.* (2012).

En cuando a los compuestos fenólicos, Cortez y Roberto (2010) afirma que de entre los compuestos analizados (siringaldehído, vainillina y ácido ferúlico) el siringaldehído, seguido por la vainillina, es el que mayor toxicidad ejerce sobre el crecimiento de la levadura *C. guilliermondii*, aunque también señala la capacidad de la misma para reducir la toxicidad de los hidrolizados al convertir estos compuestos en sus respectivos ácidos o alcoholes. Pereira *et al.* (2011) señalan los efectos del ácido ferúlico y siringaldehído para la misma levadura; respecto al primero, señalan una reducción en la concentración celular del 30 % respecto al control cuando la concentración utilizada fue de 0,6 kg m⁻³, añadiendo un efecto neutro sobre el consumo de D-xilosa y leve (reducción del 15 % respecto al control) sobre la producción de xilitol; respecto al segundo, afirman que posee efecto negativo sobre el crecimiento celular (reducción del 36 % respecto al

control a una concentración $0,8 \text{ kg m}^{-3}$), aunque, tanto el consumo de D-xilosa, como la producción de xilitol, no se vieron afectados.

De acuerdo con Bellido *et al.* (2011), el ácido acético sería el principal compuesto inhibitorio para *P. stipitis* DSM 3651. Tal es así que el crecimiento de levadura y la producción de etanol son completamente inhibidos con una concentración de ácido acético de $3,5 \text{ kg m}^{-3}$. También concluyen estos autores que el crecimiento celular y el consumo de azúcares se ve directamente afectado con el aumento de la concentración de ácido acético, obteniéndose una producción de etanol en el control del 76,5 % de la producción teórica, un 35,4 % cuando la concentración de ácido acético fue de $2,5 \text{ kg m}^{-3}$, 61,8 % con $1,5 \text{ kg m}^{-3}$ y 63,8 % con $0,5 \text{ kg m}^{-3}$. Por otro lado, sostienen un menor efecto inhibitorio del furfural e HMF. El primero inhibe el consumo de D-xilosa cuando la concentración es de 2 kg m^{-3} , mientras que en concentraciones menores, el rendimiento en etanol se ve levemente afectado (con pérdidas en la producción de etanol del 3,1 % respecto al control). Este mismo resultado fue obtenido por Roberto *et al.* (1991), para *P. stipitis* CBS 5773, que también concluyen que el furfural comienza a ser problema a partir de $1,0 \text{ kg m}^{-3}$ y que en concentraciones inferiores a $0,5 \text{ kg m}^{-3}$ este aldehído supone una fuente de carbono para el crecimiento de la levadura. El HMF ejercería un efecto inhibitorio en concentraciones superiores a $0,5 \text{ kg m}^{-3}$ aunque con un efecto leve respecto a los dos compuestos citados con anterioridad (por debajo del valor dado obtuvieron rendimientos del 82,5 % del teórico). Por último, del estudio del efecto sinérgico de estos tres compuestos (en concentraciones de $1,5 \text{ kg m}^{-3}$ de ácido acético, $0,15 \text{ kg m}^{-3}$ de furfural y $0,05 \text{ kg m}^{-3}$ de HMF) los autores concluyen haber observado una completa inhibición del consumo de D-xilosa y una velocidad muy lenta del consumo de D-glucosa. Según Slininger *et al.* (2006), *P. stipitis* NRRL Y-7124 sería capaz de consumir furfural e hidroximetil furfural reduciéndolos a sus respectivos alcoholes furanometanol y furano-2,5-dimetanol, efecto que también ha sido observado por Liu *et al.* (2005) y Gorsich *et al.* (2006).

Por último, cabe mencionar los compuestos fenólicos cuyo mecanismo de acción consiste en debilitar la membrana celular por interacción con zonas hidrofóbicas, Almeida *et al.* (2007). *P. stipitis* sería capaz de producir etanol en un medio de cultivo que contuviera fenoles y otros compuestos inhibidores o tóxicos, aunque vería reducida la productividad en etanol, por ejemplo, hasta en un 90 % cuando se empleó vainillina ($0,5 -$

2,0 kg m⁻³), furfural (2 kg m⁻³), p-hidroxibenzaldehído (1,5 kg m⁻³) y siringaldehído (1,5 kg m⁻³), Delgkenes *et al.* (1996). Por este motivo, diversos autores como pueden ser Silva *et al.* (2013) o Fonseca *et al.* (2013), centran sus esfuerzos en estudios de detoxificación, con el objetivo de reducir la concentración de compuestos inhibidores o tóxicos y elevar las productividades en bioproductos.

2.5.5.2. Factor microorganismo

En relación al factor microorganismo se va a tener en consideración la especie, la edad del inóculo y la concentración inicial del mismo.

a) Especie. Como se ha argumentado anteriormente (apartado 2.5.3) es de suprema importancia la elección del microorganismo a emplear especificando su género y especie, elección ligada directamente a los objetivos planteados.

b) Edad del inóculo. La actividad metabólica y la viabilidad celular son variables estrechamente relacionadas con la edad del inóculo, Du Preez (1994). En estudios realizados por Roberto *et al.* (1994) con *C. guilliermondii* FTI 230037, se observaron menores productividades en xilitol para células jóvenes procedentes de cultivos con tiempos inferiores a 24 h, aunque no se encontró variación en los rendimientos finales. En otro estudio, Roberto *et al.* (1991), utilizando la cepa de *P. stipitis* CBS 5773, concluyen haber obtenido las mayores productividades volumétricas en etanol entre las 12 y 24 h de experimento (1,2 kg m⁻³ h⁻¹) a partir de 76 kg m⁻³ de D-xilosa. Sin embargo, según indican Slininger *et al.* (2006), en estudios realizados con *P. stipitis* NRRL Y-7124, la edad del inóculo favorecería la tolerancia a sustancias inhibidoras como furfural, habiendo observado una tasa de muerte específica superior en la fase de crecimiento exponencial a la observada en la fase de crecimiento estacionario en experimentos donde la citada levadura estuvo expuesta a dicho compuesto.

c) Concentración inicial de inóculo. De acuerdo con Mateo (2011), el empleo de una alta concentración celular inicial provoca varios efectos positivos como son: el aumento de la productividad volumétrica, la reducción de la fase 'lag' en los primeros estadios de la fermentación y la reducción del efecto tóxico-inhibitorio de determinados compuestos presentes en el medio de cultivo. En este sentido, Agbogbo *et al.* (2007), habiendo

realizado fermentaciones en medio sintético con *P. stipitis* CBS 6054 en concentraciones iniciales de 1,8, 4,3 y 6,5 kg m⁻³, concluyen que la concentración más alta aumenta la utilización de los azúcares y, la formación (41,0 kg m⁻³) y el rendimiento (0,38 kg kg⁻¹) en etanol. Por otra parte, según Roberto *et al.* (1995), fermentando hidrolizado de bagazo de caña de azúcar con *C. guilliermondii* FTI 20037, concluyen que una densidad celular de 3,0 kg m⁻³ favorecería el consumo de D-xilosa ya que se minimizaría el efecto tóxico del ácido (4,7 kg m⁻³). Sin embargo, Roberto *et al.* (1996), utilizando esta misma cepa para la fermentación de hidrolizado de paja de arroz, señalan que el aumento de la densidad celular inicial (0,67 a 2,41 kg m⁻³) no mejora los parámetros fermentativos, sentenciando que los mejores resultados se encontraron al emplear una densidad celular inicial de 0,9 kg m⁻³ obteniendo un rendimiento en xilitol de 0,71 kg kg⁻¹ y una productividad volumétrica de 0,56 kg m⁻³ h⁻¹. En otro estudio realizado por Felipe *et al.* (1996), con *C. guilliermondii* FTI 20037, a partir de hidrolizado hemicelulósico de eucalipto, interpretan la anulación del efecto tóxico del furfural e HMF y el consumo del 50 % del ácido acético inicial por el hecho de haber inoculado una alta concentración celular (3,0 kg m⁻³). De la observación de estos, y otros estudios se extrae la conclusión aportada por Parajó *et al.* (1998a), en el que se sugiere la existencia de una concentración celular óptima para unas condiciones preestablecidas.

2.5.5.3. Factor condiciones de operación

Dentro de este apartado se va a describir la influencia del pH, la temperatura y la aeración-agitación.

a) pH. Es de gran relevancia su estudio ya que incide en el desarrollo de los microorganismos debido a que estos crecen dentro de unos umbrales de pH estrechos con predominancia de un punto óptimo. Por tanto, una variación de este, fuera de los rangos específicos, provocará un efecto negativo sobre el desarrollo celular por alteración de la membrana plasmática, inhibición de la actividad enzimática y colapso en la disponibilidad de nutrientes por modificación de la ionización de las moléculas que los integran, Prescott *et al.* (1999).

En trabajos realizados con *C. guilliermondii*, se ha podido observar que la mayoría de los estudios reportan un valor de pH situado entre 5,5 y 6,5 (Tabla 2.25), mientras que en

estudios realizados con *P. stipitis*, el pH varía entre 4,0 y 6,5, aunque la mayoría de estos trabajos sitúan el valor de pH entre 5,5 y 6,0 (Tabla 2.26).

b) Temperatura. Al igual que el pH, es una variable fermentativa de gran especificidad. En este sentido, los microorganismos pueden clasificarse en psicrófilos (0-25 °C), mesófilos (25-40 °C), termófilos (> 40 °C), Quintero (1981). Por lo general, el umbral de temperatura óptimo para la producción de etanol para especies del género *Pichia* o *Candida* se sitúa entre 30 y 32 °C. Aunque la temperatura óptima dependerá finalmente de la cepa y del medio de cultivo empleado, Du Preez (1994). Por otro lado, la producción de xilitol por levaduras puede darse dentro de un umbral de entre 24 y 45 °C, situándose el umbral óptimo entre 28 y 30 °C y la temperatura óptima en 30 °C, Soleimani (2006), Prakasham *et al.* (2009). Estas afirmaciones pueden contrastarse acudiendo a las Tablas 2.25 y 2.26. La temperatura utilizada en todos los estudios analizados, menos en un caso (28 °C), se fija en 30 °C para ambas levaduras.

c) Aeración - Agitación. La concentración de oxígeno en el medio de cultivo es una variable crítica que condicionará tanto el crecimiento microbiano como el metabolismo de los sustratos empleados, Mateo (2011). Se ha observado que un bajo nivel de aeración favorecerá la formación de bioproducto, y que, por el contrario, altos niveles favorecerán el crecimiento celular, Vandeska *et al.* (1995), Silva *et al.* (2010). Estos autores detectaron este efecto al estudiar la agitación y aeración sobre la producción de etanol con *P. stipitis* NRRL Y-7124 usando hidrolizados de paja de arroz. Siguiendo esta misma línea argumentativa, Unrean y Nguyen (2012), al realizar fermentaciones con *P. stipitis* BCC15191 en medio sintético, señalan un incremento del rendimiento en etanol (de 0,14 kg kg⁻¹ a 0,40 kg kg⁻¹) y de la productividad volumétrica (de 0,13 kg m⁻³ h⁻¹ a 0,25 kg m⁻³ h⁻¹) cuando redujeron el caudal de oxígeno suministrado al cultivo desde 1 a 0,1 vvm; sin embargo, al igual que Silva *et al.* (2010), detectan un descenso en el rendimiento (de 0,42 kg kg⁻¹ a 0,13 kg kg⁻¹) y productividad volumétrica en biomasa (de 0,90 kg m⁻³ h⁻¹ a 0,59 kg m⁻³ h⁻¹). Respecto a la levadura *C. guilliermondii* FTI 20037, fermentando bagazo de caña de azúcar, Silva *et al.* (1996) concluyen haber maximizado la producción de xilitol con una aeración de 0,46 vvm, agitación de 300 rpm y un K_La de 10,6 h⁻¹ (en un reactor tipo tanque agitado 'Multigen New Brunswick', de 1 dm³, equipado con deflectores y una turbina 'Rushton' de dos niveles de palas), detectándose pérdidas en cuanto a productividad volumétrica de hasta el 71% al aumentar el K_La hasta 41 h⁻¹. Morita y Silva

(2000), con este mismo hidrolizado y con la misma levadura, estudiando el efecto de la aeración, obtienen los mejores resultados fermentativos con una aeración de 3,0 vvm y una agitación 300 rpm, determinando un K_{La} de 22,5 h⁻¹ (reactor tipo tanque agitado 'Bioflo III, New Brunswick', de 1 dm³). Vaz de Arruda *et al.* (2017), fijan en sus estudios de fermentación con *C. guilliermondii* FTI 20037 sobre hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar, un valor de K_{La} de 16 h⁻¹, empleando reactores a tres escalas: 2,4, 18 y 125 dm³, con aeraciones y agitaciones de 0,7 y 450, 0,4 y 300 y, 0,1 vvm y 150 rpm, respectivamente (en los tres casos, estos autores utilizaron reactores tipo tanque agitado equipados con turbinas 'Rushton' de 6 palas a dos niveles de agitación). Por otro lado, Roberto *et al.* (1999), fermentando hidrolizado de paja de arroz con *C. guilliermondii* FTI 20037, maximizan la productividad volumétrica y rendimiento en xilitol cuando mantienen una agitación de 300 rpm y una aeración de 1,3 vvm con un K_{La} de 15 h⁻¹ (reactor tipo tanque agitado 'Multigen New Brunswick', 1 de dm³, equipado con turbina de tres niveles de 6 palas). Con este mismo subproducto y con la misma cepa, Mussatto y Roberto (2004), comparando el comportamiento cinético en Erlenmeyer y en biorreactor, sostienen la necesidad de mejorar las condiciones empleadas (0,2 vvm y 400 rpm con un K_{La} de 22 h⁻¹, en un reactor tipo tanque agitado (2 dm³) equipado con una turbina de dos niveles de 6 palas). Shirmer-Michel *et al.* (2008), fermentando hidrolizados de cáscara de soja, observaron que *C. guilliermondii* NRRL Y-2075 no fue capaz de asimilar D-xilosa bajo condiciones anaerobias, mientras que en condiciones microaerobias de 1 vvm, 300 rpm con un K_{La} de 8 h⁻¹ si que fue observada asimilación de D-glucosa, D-manosa y D-xilosa. Estos mismos autores no observaron producción de xilitol cuando emplearon un K_{La} de 46 h⁻¹ habiéndose visto afectados también el rendimiento y productividad volumétrica en etanol. Estos autores emplearon un fermentador tipo tanque agitado de 2 dm³.

En conclusión, la aeración es de gran importancia porque influye sobre el comportamiento del microorganismo respecto al sustrato empleado. Como se ha ido argumentando, en el caso de levaduras productoras de xilitol, Sampaio *et al.* (2008) señala que sólo las levaduras con actividad de la xilosa-reductasa asociada a NADH o bien tanto a NADH como NADPH, son capaces de producir etanol bajo condiciones anaerobias; en este grupo se encontraría *C. guilliermondii*, aunque bajo estas condiciones puede darse un cese en el crecimiento celular y, por consiguiente, sobre la producción de xilitol. Estos últimos autores proponen fijar unas condiciones microaeróbicas con una producción de biomasa controlada que proporcione rendimientos y productividades óptimas. En cuanto

a la producción de etanol por *P. stipitis*, Silva *et al.* (2012), señalan como punto de inflexión un K_{La} de 12 h^{-1} , ya que por encima de este valor ($> 18,7 \text{ h}^{-1}$) se dispara el crecimiento celular disminuyendo el rendimiento en etanol, mientras que por debajo de ese valor, la concentración de etanol superó al crecimiento de la biomasa; estos autores usan un reactor tipo tanque agitado de $1,6 \text{ dm}^3$.

CAPÍTULO



Objetivos

3

La poda de olivar, biomasa de carácter lignocelulósico, es un material composicionalmente rico en azúcares fermentables y por tanto, previsiblemente idóneo para su aprovechamiento por vía bioquímica: hidrólisis y fermentación. En este sentido, la disponibilidad de ciertos microorganismos, aptos para fermentar el medio de cultivo generado por hidrólisis, ofrecen todo un rango de posibilidades para la producción de diferentes bioproductos, aspecto que va estrechamente ligado a la especificidad entre el microorganismo y el medio de cultivo en cuestión.

De esta manera, el objetivo general de este trabajo es, en primer lugar, el fraccionamiento de la biomasa resultante de la poda de olivar con el fin de liberar la fracción hemicelulósica. En este sentido, se va a utilizar como materiales de partida la poda de olivo completa y la poda de olivo exenta de hoja. Esta etapa consistiría en la realización de ciertos experimentos de hidrólisis ácida, empleando ácidos clorhídrico y sulfúrico, que conduzcan a la obtención de un caldo de cultivo adecuado para el correcto desarrollo de los microorganismos, que serán usados en la siguiente etapa de fermentación. Esta segunda etapa, constituye el segundo gran objetivo de esta Tesis, y trata de utilizar ciertas cepas de levaduras capaces de fermentar el hidrolizado generado. Estas cepas serían: *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, buena productora de etanol y, *Candida guilliermondii* FTI 20037, buena generadora de etanol y xilitol a partir de azúcares fermentables (hexosas y pentosas) disueltos en los hidrolizados hemicelulósicos previamente acondicionados.

Durante la etapa de hidrólisis, se ha previsto la modificación de los parámetros más relevantes: tipo y concentración de ácido, temperatura y tiempo experimental. De esta manera, tras analizar el material de partida y el resultante tras el tratamiento termoquímico se podrá valorar la composición en que se encuentra el material tratado. Esta valoración se hará considerando la determinación del contenido en humedad y materia volátil, lignina, celulosa, hemicelulosa y cenizas. Aunque en los trabajos realizados en el Dpto. de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de São Paulo (Brasil), se va a emplear otro método el cual se ha descrito en el apartado 'Técnica experimental'. Por otro lado, se caracterizará también el hidrolizado ácido en vista a conocer la concentración de los diferentes monosacáridos y también ciertos compuestos inhibidores del crecimiento de las levaduras: ácido acético, compuestos fenólicos totales y furanos (furfural y 5-(hidroximetil)-furfural).

Un objetivo intermedio sería la elección del hidrolizado para la realización de las fermentaciones con levaduras. En este sentido, se valorará el perfil composicional del hidrolizado considerando los datos bibliográficos y pruebas de fermentación preliminares, con objeto de conocer la adaptación de *P. stipitis* y *C. guilliermondii* al medio de cultivo.

En cuanto a la fermentación mediada por los citados microorganismos, como se ha dicho, se van a realizar una serie de fermentaciones preliminares para observar el comportamiento de los mismos respecto al medio de cultivo. Igualmente, estas pruebas, que serán realizadas en el Dpto. de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil), pretenden servir para comprobar el efecto de la adición de diferentes medios nutricionales suplementarios, concentración inicial de células, pH, temperatura, comportamiento frente a diferentes inhibidores y conocimiento sobre el tipo de acondicionamiento del hidrolizado. Las fermentaciones serán caracterizadas por su contenido en azúcares, compuestos inhibidores, pH y bioproductos. Tras esto, se llevará a cabo el cálculo de los parámetros que caracterizan este tipo de operaciones, relacionados con la producción de biomasa, el consumo de sustrato y la formación de bioproductos.

En consideración a lo indicado anteriormente, los objetivos específicos de este trabajo se podrían resumir en los siguientes:

Etapas de hidrólisis:

- Caracterización físico-química de la biomasa de partida y del material sólido resultante tras la hidrólisis para calcular el grado de ataque que sufre el material, todo ello a través del cálculo de las conversiones en celulosa y hemicelulosa referidas al residuo de partida en base seca.
- Realización de los experimentos de hidrólisis para evaluar la influencia de los parámetros tipo y concentración de ácido, temperatura y tiempo experimental. Así mismo, se realizan varios tratamientos térmicos en ausencia de ácidos.
- Caracterización de los hidrolizados generados. Análisis de los diferentes tiempos experimentales en concentración de: monosacáridos, azúcares totales, e inhibidores.

- Cálculo de los rendimientos en monosacáridos. Aplicación del factor severidad y factor severidad combinado a los resultados obtenidos.
- Selección de las condiciones más favorables de hidrólisis de la fracción hemicelulósica y tipo de biomasa (poda de olivar completa o poda de olivar sin hoja) que permitan obtener un caldo de cultivo adecuado. Relación entre rendimientos máximos en monosacáridos y mínimos en inhibidores.

Etapas de fermentación:

- Acondicionamiento del hidrolizado tal cual se recoge en el apartado 'Técnica experimental': Concentración a vacío y ajuste de pH. En caso de *P. stipitis* hay que sumar la aplicación de detoxificación.
- Estudio preliminar del comportamiento del microorganismo en relación al medio de cultivo. Ensayo con diferentes medios nutricionales suplementarios y parámetros fermentativos: concentración inicial de células, pH, aeración temperatura y tiempo, y escalado a biorreactor de bancada de las mejores condiciones ensayadas. Esta parte experimental fue realizado en el Dpto. de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena (Universidad de São Paulo, Brasil).
- Caracterización y seguimiento de los cultivos. Concentración de biomasa, concentración de D-xilosa, D-glucosa y L-arabinosa residual, concentración en etanol, xilitol, ácido acético y lectura del pH.
- Experimentos de fermentación en biorreactor de bancada. Estudio de la concentración inicial de células y aeración. Caracterización y seguimiento de los cultivos, realizados en los laboratorios del Dpto. de Ingeniería Química, Ambiental y de Materiales de la Facultad de Ciencias Experimentales, de la Universidad de Jaén.

Cálculo de parámetros fermentativos. Producción de biomasa: velocidad específica de crecimiento (μ_m). Consumo de sustrato: rendimiento global en biomasa ($Y_{x/s}^G$) y velocidad específica de consumo de sustrato (q_s). Formación de bioproductos: velocidad específica de producción de etanol (q_E), velocidad específica de producción de xilitol (q_{Xi}), rendimiento en etanol ($Y_{E/s}$) y xilitol ($Y_{Xi/s}$).

CAPÍTULO



**Técnica
experimental**

4

4.1. Reactivos químicos y otros productos utilizados

a) Reactivos utilizados en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén.

1. Acetona, Q.P., (CH_3COCH_3), Panreac.
2. Acetona, Q.P., (CH_3COCH_3), Sigma Aldrich.
3. Ácido clorhídrico, P.A., (HCl), 35 %, Panreac.
4. Ácido etilendiaminotetraacético sal disódicadhidratada, P.A., Panreac.
5. Ácido sulfúrico, P.A., (H_2SO_4), 96 %, Panreac
6. Ácido fórmico, (H-COOH), 100%, Merck.
7. Agar-Agar, PRS, Panreac.
8. Agua ultrapura, resistividad 18,2 m Ω cm.
9. D-Arabinosa, ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$), 99 %, Sigma.
10. Bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio , P.A., ($\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{NBr}$), Panreac.
11. Carbonato de sodio, (Na_2CO_3), 99,5%, Sigma.
12. Disolución tampón pH=4,01, No Cat. 23-110-02, Crison.
13. Disolución tampón pH=7,00, No Cat. 23-111-02, Crison.
14. Electrolito (KCl 3M + AgCl), No Cat. 95-01, Crison.
15. Etanol absoluto, PRS, ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), Panreac.
16. Etilenglicol, P.A. ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$), Panreac.
17. Extracto de levadura, granulado, Merck.
18. Extracto de malta, Merck.
19. Fosfato diácido de potasio, P.A., (KH_2PO_4), Panreac.
20. Fosfato monoácido de sodio dodecahidratado, P.A., ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), Merck.
21. D-Glucosa anhidra, P.A., ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), Panreac.
22. Hidróxido de sodio, P.A., (NaOH), 99 %, Panreac.
23. Hidróxido de sodio, (NaOH), 50 %, J. T. Baker.
24. 5-(Hidroximetil)furfural , ($\text{C}_6\text{H}_6\text{SO}_3$), 99 %, Sigma.
25. Lana de vidrio lavada, pura, Panreac.
26. Lauril sulfato sódico, ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$), 98 %, Sigma.
27. 1-Pentanol, ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}$), Panreac.
28. Peptona de caseína, granulado para microbiología, Merck.

29. Reactivo enzimático para la determinación de ácido acético, No Cat. 148261, Boëhringer Mannheim.
30. Reactivo enzimático para la determinación de etanol, No Cat. 176290, Boëhringer Mannheim.
31. Reactivo enzimático para la determinación de xilitol/D-sorbitol, No Cat. 670057, Boëhringer Mannheim.
32. Reactivo de FolinCiocalteau, Panreac.
33. Silicona líquida, Q.P., Código 216241, Panreac.
34. Silicona V50, Guinama.
35. Sulfato de amonio, P.A., $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, Panreac.
36. Sulfato de magnesio heptahidratado, P.A., $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$, 99,5 %, Carlo Erba.
37. Sulfito de sodio anhidro, P.A., (Na_2SO_3) , Panreac.
38. Sulfito de sodio heptahidratado, P.A., $(\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$, Panreac.
39. Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado, P.A., 99 %, $(\text{COOK}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$, Carlo Erba.
40. Tetraborato de sodio decahidratado, P.A., $(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O})$, Panreac.
41. D-xilosa anhidra, PRS, $(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5)$, Panreac.

b) Reactivos utilizados en los laboratorios del Departamento de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil):

1. Ácido Sulfúrico, P.A. - A.C.S., (H_2SO_4) , 96%, Synth.
2. Acetonitrilo, UV/HPLC, (CH_3CN) , Sigma Aldrich-Vetec.
3. Ácido acético glacial, P.A. - A.C.S., $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2)$, 99,7%, Sigma Aldrich - Vetec
4. Agar powder, Bacteriological, Himedia.
5. Carbón activo, Synth.
6. Carbonato de sodio, (Na_2CO_3) , 99,5% , Synth
7. Clorato de calcio dihidratado, P.A., $(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$, Cromoline.
8. D (+) glucosa anhidra P.A., $(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6)$, Vetec.
9. D (+) xilosa anhidra, PRS, $(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5)$, Sigma - Aldrich.
10. Extracto de levadura, granulado, Himedia.
11. Extracto de malta, granulado, Himedia.
12. Fosfato monoácido de potasio anhidro, P.A., (K_2HPO_4) , Synth.
13. Fosfato diácido de potasio anhidro, A.C.S., (KH_2PO_4) , Quimibrás.

14. Hidróxido de sodio, P.A., (NaOH), (lentejas), Cromoline.
15. L(+)-Arabinosa, 99%, Sigma-Aldrich.
16. Peptona, Bacteriológica, Himedia.
17. Reactivo de Follin Ciocalteau, Dinâmica.
18. Sulfato de amonio, P.A., $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Cirq.
19. Sulfato de magnesio heptahidratado, P.A.- A.C.S., $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$, 99,5 %, Nuclear.

4.2. Descripción de las instalaciones experimentales

Los experimentos de hidrólisis se han realizado en instalaciones a escala de laboratorio y miniplanta. Los primeros se realizaron en las dependencias del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén. En el Departamento de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil), se realizaron los experimentos a escala miniplanta.

Las instalaciones de fermentación han sido en todo caso a escala de laboratorio y se han utilizado agitadores orbitales y biorreactores.

4.2.1. Instalaciones experimentales de hidrólisis ácida

4.2.1.1. Escala de laboratorio

La instalación se diseñó para la realización de todos los experimentos de hidrólisis ácida realizados. Sus componentes pueden observarse en la Figura 4.1 y consta de:



Figura 4.1: Instalación de hidrólisis ácida a escala de laboratorio.

a) Reactor de geometría cilíndrica y fondo redondo, construido en vidrio Pyrex, provisto de tapa con cinco bocas y de una camisa de termostatación por la que circula silicona que mantiene la temperatura constante en el interior de dicho reactor. El volumen útil es de 1,0 dm³, el diámetro interno es de 10,0 cm, el diámetro externo es de 12,5 cm, la altura interior es de 15,0 cm y la altura exterior es de 20,5 cm. Cuatro de las cinco bocas se ocupan con:

- Cierre de agitación, Quickfit ST 20/4, a través del cual se introduce la varilla de agitación, de acero inoxidable recubierto de teflón, de 50 cm de longitud, con terminación tipo ánora, de 7,5 cm de diámetro.
- Refrigerante de reflujo, tipo Dimroth, encamisado. Permite mantener una presión constante en el reactor a la vez que impide pérdidas por evaporación. En su parte superior dispone de una varilla de condensación para asegurar la ausencia de pérdidas por evaporación.
- Termómetro de mercurio, con escala de 0 a 200 °C ensamblado a una de las 5 bocas del reactor a través de una pieza de vidrio con extremo esmerilado (rosca 14/23).
- Jeringa estéril de 5 cm³ para la toma de muestras conectada al reactor a través de una de las 5 bocas mediante una pieza de vidrio con extremo esmerilado (rosca 14/23) a partir de la cual parte un tubo de silicona que se interna en el reactor. Para evitar pérdidas por evaporación se utiliza una pinza Hoffman para cerrar dicho tubo.

b) Baño de silicona, con termostato de inmersión, selector de temperatura y bomba de recirculación Selecta (mod. Ultraterm 200), para la alimentación de la camisa del reactor.

c) Agitador Heidolph (mod. RZR-2000), equipado con cuentarrevoluciones digital, lo que permite controlar la agitación de la varilla que se encuentra conectada en la cabeza del agitador manteniendo una agitación adecuada para obtener condiciones de homogeneidad en el reactor.

4.2.1.2. Escala miniplanta

El reactor de hidrólisis empleado consta de un cilindro de acero inoxidable con cabeza desplazable por bisagra y equipada con manómetro y seis llaves de seguridad. Para la purga o vaciado, el reactor dispone en su parte inferior de una salida controlada por una válvula de mariposa. El sistema de calentamiento se realiza por medio de resistencias eléctricas y el control de la temperatura es digital. Externamente, reposa sobre un sistema de sujeción construido en hierro sobre el que se dispone un mecanismo de anclaje que deriva a un sistema de correas y poleas que mediante un motor eléctrico permite una rotación fija de 2 vueltas por minuto. El volumen útil es de 50 dm³ y sus dimensiones internas son de 55×34 cm, Figura 4.2.



Figura 4.2: Reactor de hidrólisis a escala miniplanta.

4.2.2. Instalaciones para la concentración de hidrolizados

Se han utilizado dos tipos de sistemas:

a) Rotavapor Büchi (mod. R-114). Equipo de concentración a vacío equipado con baño termostático Büchi (mod. B-480) y bomba de vacío eléctrica Vacuubrand GMBH+CO (mod. NZ 2C). Este equipo se ha utilizado en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén.

b) Concentrador Precision Scientific de 5 dm³ de capacidad nominal y que opera en discontinuo a una temperatura de 70 ± 5 °C. El vacío se produce mediante una bomba eléctrica de vacío, mientras que el calentamiento se consigue mediante un intercambiador de calor de carcasa y tubo por el que circula agua caliente en circuito cerrado procedente de un autoclave. Este equipo se ha utilizado en el Departamento de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil), Figura 4.3.



Figura 4.3: Concentrador Precision Scientific.

4.2.3. Descripción de las instalaciones experimentales de fermentación

4.2.3.1. Fermentación en Erlenmeyer

Se han utilizado agitadores orbitales Tecnal (mod. TE-420). El control de la temperatura es digital y como sensor utiliza una sonda térmica PT-100, siendo la temperatura de trabajo máxima de 55 °C y la mínima la temperatura ambiente. Permite el control de la agitación entre 30 y 250 rpm mediante un controlador analógico con display digital. Posee motor de inducción de 1/6 cv. Puede trabajar con matraces Erlenmeyer de diferente volumen. De tal forma, las plataformas de trabajo intercambiables permiten trabajar con: 20 Erlenmeyer de 125 cm³, 20 de 250 cm³, 12 de 0,5 dm³ y 4 de 1 dm³. La cabina móvil es de metacrilato y las dimensiones son 500 mm de largo, 600 mm de alto y 520 mm de ancho. El peso del equipo es de 40 kg y trabaja a una potencia de 600 W y 220 V. Figura 4.4.



Figura 4.4: Agitador orbital Tecnal (mod. TE-420).

4.2.3.2. Fermentación en biorreactores

Se han utilizado dos tipos de biorreactores:

a) Descripción de la instalación de fermentación utilizada en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén.

El centro fundamental del montaje, Figura 4.5, son los vasos de cultivo de geometría cilíndrica, contruidos en vidrio Pyrex y provistos de 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. El volumen útil es de 2,0 dm³, el diámetro interno es de 10,5 cm, el diámetro externo es de 13,5 cm, la altura interior es de 25,0 cm y la altura exterior es de 26,5 cm.

Para la introducción del medio de cultivo en cada uno de los vasos se ha utilizado una bomba peristáltica Millipore (mod. XX80 202 30) y gomas de silicona provistas de portafiltros y filtros esterilizados.

Cada uno de los biorreactores está provisto de una tapa con cuatro bocas. Una de estas se ha utilizado para la toma de muestras, que se realiza mediante un tubo de goma de silicona que se ensambla a una pieza de vidrio con extremo esmerilado. En la parte externa del tubo se coloca una pinza de Hoffman para evitar la contaminación del medio, la toma de muestras se realiza mediante una jeringa estéril de 5 cm³. Otra de las bocas se ha usado para el suministro de aire, el cual será comentado en el siguiente apartado. La boca central se ha provisto de tapón de vidrio 29/32 sin ajustar completamente, para asegurar una fermentación microaeróbica y la boca restante se ha cerrado mediante un tapón de vidrio 14/23.

Con la idea de operar en lotes, los biorreactores se han unido entre sí mediante gomas de silicona. Esto permite la circulación del fluido de termostatación a través de la camisa de cada uno de los vasos de cultivo, a partir de un baño de agua, con termostato y bomba de circulación Selecta (mod. Tectron 3000543).

Cada vaso de cultivo está provisto de un equipo de agitación magnética consistente en un agitador magnético Heidolph (mod. MR2000) colocado bajo el propio vaso y a una

varilla de acero recubierta de teflón, de forma cilíndrica (8 mm de diámetro y 40 mm de altura) que se coloca en el interior del mismo. La agitación se fija mediante un cuentarrevoluciones Heidolph (mod. MR2002), que se conecta al agitador magnético. Inicialmente la velocidad de agitación se mantiene en 500 rpm para un volumen de medio de cultivo en el reactor de 500 dm³, esta relación agitación:volumen se mantendrá en todos los experimentos de fermentación.

Para la medida del pH en cada biorreactor, se ha utilizado un pH-metro Crison (mod. GLP 22).



Figura 4.5: Instalación de 4 biorreactores de bancada conectados en serie.

La instalación de fermentación se ha diseñado con posibilidad de suministrar aire en aquellos experimentos en que fuera requerido. El aire se ha suministrado por medio de dos bombas-compresores Sera (mod. 550R), que disponen de regulador de caudal. Para la conducción se ha optado por tubos de goma de silicona de diámetro adecuado, que introducirán el aire en el reactor mediante conexión externa entre el tubo y una varilla de vidrio, con extremo inferior poroso, que se interna en el reactor. De esta forma se provoca un efecto difusor de la corriente de aire, creando pequeñas burbujas.

Antes de internarse en el reactor, la conducción de aire soporta otros elementos como el sistema de humidificación, cuya finalidad es saturar la corriente de aire en humedad

previamente a la entrada de esta en el biorreactor y, reducir así la evaporación del medio de cultivo.

La cuantificación del caudal de aire introducido en el biorreactor se realiza mediante manómetros diferenciales de dos líquidos (agua y alcohol amílico coloreado con yodo) cada uno con su correspondiente diafragma, el cual permite la determinación de una diferencia de presión medible y, por consiguiente y previa calibración, el control y la medida del caudal de aire que entra en cada biorreactor. El último elemento conectado al sistema es un filtro Millipore (mod. Millex-FG₅₀) de 0,2 μm de tamaño de poro, con la finalidad de esterilizar el aire antes de entrar en contacto con el medio de cultivo.

Los diafragmas se han calibrado mediante un medidor de burbuja conectado en serie a la instalación. De esta forma se han tomado las diferencias de altura manométrica, Δh, al paso de caudales conocidos de aire, Q. Tras ser obtenidos los resultados de calibración, Tabla 4.1, y representados en coordenadas logarítmicas, Figura 4.6, se han obtenido, mediante el método de mínimos cuadrados, las ecuaciones que se muestran en la Tabla 4.2, donde Q se expresa en cm³ s⁻¹ y Δh en mm.

Tabla 4.1: Calibrado de los diafragmas de los manómetros diferenciales utilizados.

Medidor 1		Medidor 2		Medidor 3	
Δh, mm	Q, cm ³ s ⁻¹	Δh, mm	Q, cm ³ s ⁻¹	Δh, mm	Q, cm ³ s ⁻¹
10	1,07	2	4,06	68	1,00
20	1,71	4	5,19	70	1,02
40	2,59	6	7,13	82	1,15
60	3,29	8	8,06	117	1,43
80	3,84	10	9,49	127	1,49
100	4,40	12	10,28	152	1,80
120	4,90	18	12,92	182	2,05
140	5,31	20	14,19	208	2,26
160	5,83	30	18,64	234	2,47
200	6,68	40	21,47	265	2,70

Tabla 4.2: Ecuaciones de ajuste del calibrado de los diafragmas.

Medidor 1	log Q = 0,601 log Δh - 0,558	r ² = 0,999
Medidor 2	log Q = 0,576 log Δh + 0,401	r ² = 0,993
Medidor 3	log Q = 0,729 log Δh - 1,335	r ² = 0,993

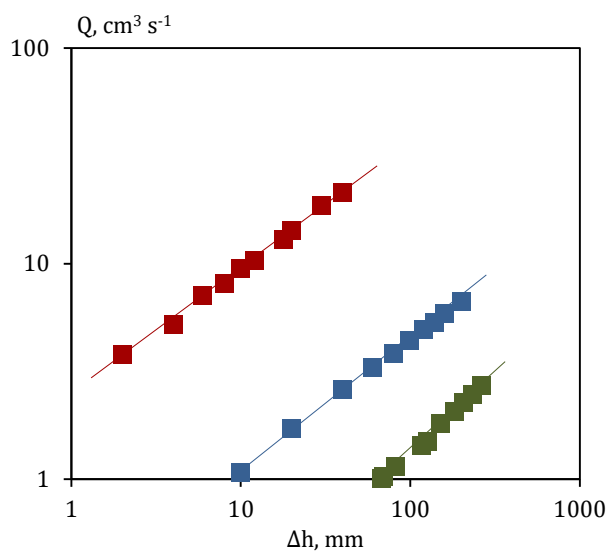


Figura 4.6: Rectas de calibrado de diafragmas utilizados: medidor 1 (■), medidor 2 (■) y medidor 3 (■).

b) Descripción de la instalación de fermentación utilizada en los laboratorios del Departamento de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de São Paulo (Brasil).

El sistema utilizado consiste en un biorreactor B. Braun Biotech International – Sartorius Group (modelo Biostat B). Equipado con módulo de control y vaso de cultivo, Figura 4.7.

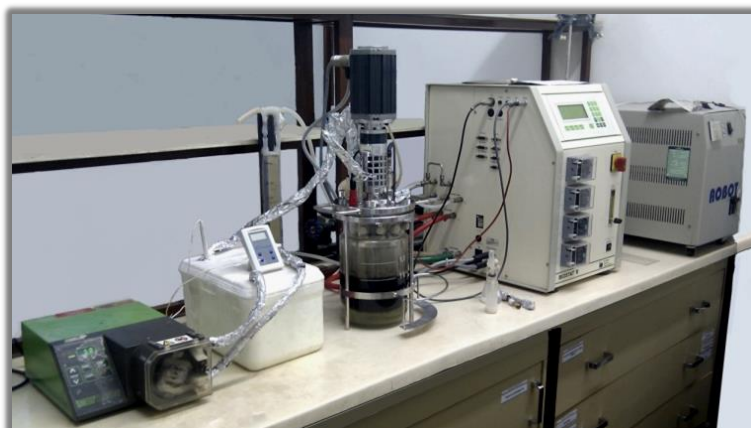


Figura 4.7: Biorreactor B. Braun Biotech International –Sartorius Group (mod. Biostat B).

El vaso de cultivo de geometría cilíndrica, construido en borosilicato, está provisto de 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. El volumen total es de 3,0 dm³ con una relación altura:diámetro de 2:1. El volumen máximo de trabajo es de 2 dm³. El vaso de cultivo posee una cabeza de acero inoxidable provista de varios puertos destinados a la sonda de pH, a la de oxígeno, mangueras, sistema de termostatación, las dimensiones y número de puertos es:

- 2 puertos de 19 mm de diámetro,
- 9 puertos de 6 mm de diámetro,
- 4 conectores para manguera de 4 mm de diámetro,
- 2 puertos de 12 mm de diámetro.

La cabeza del reactor también soporta el motor del sistema de agitación (50 a 1200 rpm), cuyo eje vertical se interna en el vaso de cultivo y termina en una pala desplazable tipo 'Rushton' de seis placas con simetría radial colocada a 40 mm de la base inferior del reactor.

En el módulo de control se registran y programan las variables de operación: temperatura, pH, caudal de oxígeno, presión de oxígeno, sonda para antiespumante, así como la acción de las cuatro bombas peristálticas equipadas con botes de almacenamiento de 250 cm³.

La introducción del medio de cultivo se realiza por unas de las bocas del vaso de cultivo utilizando un embudo de vidrio previamente esterilizado.

El aire suministrado proviene de un circuito interno y se introduce al reactor previo paso por el manómetro ubicado en el módulo de control y posterior esterilización por filtro Millipore (mod. Millex-FG₅₀), de 0,2 µm de tamaño de poro.

Previamente a cada fermentación el vaso de cultivo junto a la cabeza son esterilizados en autoclave. Según el fabricante el tamaño mínimo del autoclave debe tener una altura de 550 mm y un diámetro de 360 mm.

4.3. Métodos analíticos

4.3.1. Caracterización de material lignocelulósico

Por material lignocelulósico se entiende tanto al material de poda empleado en los experimentos como al material sólido posthidrolítico. Los parámetros empleados para la caracterización de todos los residuos sólidos son los siguientes: humedad y materia volátil, cenizas, lignina, celulosa, hemicelulosa y, en su caso, grupos acetilo. A estos se une el peso del residuo sólido generado tras hidrólisis.

4.3.1.1. Humedad y materia volátil

La determinación del contenido en humedad y materia volátil (HMV) se ha calculado a partir de la pérdida de peso experimentada por el sistema cuando se somete a una temperatura constante de 105 ± 1 °C, durante un tiempo suficiente para alcanzar pesada constante.

Este parámetro se ha determinado mediante la norma TAPPI T 11 m-59.

El procedimiento operatorio consiste en el acondicionamiento previo del material, dejándolo esparcido sobre papel de filtro para que alcance la humedad de equilibrio ambiente. A continuación, se pesa una muestra de aproximadamente un 1 g utilizando una balanza de precisión y un vaso de precipitados previamente secado en estufa Memmert (mod. UE 500) a 105 ± 1 °C hasta pesada constante. La muestra se deseca en estufa a 105 ± 1 °C hasta pesada constante. El contenido en humedad (%) se ha determinado finalmente mediante la expresión 4.1.

$$\text{HMV (\%)} = \frac{m_i - m_s}{m_i} 100 \quad (4.1)$$

Donde:

m_s : peso de la muestra seca, g

m_i : peso inicial de la muestra, g

4.3.1.2. Cenizas

Las cenizas (CEN) corresponden al residuo resultante de la incineración de la materia orgánica del residuo sólido y constituyen una medida del contenido en sales minerales de la muestra. Esta operación se realiza a una temperatura de 575 ± 25 °C durante un tiempo de 3 horas. El equipo utilizado es un horno de mufla Thermolyne (mod. 1300) con selector de temperatura y rampa de calentamiento

Se han determinado mediante la norma TAPPI T 15 os-58.

Se procede incinerado un crisol de porcelana vacío (para eliminar un posible error por incrustaciones), enfriado en un desecador y tarado. Tras esto, se pesa aproximadamente 1 g de material completamente seco o de humedad conocida y se calienta en el horno de mufla durante un período de tiempo de 3 horas ampliable hasta garantizar la calcinación completa. Por último, se deja enfriar en un desecador y se toma la pesada en una balanza de precisión. El contenido en cenizas (%) se ha determinado finalmente mediante la expresión (4.2).

$$\text{CEN}(\%) = \frac{m_c}{m_s} 100 \quad (4.2)$$

Donde:

m_c : peso de las cenizas, g

m_s : peso de la muestra seca, g

4.3.1.3. Lignina

La lignina (LIG) es un polímero que representa el llamado “material de incrustación o cementante” que forma parte de la pared celular y de la lamela media en maderas y, que posee como función principal dar rigidez a la planta. Es una resina aromática y amorfa que contiene grupos metoxi e hidroxilo.

Para la determinación del contenido en lignina se ha empleado la norma TAPPI T 222 os-74. Según esta norma, se define la lignina como el constituyente de la madera insoluble en H_2SO_4 del 72%.

Para proceder se pesa una muestra de aproximadamente 1 g de material sólido seco o de humedad conocida, se lleva a un vaso de precipitado de 100 cm³ de capacidad, adicionando 15 cm³ de H₂SO₄ del 72% y tapando el vaso con vidrio de reloj. Se mantendrá la solución a 20 °C durante un tiempo de 2 horas, debiéndose agitar frecuentemente para favorecer la dispersión del material. Transcurrido este tiempo se vierte el contenido del vaso en un matraz de fondo esférico de 1 dm³, adicionando agua ultrapura hasta alcanzar un volumen total de 575 cm³. A continuación, llevamos la disolución a ebullición durante 4 horas, manteniendo constante el volumen inicial mediante condensadores de reflujo tipo Dimroth y varillas de condensación. Transcurrido este período de tiempo, se deja que el material insoluble (lignina) sedimente y se filtra a través de una placa porosa provista previamente de una mata de lana de vidrio (para evitar que las dispersiones coloidales que forma la lignina obstruyan los poros de la placa) lavando el contenido del matraz y el de la placa con agua destilada caliente. La placa porosa ha sido secada en estufa a 105 ± 1 °C hasta pesada constante y tarada. Por último, se seca la lignina, junto con la placa, en una estufa Memmert (mod. UE 500) a 105 ± 1 °C hasta pesada constante. El contenido en lignina (%) se ha determinado finalmente mediante la expresión (4.3).

$$\text{LIG}(\%) = \frac{m_{fi}}{m_s} 100 \quad (4.3)$$

Donde:

m_{fi} : peso de la fracción insoluble, g

m_s : peso de la muestra seca, g

4.3.1.4. Celulosa y hemicelulosa

Para la determinación del contenido en celulosa (CEL) y hemicelulosa (HEM) se ha empleado el método de Van Soest y Wine (1967). De esta manera, han sido determinados los porcentajes de fibra ácido detergente (FAD) y de fibra neutro detergente (FND), que junto con el porcentaje en lignina y a través de las expresiones (4.3) y (4.4) permiten el cálculo de los contenidos (%) en celulosa y hemicelulosa.

$$\text{CEL}(\%) = \text{FAD}(\%) - \text{LIG}(\%) \quad (4.3)$$

$$\text{HEM}(\%) = \text{FND}(\%) - \text{FAD}(\%) \quad (4.4)$$

Fibra ácido detergente

La fibra ácido detergente constituye el material insoluble, formado fundamentalmente por lignina y celulosa, que se obtiene tras someter la muestra a 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 prepara disolviendo 20 g de bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetil amonio con ácido sulfúrico 1 N, enrasando a 1 dm³.

Se procede pesando 1 g de material seco o de humedad conocida y se le añaden 100 cm³ de disolución ácido detergente y algunas gotas de n-pentanol, que actúa como antiespumante, y se somete a ebullición durante 2 horas en un matraz de fondo esférico de 500 cm³. A continuación, se filtra a vacío a través de una placa porosa, previamente secada en estufa a 105 ± 1 °C hasta pesada constante y tarada, se lava varias veces con agua destilada caliente y después con acetona, por último se seca en estufa a 105 ± 1 °C hasta pesada constante. El contenido en lignina (%) se ha determinado finalmente mediante la expresión (4.5).

$$\text{FAD (\%)} = \frac{m_{fi}}{m_s} 100 \quad (4.5)$$

Donde:

m_{fi} : peso de la fracción insoluble, g

m_s : peso de la muestra seca, g

Fibra neutro detergente

La fibra neutro detergente constituye el material 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 de detergente se prepara disolviendo 37,2 g de Na₂B₄O₇ en agua ultrapura calentando suavemente. Se adicionan 60 g de lauril sulfato sódico y 20 cm³ de

etilenglicol. A parte se disuelven 12,9 g de fosfato monoácido de sodio que se une a la primera disolución enrasando a 2 dm³ con agua ultrapura. Filtrando la disolución, si es necesario, por la existencia de materias extrañas en suspensión.

El procedimiento operatorio es el siguiente: se pesa 1 g de material seco o de humedad conocida y se le añaden 100 cm³ de disolución neutro detergente y algunas gotas de n-pentanol, que actúa como antiespumante, y se somete a ebullición durante 2 horas en un matraz de fondo esférico de 500 cm³. A continuación, se filtra a vacío a través de una placa porosa, previamente secada en estufa a 105 ± 1 °C hasta pesada constante y tarada, se lava varias veces con agua destilada caliente y después con acetona, por último se seca en estufa a 105 ± 1 °C hasta pesada constante. El contenido en lignina (%) se ha determinado finalmente mediante la expresión (4.6).

$$\text{FND (\%)} = \frac{m_{fi}}{m_s} 100 \quad (4.6)$$

Donde:

m_{fi} : peso de la fracción insoluble, g

m_s : peso de la muestra seca, g

4.3.1.5. Aplicación del método de Browning y Rocha

El material de poda se ha caracterizado en cuanto a celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas, basándose en la metodología descrita por Browning (1967). Aproximadamente 2 g de material de poda seco *in natura* se vierten en un vaso de precipitados de 50 cm³ y se adicionan 10 cm³ de ácido sulfúrico (72% p/p). Esta mezcla se mantiene en un baño termostático (Microcanal modelo B.15) a 60 °C durante 7 min, agitando constantemente con una varilla de vidrio. Tras esta etapa se transferirá el contenido del vaso de precipitados a un matraz Erlenmeyer de 500 cm³ diluyendo con 275 cm³ de agua destilada e interrumpiendo de esta manera la reacción. De forma inmediata se cierra el matraz con aluminio y se autoclava a 1 atm, 121 °C durante 45 minutos, para conseguir una hidrólisis completa de los oligómeros residuales.

Después de la reacción de hidrólisis, el matraz se enfría a temperatura ambiente y se realiza la separación sólido-líquido por filtración con papel de filtro previamente tarado. El hidrolizado se lleva a un matraz aforado de 500 cm³, mientras que el sólido contenido

en el papel de filtro se lava con agua destilada de manera que el líquido vaya cayendo al matraz aforado.

La fracción líquida obtenida se analiza por cromatografía líquida iónica de alta resolución y cromatografía líquida de alta resolución obteniendo las concentraciones de glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa y ácido acético que serán necesarias para el cálculo de los porcentajes de celulosa (ecuación 4.7), hemicelulosa (ecuación 4.8) y grupos acetilo (ecuación 4.9) existentes en el residuo de poda.

$$CEL, \% = \frac{M_G}{M_{PA}} F_C F_{ph} 100 \quad (4.7)$$

$$HEM, \% = \frac{M_G + M_A}{M_{PA}} F_C F_{ph} 100 \quad (4.8)$$

$$GA, \% = \frac{M_{HAc}}{M_{PA}} F_C 100 \quad (4.9)$$

Donde:

M_{PA} : peso seco del material de poda *in natura*, g

M_G : concentración de glucosa (kg m^{-3}) x 0,5 L

M_X : concentración de xilosa (kg m^{-3}) x 0,5 L

M_A : concentración de arabinosa (kg m^{-3}) x 0,5 L

M_{HAc} : concentración de ácido acético (kg m^{-3}) x 0,5 L

F_{ph} : factor de pérdida de hidrólisis: celulosa (1,055) y hemicelulosa (1,155)

F_C : factor de conversión: celulosa (0,9), hemicelulosa (0,88) y grupos acetilo (0,72)

El residuo sólido retenido en el papel de filtro (lignina insoluble) se lava nuevamente ($1,5 \text{ dm}^3$ de agua destilada) y se seca en estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta pesada constante. Tras esto, se determinarán las cenizas por calcinación en horno de mufla a $800 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas o hasta obtener cenizas blancas. Los porcentajes de lignina insoluble y de cenizas se calculan de acuerdo a las ecuaciones 4.10 y 4.11 respectivamente.

$$\% \text{ LIGi} = \frac{M_{RS}}{M_{PA}} 100 \quad (4.10)$$

$$\% \text{ CEN} = \frac{M_C}{M_{PA}} 100 \quad (4.11)$$

Donde:

M_{RS} : peso seco del material sólido – masa de cenizas, g

M_{PA} : peso seco del material de poda *in natura*, g

M_C : masa de cenizas tras la calcinación, g

Para la determinación de la lignina insoluble en medio ácido se utiliza la metodología descrita por Rocha (2000). Una alícuota de 5 cm³ de hidrolizado se alcaliniza hasta pH 12 con NaOH (6M) y se diluye en 100 cm³ de agua destilada. Tras esto, se lee la absorbancia de la solución utilizando un espectrofotómetro Hitachi High Technologies Corporation, Tokyo, Japan, a una longitud de onda de 280 nm utilizando agua destilada como referencia (A_{Lig280}). La concentración de lignina soluble será calculada de acuerdo con las ecuaciones 4.12 y 4.13. Teniendo en cuenta la normalización de la concentración de furfural y 5-(hidroximetil)furfural en función del factor de dilución empleado. El porcentaje de lignina soluble se calcula conforme la ecuación 4.14.

$$A_{PD280} = (C_F \times \epsilon_F + C_{HMF} \times \epsilon_{HMF}) \quad (4.12)$$

$$C_{LIGs} = [4,187 \cdot 10^{-2} (A_{Lig280} \times A_{PD280}) - 3,279 \cdot 10^{-4}] \quad (4.13)$$

$$\% LIGs = \frac{C_{LS} \times 0,5 \times 100}{M_{PA}} \quad (4.14)$$

Donde:

M_{PA} : masa seca del material de poda *in natura*

C_{LIGs} : concentración de lignina soluble en medio básico, kg m⁻³

A_{Lig280} : absorbancia de la solución a 280 nm x FD

C_F : concentración de furfural, kg m⁻³

C_{HMF} : concentración de 5-Hidroximetilfurfural, kg m⁻³

ϵ_F : coeficiente de extinción del furfural (146,85 m³ kg⁻¹ m⁻¹)

ϵ_{HMF} : coeficiente de extinción del 5-hidroximetilfurfural (114,00 m³ kg⁻¹ m⁻¹)

4.3.2. Caracterización de hidrolizados

4.3.2.1. Medida del pH

Los equipos utilizados para la medida del pH han sido:

Equipo 1. Medidor de pH, Crison (mod. GLP 22). Este medidor de pH se ha utilizado en las dependencias del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los materiales de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén.

Equipo 2. Medidor de pH, Hanna Instrument (mod. HI221). Este medidor de pH se ha utilizado en las dependencias del Departamento de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil).

4.3.2.2. Determinación de azúcares monoméricos

a) Cromatografía líquida iónica de alta resolución (HPILC)

El equipo utilizado para la determinación de azúcares monoméricos, en las dependencias del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los materiales de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén, ha sido un cromatógrafo líquido iónico de alta resolución Dionex (mod. ICS 3000) conectado a un equipo informático en el que se ha instalado el software Chromeleon 5.0, que monitoriza el sistema cromatográfico calculando las concentraciones de azúcares e inhibidores a partir de patrones puros de estas sustancias y ajustados mediante rectas de calibrado, Tabla 4.3 y Figura 4.8.

Mediante este equipo se han determinado las concentraciones de: HMF, L-arabinosa, D-galactosa, D-glucosa, D-xilosa, D-manosa y D-fructosa.

Está equipado con una columna analítica CARBOPAD (mod. PA20 (3 x 150 mm)) en combinación con una columna de seguridad CARBOPAD (mod. PA20 (3 x 30 mm)). El equipo utiliza una bomba isocrática con válvula de doble posición y un sistema de detección amperométrica con electrodo de AgCl como referencia. La elución se ha llevado a cabo a 30 °C con NaOH a una concentración de 2 mM. Se ha fijado una etapa de pre-elución (estabilización del equipo) de 15 minutos y otra de post-elución (regeneración de la columna) de 10 minutos en ambas se ha utilizado una disolución 200 mM de NaOH.

Las condiciones de trabajo en el HPILC para la columna CARBOPAD PA20 han sido las siguientes:

Caudal de la fase móvil: $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$.

Presión de seguridad: 4000 psi (28 MPa).

Presión de trabajo: 3000-3500 psi.

Volumen de muestra inyectado: 1 cm^3 .

Volumen de muestra para el análisis: 10 mm^3 .

Tiempo de análisis: 21 min.

Una vez se han preparado los eluyentes: fase móvil (NaOH, 2 mM), disolución de limpieza (NaOH, 200 mM) y agua ultrapura; se deben desgasificar estos para garantizar la ausencia de burbujas de aire en el equipo, para esto, se procede a un burbujeo con helio durante 20 minutos a una presión de 20 kPa \approx 3 psi. A continuación, se pone en marcha el cromatógrafo realizando una purga del módulo de bombas para cada uno de los tres eluyentes, fijando un caudal de $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ durante 5 minutos. Más tarde, comienza la rutina de termostatación de la columna para, una vez alcanzada la temperatura de trabajo de 30 °C, proseguir con una rutina de arranque y un período de estabilización del equipo.

La rutina de arranque programada para la estabilización del equipo ha sido la siguiente:

Flujo de trabajo: $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$.

Presión de seguridad: 4000 psi (28 MPa).

Presión de trabajo: 2000-2500 psi.

Etapas de pre-elución: 15 minutos, NaOH 200 mM.

Etapas de elución: 21 minutos, NaOH 2 mM.

Etapas de post-elución: 10 minutos, NaOH 200 mM.

Test de correcto funcionamiento del equipo: 6 minutos (impuesto por el software).

Una vez ha finalizado la rutina de arranque y tras aguardar hasta la estabilización del equipo se está en disposición de trabajo. El equipo se encuentra preparado para la inyección de la muestra o de una dilución de la misma con agua ultrapura previa filtración por membrana de nailon de $0,22 \mu\text{m}$. La filtración de la muestra es obligada

para evitar obstrucciones en el equipo que conlleven a un deterioro de la columna o de inestabilidad en la señal que llega al detector.

Tabla 4.3: Tiempos de retención y ecuaciones de los carbohidratos para la columna CARBOPAD PA20.

Compuesto	Tiempo de retención, min	Concentración, kg m ⁻³
HMF	1,883	0,000 – 0,045
L-Arabinosa	7,781	0,000 – 0,010
D-Galactosa	9,872	0,000 – 0,004
D-glucosa	11,550	0,000 – 0,025
D-xilosa	13,890	0,000 – 0,025
D-Manosa	14,950	0,000 – 0,010
D-Fructosa	16,800	0,000 – 0,010

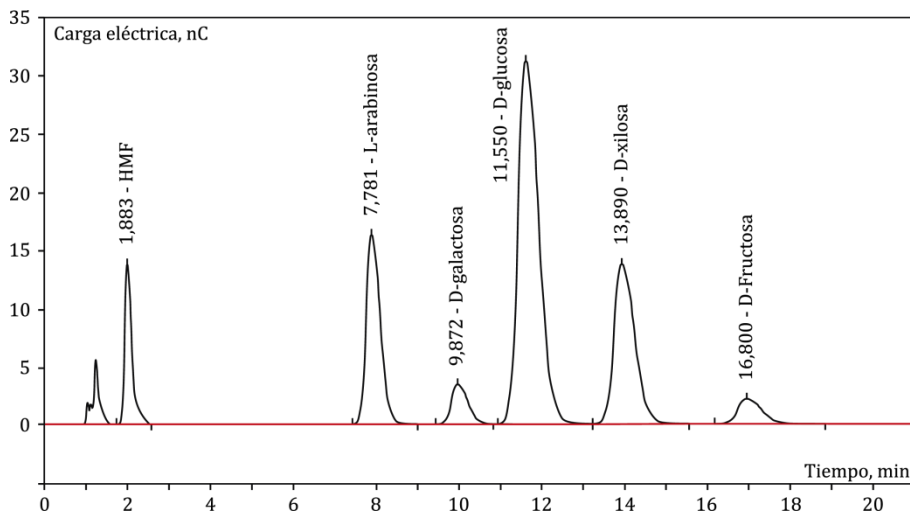


Figura 4.8: Cromatograma HPILC de un experimento de hidrólisis. Determinación de azúcares y otros compuestos realizada en el Dpto. de Ingeniería Química, Ambiental y de los materiales (Universidad de Jaén).

b) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Durante la estancia de investigación realizada en el Dpto. de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil), los monosacáridos se han analizado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), Figura 4.9. Se ha

utilizado un cromatógrafo Watters con detección mediante índice de refracción. Equipado con una columna BIO-RAD Aminex HPX-87H mod. C18 (300 × 7,8 mm) y guardacolumna del mismo tipo, operando a 45 °C. Se ha trabajado en régimen isocrático.

Se procede con la preparación de una disolución de la muestra en agua ultrapura y posterior filtración mediante filtros C18 SEP-PACK CARTRIDGE (Waters Associate – MILLIPORE). Las concentraciones de los compuestos son calculadas finalmente a partir de curvas de calibración, Tabla 4.5, obtenidas mediante soluciones patrón.

Tabla 4.5: Tiempo de retención y rango de concentraciones para los azúcares, bioproductos y ácido acético. Análisis por HPLC en el Dpto. de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena (Brasil).

Compuesto	Tiempo de retención, min	Concentración, kg m ⁻³
D-glucosa	9,452	0 – 5
D-xilosa	9,886	0 – 5
L-arabinosa	10,465	0 – 5
Xilitol	11,091	0 – 5
Glicerol	13,266	0 – 5
Ácido acético	15,054	0 – 5
Etanol	16,294	0 – 5

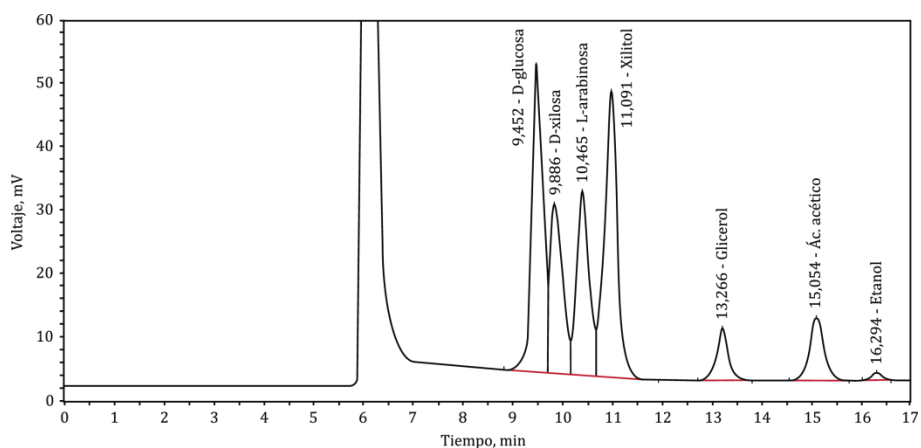


Figura 4.9: Cromatograma HPLC de una muestra de hidrólisis. Determinación de azúcares realizada en el Dpto. de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena (Brasil).

Las condiciones operatorias son las siguientes:

Fase móvil: ácido sulfúrico 0,01 N desgasificado.

Caudal de la fase móvil: $0,6 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$.

Volumen de muestra inyectado: 20 mm^3 .

Tiempo de análisis: 25 min.

Este mismo método ha sido puesto a punto por el Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los materiales de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén en un equipo Shimadzu Prominence LC-20, con detección mediante índice de refracción. Equipado con una columna BIO-RAD Aminex HPX-87H (mod. C18 $300 \times 7,8 \text{ mm}$) y guardacolumna del mismo tipo, operando a $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Se ha trabajado en régimen isocrático, Figura 4.10.

Se procede con la preparación de una disolución de la muestra en agua ultrapura y posterior filtración mediante filtros C18 SEP-PACK CARTRIDGE (WatersAssociate – MILLIPORE). Las concentraciones de los compuestos son calculadas finalmente a partir de curvas de calibración, Tabla 4.6, obtenidas mediante soluciones patrón.

Las condiciones operatorias son las siguientes:

Fase móvil: ácido sulfúrico 0,01 N desgasificado

Caudal de la fase móvil: $0,6 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$

Volumen de muestra inyectado: 20 mm^3

Tiempo de análisis: 25 min

Tabla 4.6: Tiempos de retención y rango de concentraciones para los azúcares, bioproductos y ácido acético. Análisis por HPLC en el Dpto. de Ingeniería Química, Ambiental y de los materiales (U. de Jaén).

Compuesto	Tiempo de retención, min	Concentración, Kg m ³
D-glucosa	8,405	0 - 5
D-xilosa	9,045	0 - 5
L-Arabinosa	9,995	0 - 5
Xilitol	10,598	0 - 5
Glicerol	12,626	0 - 5
Ácido acético	14,564	0 - 5
Etanol	19,948	0 - 5

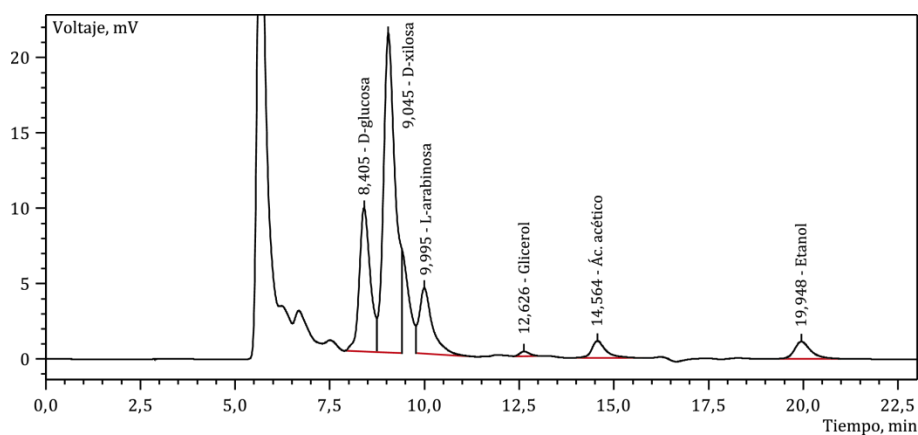
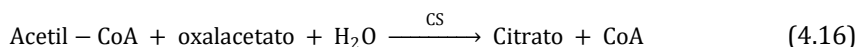
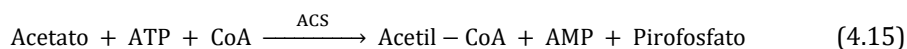


Figura 4.10. Cromatograma HPLC de una muestra de hidrólisis. Determinación de azúcares y otros compuestos realizada en el Dpto. de Ingeniería Química, Ambiental y de los materiales (Universidad de Jaén).

4.3.2.3. Determinación de ácido acético

a) Método enzimático

Se ha llevado a cabo mediante el método propuesto por Bergmeyer y Möllering (1974), basado en las reacciones (4.15), (4.16) y (4.17).



El ácido acético (acetato) pasa a acetyl coenzima-A en presencia de adenosín-5'-trifosfato (ATP) y coenzima A (Co-A) mediante la enzima acetyl coenzima-A sintetasa (ACS) también conocida como acetato tioquinasa, ecuación 4.15. El acetyl coenzima-A reacciona con oxalacetato en presencia de enzima citrato sintetasa (CS) para producir citrato, ecuación (4.16).

El oxalacetato necesario en la reacción (4.17) se forma por oxidación del malato con nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) que en presencia de la enzima malato deshidrogenasa (L-MDH) pasa a NADH.

El NADH se determina por medidas de absorbancia a una longitud de onda de 340 nm.

El procedimiento operatorio es el que sigue:

- a) En una cubeta de 1 cm de paso de luz se introducen 0,5 cm³ de tampón fosfato potásico/trietanolamina (pH = 8,4) que contiene a su vez ácido málico.
- b) Se adicionan 0,1 cm³ de una disolución de CoA, ATP y NAD.
- c) Se añaden 0,95 cm³ de agua ultrapura y 0,05 cm³ de la muestra.
- d) Se tapa la cubeta con "parafilm", se agita y se mide la absorbancia a 340 nm (A₀).
- e) Se añaden 0,05 cm³ de una disolución de las enzimas L-MDH y CS.
- f) Se tapa la cubeta con "parafilm", se agita, y tras 3 minutos, se mide la absorbancia a 340 nm (A₁).

- g) Se empieza la reacción mediante la adición de 0,01 cm³ de una disolución de ACS.
- h) Se tapa la cubeta con “parafilm”, se agita y se deja completar la reacción durante 15 minutos, tras los cuales se mide la absorbancia a 340 nm (A₂).

La concentración de ácido acético, AcH (kg m⁻³), no es directamente proporcional a la del NADH producido, sino que para determinarla hay que utilizar la ecuación (4.18).

$$AcH = \frac{V_{AcH} \cdot M_{AcH}}{\epsilon \cdot d \cdot v_{AcH} \cdot 1000} \Delta A_{AcH} \cdot FD \quad (4.18)$$

Donde:

AcH = concentración de ácido acético, kg m⁻³.

ΔA_{AcH} = diferencia de las expresiones de absorbancia de la muestra problema y la de referencia. Se calcula con la ecuación (4.19).

V_{AcH} = volumen final, cm³.

v_{AcH} = volumen de muestra, cm³.

M_{AcH} = peso molecular del ácido acético, kg kmol⁻¹.

d = paso de luz, cm.

ϵ = coeficiente de extinción del NADH a 340 nm, igual a 6,3 dm³ mmol⁻¹ cm⁻¹.

FD = factor de dilución.

$$\Delta A_{AcH} = \left[(A_2 - A_0)_{muestra} - \frac{(A_1 - A_0)_{muestra}^2}{(A_2 - A_0)_{muestra}} \right] - \left[(A_2 - A_0)_{blanco} - \frac{(A_1 - A_0)_{blanco}^2}{(A_2 - A_0)_{blanco}} \right] \quad (4.19)$$

Sustituyendo los valores de cada uno de los parámetros empleados en este caso, la ecuación (4.18) se reduce a la ecuación (4.20).

$$AcH = 0,3079 \cdot \Delta A_{AcH} \cdot FD \quad (4.20)$$

Donde:

AcH = concentración de ácido acético, kg m⁻³.

ΔA_{AcH} = diferencia de las expresiones de absorbancia de la muestra problema y la de referencia. Calculado en la ecuación (4.19).

FD = factor de dilución.

Este método es válido para concentraciones inferiores a $0,15 \text{ kg m}^{-3}$, a concentraciones superiores es necesario realizar una dilución adecuada.

b) Cromatografía líquida de alta resolución

Durante la estancia de investigación realizada en el Departamento de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil), y tras la puesta a punto del mismo método por parte del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los materiales de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén, se ha determinado el ácido acético según se ha recogido en el apartado 4.3.2.2. b. Del mismo modo se hace referencia a la Tabla 4.5 y a la Figura 4.10.

4.3.2.4. Determinación de furfural e hidroximetilfurfural (HMF)

Durante la estancia de investigación realizada en el Departamento de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil), se han determinado las concentraciones de furfural e HMF por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), Figura 4.11. Estos análisis se han realizado en un equipo GE AKTA Basic equipado con un detector ultravioleta ($\lambda = 276 \text{ nm}$). La columna utilizada ha sido una ODS Hypersil C-18 (4×250 mm) con $5 \mu\text{m}$ de diámetro de partícula y 120 \AA de diámetro de poro. Como fase móvil se utiliza acetonitrilo:agua (1:8) con 1 % de ácido acético.

Se procede con la preparación de una disolución de la muestra en agua ultrapura y posterior filtración mediante membrana de celulosa de $0,45 \mu\text{m}$. Las concentraciones de los compuestos son calculadas finalmente a partir de curvas de calibración, Tabla 4.7, obtenidas mediante soluciones patrón.

Tabla 4.7: Curvas de calibrado y tiempo de retención para furanos.

Compuesto	Tiempo de retención, min	Concentración, Kg m^{-3}	Ecuación
HMF	5,170	0 - 5	$y = 2725,76x - 1,40 \quad r^2 = 0,999$
Furfural	7,512	0 - 5	$y = 4121,10x - 2,18 \quad r^2 = 0,999$

Las condiciones operatorias son las siguientes:

Fase móvil: acetonitrilo:agua (1:8) con 1% de ácido acético desgasificado.

Caudal de la fase móvil: 0,8 cm³ min⁻¹

Volumen de muestra inyectado: 20 mm³

Tiempo de análisis: 9 min

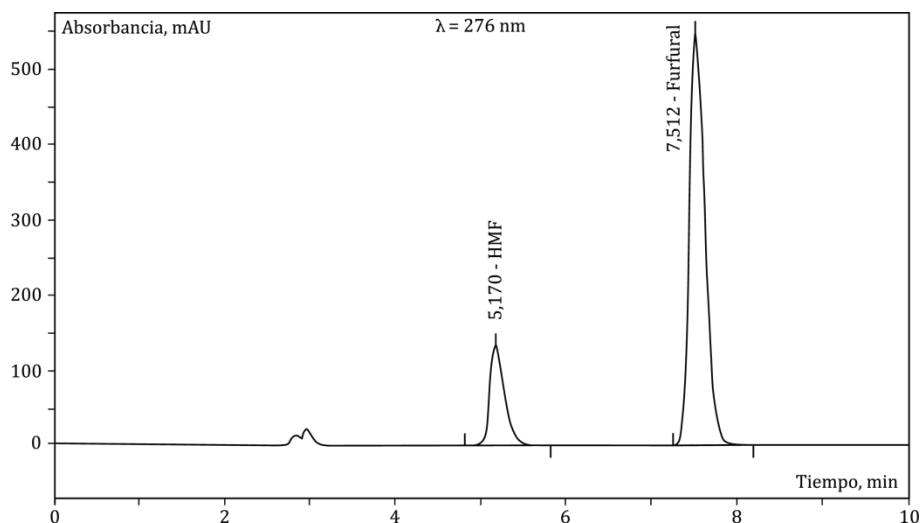


Figura 4.11. Cromatograma HPLC de una muestra de hidrólisis. Determinación de furanos realizada en el Dpto. de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena (Brasil).

4.3.2.5. Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT).

La concentración de compuestos fenólicos totales se ha cuantificado colorimétricamente mediante la modificación del método de Folin-Ciocalteu según Singleton *et al.* (1999), usando ácido ferúlico como patrón de calibración. Resultado la ecuación 4.21.

$$\text{CFT} = 20,63 \cdot A_{760} - 0,4824 \quad (4.21)$$

Se procede centrifugando la muestra a 1800 xg durante 20 minutos para la eliminación de los sólidos. El sobrenadante se filtra a través de una membrana de 0,45 μm y se diluye debidamente con agua ultrapura. La reacción se realiza en un tubo de ensayo adicionando 3 cm³ de muestra y 0,2 cm³ de reactivo de Folin y tras ser homogeneizado (agitador) se mantiene en reposo durante 5 minutos. Tras este período de tiempo se adicionan 0,8 cm³ de solución de (Na)₂CO₃ 150,0 kg m⁻³, seguido de una homogenización (agitador), para posteriormente mantener en reposo y en ausencia de luz durante 30

minutos. Por último se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a 760 nm. Se ha preparado un blanco por el mismo procedimiento.

4.3.3. Caracterización de fermentación

4.3.3.1. Determinación del crecimiento celular

El crecimiento celular se ha evaluado durante los experimentos de fermentación mediante la concentración de biomasa, x , a partir de muestras tomadas de los biorreactores a tiempos prefijados.

Para determinar el crecimiento celular y por la dificultad que supone el control de éste por medidas de peso seco, se ha optado por evaluarlo mediante la absorbancia de la suspensión de células. Se ha procedido previamente a la obtención de una recta de calibrado que relaciona peso seco y absorbancia de la suspensión de células a 620 nm (A_{620}), comprobando como se esperaba, Bravo *et al.* (1995), que existe una relación lineal entre las dos variables cuando la absorbancia está comprendida entre los valores de 0,02 y 0,60, lo cual supone, en algunos casos, la necesidad de realizar una dilución adecuada. En la Tabla 4.8, se muestra la ecuación de calibrado y la bondad del ajuste para los dos microorganismos utilizados: *Candida guilliermondii* FTI 20037 y *Pichia stipitis* Y-7124.

Tabla 4.8: Ecuaciones de calibrado, x , kg m^{-3} frente A_{620} y bondad del ajuste (r^2) para la determinación del crecimiento celular

<i>Candida guilliermondii</i>	$x = 0,235 A_{620} - 0,0001$	$r^2 = 0,998$
<i>Pichia stipitis</i>	$x = 0,200 A_{620} - 0,02$	$r^2 = 0,999$

Las medidas de la absorbancia se han realizado en un espectrofotómetro ultravioleta-visible UNICAM (mod. UV2), a una longitud de onda de 620 nm frente a un blanco compuesto por el medio de cultivo que se suplementa, en cada caso, pero sin azúcares. Cuando la absorbancia se encuentra por encima del rango de linealidad se realiza una dilución con dicho medio de cultivo.

El peso seco se determina una vez ha concluido el experimento. Se ha seguido el procedimiento siguiente:

1. Tomar 50 cm³ de cada vaso y centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos.
2. Lavar el residuo sedimentado dos veces con agua ultrapura para disolver las sales minerales del medio que hayan quedado ocluidas en el residuo centrifugado.
3. Resuspender el residuo con el menor volumen de agua ultrapura posible (5 a 10 cm³), depositándolo en un pesasustancias previamente tarado.
4. Se seca en estufa hasta pesada constante. La temperatura inicial de secado será de 95 °C, para evitar arrastres de material celular, pasando a 105 °C hasta pesada constante.

Las ecuaciones de calibrado para la determinación del crecimiento celular, Tabla 4,7, se han obtenido mediante ajuste por mínimos cuadrados, Figura 4.12, mediante la representación de los datos de Absorbancia a 620 nm y concentración celular (kg m⁻³) reflejados en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9: Relación entre absorbancia de la suspensión celular a 620 nm y la concentración de biomasa en peso seco.

<i>C. guilliermondii</i>		<i>P. stipitis</i>	
A ₆₂₀	x, kg m ⁻³	A ₆₂₀	x, kg m ⁻³
0,102	0,0240	0,092	0,0157
0,116	0,0273	0,127	0,0228
0,156	0,0368	0,136	0,0253
0,188	0,0453	0,155	0,0284
0,215	0,0501	0,167	0,0308
0,233	0,0549	0,189	0,0352
0,264	0,0612	0,212	0,0390
0,269	0,0621	0,246	0,0480
0,278	0,0655	0,268	0,0511
0,299	0,0715	0,307	0,0589
0,323	0,0784	0,322	0,0619
0,367	0,0865	0,354	0,0684
0,428	0,1032	0,387	0,0770
0,472	0,1123	0,421	0,0845
0,533	0,1274	0,578	0,1133

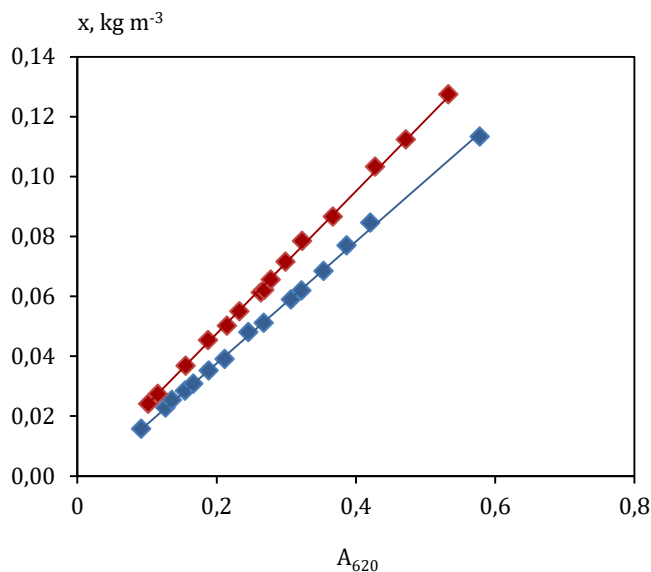


Figura 4.12: Concentración de biomasa frente a absorbancia de la suspensión celular a 620 nm, para los microorganismos *C. guilliermondii* FTI 20037 (■) y *P. stipitis* Y-7124 (■)

4.3.3.2. Determinación del sustrato

La determinación del sustrato se ha realizado como se muestra en los apartados 4.3.2.2.a y 4.3.2.2.b. del presente trabajo.

4.3.3.3. Determinación de bioproductos

La determinación de bioproductos: etanol, xilitol y ácido acético (carácter dual sustrato/bioproducto), se ha realizado siguiendo el procedimiento desarrollado en los apartados: 4.3.2.2.b y 4.3.2.3.b. de este trabajo.

4.4. Microorganismos utilizados

Los microorganismos utilizados en el presente trabajo de investigación han sido: *C. guilliermondii* FTI-20037 y *P. stipitis* Y-7124.

La inoculación y conservación de ambas levaduras se realiza en tubos de ensayo de 0,1 dm³, y 0,05 dm³ de capacidad sobre medio sólido preparado previamente, Tabla 4.10. Posteriormente se mantienen en una estufa de cultivo a 20 °C.

Tabla 4.10: Composición del medio sólido utilizado en el presente trabajo.

Componente	Concentración, kg m ⁻³
Extracto de levadura	3
Extracto de malta	3
Peptona	5
D-xilosa	10
Agar-agar	20

La preparación del medio sólido consiste en la disolución, en agua ultrapura, de todos los componentes a excepción del agar y ajustando el pH a 7. Tras esto, se lleva la mezcla a ebullición disolviendo en ese momento el agar. Para la mejora del proceso se ha sometido la mezcla a agitación. Cuando la disolución se ha completado se vierte la suspensión en los tubos de ensayo a 1/5 de su capacidad. A continuación, se tapan los tubos con algodón graso y gasa y se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 min. Finalmente, se colocan inclinados para lograr una mayor superficie de siembra.

La inoculación se realiza con asa de platino en cabina de flujo laminar Telstarmod. Micro-V, previa limpieza con alcohol etílico al 70 % y uso de lámparas ultravioleta, garantizando así el trabajo en un ambiente aséptico. Con cierta periodicidad se realizan nuevas siembras, si bien, previamente a los experimentos de fermentación se utilizan tubos de ensayo de 0,05 dm³, para el mantenimiento rutinario se utilizan los de 0,1 dm³.

4.4.1. *Candida guilliermondii*

La levadura *Candida guilliermondii* FTI 20037, procede de la colección de cultivos del grupo de Microbiología Aplicada de Bioprocesos DEBIQ/FAENQUIL (Brasil), seleccionada para la producción de xilitol por Barbosa *et al.* (1988).

Es un organismo asexual diploide con reproducción por gemación multilateral. Posee morfología esférica o ligeramente ovoide y tamaño variable ente 3-5 µm. Son células no flageladas y macroscópicamente pueden encontrarse formando colonias.

La especie *Candida guilliermondii* presenta dos variedades: *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii* y *Candida guilliermondii* var. *menbranifaciens*. Ambas variedades poseen sus respectivos teleomorfos denominados: *Pichia guilliermondii* y *Pichia ohmeri*. Algunos sinónimos son los siguientes: *Endomyces guilliermondii*, *Monilia guilliermondii*, *Myzeloblastanon guilliermondii*, *Blastodendrion guilliermondii*, *Castellania guilliermondii*, *Moniliapseudo guilliermondii*, *Castellaniapseudo guilliermondii*, *Torula fermentati*, *Myzeloblastanon arzti*, *Myzeloblastanon krausi*, *Blastodendrion krausi*, *Mycotorula krausi*, *Microanthomyces alpinus* Gruss, *Candida melibiosi*, *Trichosporona pendiculare*. Hansen *et al.* (1998).

Es considerada como una levadura patogénica humana y de otros animales homeotermos. En general se la relaciona con infecciones cutáneas aunque también produce osteomielitis, peritonitis y fungemia del tejido canceroso, Pinoni *et al.* (2007).

4.4.2. *Pichia stipitis*

La levadura *Pichia Stipitis* NRRL Y-7124 proviene de la colección de cultivos del servicio de investigación agrícola del “Nothern Regional Research Laboratory”, situado en Illinois, Florida (E.E.U.U.). Cabe resaltar que Kurtzman y Suzuki (2010), propusieron el cambio de género de esta levadura por *Scheffersomyces* tras realizar los pertinentes estudios filogenéticos. No obstante, en el presente trabajo se ha considerado usar la denominación tradicional.

Es predominantemente un organismo sexual haploide caracterizado por la producción de ascosporas. Se reproduce mediante conjugación heterogénea. La especie *Pichia stipitis* proviene de un estado teleomórfico de la levadura *Candida sheatae*. Un sinónimo de esta especie es: *Yamadazyma stipitises*, Hansen *et al.* (1998).

Actualmente, el uso biotecnológico para la producción de etanol usando la levadura *Pichia stipitis* está muy extendido, debido a su capacidad para fermentar hexosas y pentosas con altos rendimientos, Bellido *et al.* (2013). Tal es el interés que despierta en el mundo científico esta levadura que incluso podemos encontrar algunas patentes referentes a estudios genéticos destinados a la creación de especies mutantes con ventajas biotecnológicas, Nian-Qing y Jeffries (2001).

4.5. Procedimiento operatorio

4.5.1. Muestreo y acondicionamiento de la materia prima

El material de poda de olivo utilizado, Figura 4.13, procede de una finca situada en el término municipal de Arjona (Jaén). Se trata de una finca de olivar de secano cuya superficie se dedica en su totalidad al cultivo del olivo de la variedad 'Picual'. La finca posee una superficie total de 40 ha con un marco de plantación tradicional (10 × 10 m), con lo cual se garantiza una homogénea densidad poblacional. Cuando se realiza la tarea de poda, los restos vegetales se disponen sobre el terreno en hileras para facilitar las tareas de trituración.



Figura 4.13. Restos de poda tras picado *in-situ*. Elaboración propia.

La toma de muestra tuvo lugar en el mes de febrero de 2008. Se seleccionó una cuarta parte de la finca (10 ha), por criterios de accesibilidad, y se llevó a cabo un muestreo estratificado, Figura 4.14, dividiendo la superficie seleccionada en 10 bandas de las que se tomó aleatoriamente una cantidad de muestra de 10 kg, hasta alcanzar una cantidad total de 100 kg. Mediante este tipo de muestreo se ha obtenido una porción de material representativo del todo que se produce en la operación de poda. Por otro lado, siguiendo el mismo procedimiento y previamente a la operación de picado, se llevó a cabo un

deshojado “in-situ” picando solamente la fracción correspondiente a madera. La hoja fue almacenada aparte. Para la operación de trituración se utilizó una picadora Halcón (mod. PH320 1) de alimentación manual.



Figura 4.14. Diseño del muestreo.

Todo el material fue trasladado a las dependencias del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén, donde se llevaron a cabo las siguientes tareas de acondicionamiento:

- a) Homogenización. En una caja de dimensiones adecuadas se depositó el residuo para su homogenización.
- b) Molturación. Se utilizó un molino de cuchillas, RetschGmbt (mod. SM11).
- c) Clasificación. Dada la importancia e influencia que posee el tamaño de partícula para el desarrollo de los tratamientos a los que somete, se procedió, tras la molturación de 50 kg de residuo de poda (madera con diámetro menor de 5 cm y hoja) y de residuo de poda sin hoja (madera con diámetro menor de 5 cm), a una operación de clasificación por tamaño de partícula mediante una tamizadora Retsch (mod. Vibro). Se utilizaron tamices de 500, 120, 50, 40, 30, 20 y 16 mallas ASTM, según la norma ISO 3310-1, cuya luz de malla es 0,025, 0,125, 0,300, 0,425, 0,600, 0,850 y 1,200 mm, respectivamente. La elección del tamaño de partícula

apto para desarrollar este trabajo se basa en investigaciones anteriores realizadas por Moya (1997), y fue la comprendida entre 0,425 y 0,600 mm.

- d) Homogenización. Para asegurar una muestra característica en todos los tratamientos, se realizó una segunda homogenización.
- e) Almacenamiento estanco. El residuo de poda de olivo fue almacenado en recipientes de vidrio con cierre estanco.

Los tratamientos de acondicionamiento se aplicaron separadamente al residuo de poda real y al residuo de poda sin hoja.

4.5.2. Experimentos de hidrólisis ácida a escala de laboratorio

Con el proceso de hidrólisis se va a obtener una disolución rica en azúcares fermentables. Para tal efecto, se inicia cargando en el reactor 1 dm³ de disolución ácida, Figura 4.1. A continuación, se pone en marcha el baño y el agua de refrigeración. El residuo, de humedad conocida, se añade cuando la disolución ácida ha alcanzado la temperatura de trabajo y tras esto se pone en marcha el agitador. Puesto que la temperatura baja unos grados, se han tomado datos tiempo-temperatura desde que se vierte el residuo en el reactor hasta que se vuelve a alcanzar la temperatura de trabajo, estos datos se utilizan para el cálculo de la severidad del tratamiento. Una vez alcanzada dicha temperatura se fija tiempo de ensayo cero minutos, tomando la primera muestra correspondiente a ese mismo instante de tiempo y las restantes periódicamente. Una vez se toman las muestras se enfrían en agua-hielo y posteriormente se centrifugan para la eliminación de material particulado. Por último se congelan hasta su caracterización en: monosacáridos, inhibidores y ácido acético.

Una vez finalizada la hidrólisis se introduce el reactor en un baño de agua-hielo hasta la temperatura de referencia de 60 °C. Se han tomado datos tiempo-temperatura hasta que se alcanza la temperatura de referencia, los cuales se han utilizado para el cálculo de la severidad del tratamiento.

Tras el proceso de hidrólisis se realiza la separación del material sólido y del hidrolizado. La separación se lleva a cabo mediante un embudo Büchner, provisto de un

filtro de tela, conectado a un Kitasato y a una bomba de vacío Vacuubrand GMBH+CO (mod. NZ 2C).

Una vez se ha realizado la separación, se lava el material sólido con agua ultrapura hasta alcanzar pH neutro y posteriormente se seca hasta su temperatura de equilibrio (temperatura ambiente). Subsecuentemente ha sido caracterizado según se ha descrito en el apartado 4.3.1.

4.5.2.1. Variables de estudio y experimentos realizados

Los experimentos de hidrólisis se han configurado para estudiar la solubilización de la hemicelulosa utilizando poda de olivo y poda de olivo sin hoja. De tal forma, se plantea el análisis de las principales variables que afectan al proceso de hidrólisis, son las siguientes:

- a) Tipo de ácido. Se han empleado ácido sulfúrico (H_2SO_4) y ácido clorhídrico (HCl).
- b) Concentración de ácido. Se han realizado hidrólisis desde 0 a 2 M de ácido.
- c) Temperatura. Se han modificado entre 75 y 100 °C.
- d) Tiempo experimental y de muestreo. Se han realizado experimentos de 240 min, tomando muestras a 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 min.

La agitación y la relación S/L se ha mantenido fija en todos los experimentos en 250 rpm y 1:10 respectivamente, de acuerdo con Moya (1997).

Se han planteado dos grandes series experimentales de hidrólisis ácida, una para la poda de olivo y otra para la de poda de olivo sin hoja.

4.5.2.2. Severidad del tratamiento

Como se ha indicado en el apartado 4.5.2, se ha realizado la toma de datos durante los experimentos de hidrólisis para el cálculo de la severidad de los tratamientos. El factor severidad es un índice propuesto por Overend y Chornet (1987), actualmente extendido en la comunidad científica y, que permite comparar un conjunto de datos basándose en los efectos conjuntos de las variables experimentales: temperatura y tiempo de reacción.

De acuerdo con estos autores, se ha calculado la severidad de cada uno de los tratamientos de hidrólisis utilizando la ecuación 4.22. El objetivo de estos es la simplificación de la interpretación de los datos experimentales a través de las dos variables operacionales más influyentes: tiempo de reacción y temperatura. De tal modo, desarrollaron esta herramienta útil para interpretar la solubilización de polisacáridos en procesos hidrotérmicos, Garrote *et al.* (2002).

$$R_0 = \int_0^t e^{\frac{T_s - T_{ref}}{w}} dt \quad (4.22)$$

Donde:

T_s , es la temperatura del sistema de reacción, °C.

T_{ref} , es la temperatura del sistema de reacción, °C.

t , es el tiempo de tratamiento, min.

w , es un parámetro empírico relacionado con la energía de activación.

La temperatura de referencia empleada para el cálculo del factor severidad comúnmente aceptada es de 100 °C, Abatzoglou *et al.* (1992), Lloyd y Wyman (2005). En este sentido Montané *et al.* (1994) y (1998) indican que la influencia de temperatura de referencia en el análisis de datos no es relevante. Se ha optado, en este estudio, por fijar una temperatura de referencia de 60 °C, debido a que los tratamientos hidrolíticos no superan los 100 °C.

Por otro lado, el parámetro “ w ” puede tomar diferentes valores en función del material que se trate. En la Tabla 4.13, se muestran algunos de estos valores para diferentes materiales biomásicos. Tras esta revisión, se ha determinado la utilización de un valor de “ w ” igual a 14,75.

Tabla 4.13: Valores del parámetro “w” en diferentes materiales lignocelulósicos

Material	w	Referencia
Tallo de maíz	10,00	Abatzoglou <i>et al.</i> (1992)
Rastrojo de maíz	14,75	Lloyd y Wyman (2005)
Bagazo de caña de azúcar	14,75	De Carvalho <i>et al.</i> (2017)
Paja de caña de azúcar	14,75	De Carvalho <i>et al.</i> (2017)
Esparto	9,40	Abatzoglou <i>et al.</i> (1992)
Madera de eucalipto	14,75	De Carvalho <i>et al.</i> (2017)
Madera de álamo	8,34	Abatzoglou <i>et al.</i> (1992)
Madera de Abedul	9,60	Abatzoglou <i>et al.</i> (1992)
Hueso de aceituna	14,75	Fernández-Bolaños <i>et al.</i> (2001) Cuevas <i>et al.</i> (2009) García <i>et al.</i> (2010)
Poda de olivo	14,75	Mateo (2011) Moya (2016)

Chum *et al.* (1990), Abatzoglou *et al.* (1992), Lloyd y Wyman (2005), Lee y Jeffries (2011) o Moya *et al.* (2016), con objeto de mejorar el análisis de datos, introducen en sus estudios el denominado factor de severidad combinado o $\text{Log } R_0'$, el cual permite, al igual que el anterior, la comparación de un amplio número de datos a través de la combinación de las variables de operación: tiempo, temperatura y, como aporte, introducen la concentración de ácido. De tal forma la ecuación 4.22 quedaría según se establece en la ecuación 4.23.

$$\text{Log } R_0' = \text{Log } R_0 - \text{pH} \quad (4.23)$$

Por último, el factor de severidad combinado debe ser adaptado para un sistema no isotérmico. Por tanto y de acuerdo con Mateo (2011), se plantea la consideración de la temperatura en función del tiempo de residencia en el reactor, quedando por tanto la ecuación 4.23 como:

$$\text{Log } R_0' = \text{Log} \left(\int_0^t e^{\frac{T_s(t) - T_{\text{ref}}}{w}} dt \right) - \text{pH} \quad (4.24)$$

donde:

$T_s(t)$: representa la función que relaciona la temperatura del sistema de reacción con el tiempo de tratamiento.

En este trabajo se ha optado por utilizar el factor severidad en los tratamientos con agua caliente, debido a que la aplicación del factor severidad combinado arroja resultados negativos al aplicar el efecto del pH. En los experimentos de hidrólisis ácida si se ha empleado el factor de severidad combinado.

En los dos casos se pueden apreciar tres etapas: calentamiento, mantenimiento y enfriamiento. Cada una de estas etapas han sido modelizadas mediante mínimos cuadrados. Para el cálculo de $\text{Log } R_0$ se ha empleado el programa informático denominado: *Wolfram Mathematica* 8.0, con Licencia para la Universidad de Jaén. Finalmente, se ha calculado $\text{Log } R_0'$.

Concretamente, se han tomado datos de temperatura y tiempo durante la etapa de calentamiento y enfriamiento, etapas justamente anterior y posterior, respectivamente, al desarrollo del experimento, es decir, cuando la temperatura se mantiene en equilibrio. De tal forma, los datos han podido ajustarse por mínimos cuadrados obteniendo tres ecuaciones y calculando el factor severidad como la integral que surge bajo las tres rectas. Se ha usado el software denominado *Mathematica* 8.0, con licencia para la Universidad de Jaén.

4.5.3. Experimentos de hidrólisis ácida a escala miniplanta

Tras la discusión de los resultados del apartado anterior, durante la estancia de investigación en los laboratorios del Departamento de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil), se realizó un experimento de hidrólisis ácida en el reactor descrito en el apartado 4.2.1.2. Se empleó para la hidrólisis de poda de olivo exenta de hoja, siendo la relación S/L 1:10, empleando 4 kg de residuo, una concentración de ácido sulfúrico 0,5 M, una temperatura de 100 °C y un tiempo operatorio de 180 min.

Se comienza cargando en el reactor la disolución ácida y la poda, a continuación se conecta la calefacción y la agitación del sistema, se toman datos tiempo-temperatura hasta llegar a la temperatura de trabajo. Una vez finalizado el experimento y a temperatura ambiente se vacía el hidrolizada junto con el sólido resultante y se separa por filtración.

El hidrolizado se concentra según se ha expuesto en el apartado 4.2.2.b, y posteriormente el concentrado se almacena en volúmenes de 1 dm³ a -20 °C hasta su uso.

El sólido resultante se lava hasta llevarlo a pH neutro y se seca hasta humedad ambiente para su caracterización según las normas propuestas en los apartados correspondientes.

4.5.4. Acondicionamiento y detoxificación de hidrolizados

El hidrolizado obtenido tras hidrólisis ácida debe ser acondicionado, y en su caso detoxificado, para su uso como medio de cultivo de los microorganismos utilizados en la investigación. Los tratamientos realizados han consistido en concentración a vacío, ajuste del pH y, según sea requerido, detoxificación con carbón activo.

Los hidrolizados destinados a fermentación con *Candida guilliermondii* se han concentrado y posteriormente se ha ajustado su pH con un pH-metro Crison (mod. GLP 22) hasta el valor experimental. Los hidrolizados destinados a fermentación con *Pichia stipitis* se han concentrado a vacío, seguido de un tratamiento con carbón activo y ajuste final del pH hasta el valor experimental.

La etapa de concentración a vacío se ha explicado en los apartados 4.2.2.a y b, mientras que la etapa de detoxificación se ha realizado bajo el siguiente procedimiento, Mateo *et al.* (2013a):

- 1.- Ajuste del pH a 2.
- 2.- Adición de carbón activo al 8 % p/v.
- 3.- Agitación en orbital a 200 rpm y 35 °C.
- 4.- Centrifugación a 3500 rpm.
- 5.- Filtración si es necesario.

4.5.5. Fermentación en Erlenmeyer

El procedimiento operacional desarrollado en las fermentaciones en Erlenmeyer ha sido el mismo para las dos levaduras empleadas: *C. guilliermondii* y *P. stipitis*.

Las células mantenidas durante 48 horas en tubos de cultivo conteniendo medio sólido, Tabla 4.10, son llevadas hasta tubos de ensayo que contienen 5 cm³ de agua ultrapura estéril. Tras homogeneizar la suspensión, alícuotas de 2 cm³ se transfieren a matraces Erlenmeyer de 250 cm³ conteniendo 50 cm³ de medio de cultivo de Lindegren *et al.* (1958), al 50 %, según modifica Cuevas (2007) y que se recoge en la Tabla 4.14. Para la preparación del medio se han utilizado soluciones concentradas y estériles de cada componente. La incubación se realiza durante 24 horas en un agitador orbital, Figura 4.4, con una temperatura de 30 °C y una velocidad de agitación de 200 rpm. Por último se separa la biomasa del medio de cultivo por centrifugación a 3500 rpm en una centrífuga de alta capacidad Beckman (mod. J2-MI).

Tabla 4.14: Composición del medio de cultivo, Lindegren *et al.* (1958), al 50 %, Cuevas (2007).

Componente	Concentración, kg m ⁻³
Extracto de levadura	2,00
Peptona	1,80
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,50
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,25
KH ₂ PO ₄	1,00
D-xilosa	15,00

4.5.5.1. Fermentación en medio sintético

Durante la estancia de investigación en el Departamento de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil), se realizaron experimentos de fermentación en medio sintético con objeto de valorar el comportamiento de los dos microorganismos.

Una vez caracterizado el hidrolizado, se procede a la formulación del medio sintético conteniendo los azúcares (D-xilosa, D-glucosa y L-arabinosa) en la misma concentración

que el hidrolizado junto con diferentes componentes nutricionales. El medio nutricional propuesto por Cuevas (2007) modificado de Lindegren *et al.* (1958), Tabla 4.14, exento de D-xilosa, fue utilizado para los dos microorganismos. Por otro lado se utilizaron medios específicos para cada levadura como son el propuesto por Roberto *et al.* (1994). Tabla 4.15, Debus *et al.* (1983), Tabla 4.16 y Fonseca (2011), Tabla 4.17.

Tabla 4.15: Medio de cultivo, Roberto *et al.* (1994), utilizado para *C. guilliermondii*.

Componente	Concentración, kg m ⁻³
Extracto de arroz	0,1
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0
CaCl ₂ 2H ₂ O	20% (10,0)

Tabla 4.16: Medio de cultivo, Debus *et al.* (1983), utilizado para *P. stipitis*.

Componente	Concentración, kg m ⁻³
Extracto de levadura	3,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,1
KH ₂ PO ₄	18,8

Tabla 4.17: Medio de cultivo, Fonseca (2011) utilizado para *P. stipitis*.

Componente	Concentración, kg m ⁻³
Extracto de levadura	3,0

Las condiciones de fermentación han sido: 1,5 kg m⁻³ de biomasa inicial, temperatura de 30 °C, el pH del medio se ajusta con NaOH (1 %) previamente esterilizada hasta 5,5, la aeración (ω , volumen de medio/volumen del matraz Erlenmeyer) ha sido de 0,4 y, por último, se ha fijado una velocidad en el orbital de 200 rpm.

4.5.5.2. Fermentación de hidrolizados

Paralelamente a la realización de los experimentos de fermentación en medio sintético, se han realizado experimentos de fermentación utilizando hidrolizados suplementados nutricionalmente con los medios plasmados en las tablas 4.15, 4.16 y 4.17. También se han desarrollado fermentaciones con cada microorganismo en la que se emplearon hidrolizados sin suplementación de nutrientes. Las condiciones de fermentación han sido las señaladas en el apartado 4.4.4.1.

En una segunda etapa se realizó un estudio donde se estudiaron las principales variables que afectan al desarrollo de la fermentación para cada uno de los microorganismos: concentración inicial de inóculo, temperatura, aeración y pH. Para el estudio de la concentración inicial de inóculo se varió esta entre: 0,5, 1,5, 2,5, 3,5 y 5 kg m⁻³; las temperaturas estudiadas han sido: 25, 30 y 35 °C. El estudio de la aeración, a través del parámetro volumen de medio de cultivo/volumen del matraz Erlenmeyer (ω) ha consistido en variar esta relación, finalmente el pH se ha modificado entre: 3, 4, 5, 5,5 y 6. La velocidad de agitación se ha fijado en todos los casos en 200 rpm. Tras la primera etapa de fermentación se observó la necesidad de detoxificar el hidrolizado para hacer posible su asimilación por parte de *P. stipitis*, por consiguiente, esta etapa se realiza según se indica en el apartado 4.5.4.

4.5.6. Fermentación en biorreactor

Los resultados obtenidos en la etapa de fermentación en matraces Erlenmeyer con la levadura *C. guilliermondii* se han trasladado a una escala superior como es la fermentación en biorreactor. El apartado 4.2.3, muestra los tipos de instalaciones utilizadas.

4.5.6.1. Acondicionamiento de los hidrolizados

Previamente a los experimentos de fermentación el hidrolizado se somete a un ajuste del pH con un medidor de pH Crison (mod. GLP 22) hasta el valor experimental, centrifugación para retirar el material precipitado a 3500 rpm. A continuación, se añaden los nutrientes necesarios para la conservación y crecimiento del microorganismo. En este

estudio se ha empleado el medio de cultivo propuesto por Cuevas (2007), adaptado de Lindegren *et al.* (1958), Tabla 4.14, exceptuando la D-xilosa. Por último, se vuelve a ajustar el pH utilizando NaOH al 1 %.

4.5.6.2. Preparación de inóculo

Con objeto de alcanzar la concentración inicial de células deseable, y debido al cambio de escala, se hace necesaria la preparación del inóculo a modo de precultivos. Para conseguir este objetivo, se opera según se ha indicado en el apartado 4.5.5.

4.5.6.3. Proceso de fermentación

El procedimiento operacional se inicia con la esterilización de todo el material necesario para el experimento a 121 °C por 20 min. A continuación se procede con la esterilización del hidrolizado. Durante la estancia de investigación en la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil), se realizó en autoclave a 121 °C por 15 min, mientras que en la Universidad de Jaén si realizó por filtración a través de filtros de acetato de celulosa de porosidad 0,45 µm, acoplados a portafiltros. Esta etapa está mediada por una bomba peristáltica, la cual permite la introducción del medio del cultivo hasta el reactor.

A continuación, de acuerdo con el apartado 4.5.6.2, se prepara la concentración inicial de biomasa de acuerdo con la ecuación mostrada en el apartado 4.3.3.1.

Los experimentos de fermentación se controlan por la toma periódica de muestras con un volumen de 5 cm³ a través de una jeringa estéril. La muestra se caracteriza en pH y concentración de biomasa, tras ser centrifugada, el sobrenadante se conserva a - 20 °C hasta la realización de las determinaciones pertinentes.

Conviene señalar que en los experimentos realizados en el laboratorio de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil), gracias a la configuración del equipo, se pudo determinar el coeficiente global de transferencia de oxígeno ($K_{L,a}$). El $K_{L,a}$ se ha determinado antes de cada fermentación, tras la calibración de la sonda de oxígeno y mediante el método estático. De tal forma, una vez vertido el medio de cultivo en el reactor, y antes de introducir el inóculo, se introduce nitrógeno con objeto de retirar el

oxígeno presente en el interior del reactor. Se procede fijando una sobre-agitación de 400 rpm e introduciendo nitrógeno hasta alcanzar una presión de oxígeno (pO_2) de 0,0 %. Tras esto, se marcan en el equipo las condiciones experimentales: caudal de oxígeno y agitación y se monitoriza la disolución de oxígeno mediante lecturas periódicas de pO_2 . Con estos datos se obtiene una ecuación que relaciona $\ln(1-pO_2/O_{2s})$ vs tiempo. La pendiente resultante de esta representación corresponderá con el valor del $k_L a$ (h^{-1}).

CAPÍTULO



**Resultados
y discusión**

5

Este capítulo contiene los resultados y discusión de los ensayos realizados durante la fase experimental de este trabajo: hidrólisis ácida de la poda de olivar completa y de poda de olivar sin hoja y, fermentación de hidrolizados obtenidos con las levaduras *Candida guilliermondii* y *Pichia stipitis*.

5.1. Caracterización del material de poda de olivar

Todos los ensayos de hidrólisis se han realizado con material vegetal procedente de la misma finca de olivar, situada en Arjona (Jaén). La primera operación que se realiza al residuo de poda es la etapa de clasificación por tamizado, ya que diversos autores han resaltado la importancia del tamaño de partícula en los subsecuentes tratamientos de hidrólisis, siendo mayoritario el uso de material con tamaño comprendido entre 0,425 y 0,600 mm (30–40 mallas ASTM), Moya (1997), García (2007) y Mateo (2011). Por tanto, para comenzar con la caracterización del material de poda, se va a analizar, en primer lugar, la operación básica de tamizado. De esta forma, la Figura 5.1 (a y b), muestra los porcentajes en peso de las diferentes fracciones obtenidas, tanto para el material de poda completo (Fig. 5.1.a), como para el material de poda sin hoja (Fig. 5.1.b).

Una vez finalizada la etapa de acondicionamiento, se han caracterizado los dos materiales objeto de estudio: poda de olivar completa y poda de olivar sin hoja, por dos metodologías diferentes. Así, la Tabla 5.1.a, contiene los resultados de la caracterización en contenido de humedad y material volátil, cenizas, celulosa, hemicelulosa y lignina, tal como propone Van Soest y Wine (1967) y las normas TAPPI correspondientes (ver apartado 4.3.1). Por otro lado, en los laboratorios del Departamento de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil), se ha empleado la metodología propuesta por Browning (1967) y Rocha (2000), (ver apartado 4.3.1), cuyos resultados se incluyen, igualmente, en la Tabla 5.1.b. donde aparecen los contenidos de: humedad y material volátil, celulosa, hemicelulosa, lignina insoluble y soluble, cenizas y grupos acetilo. En ambos casos, los resultados obtenidos son del mismo orden que los que se reportan en bibliografía por diferentes autores, Moya (1997), García (2007), Mateo (2011), Mateo *et al.* (2013b) y Fonseca *et al.* (2013).

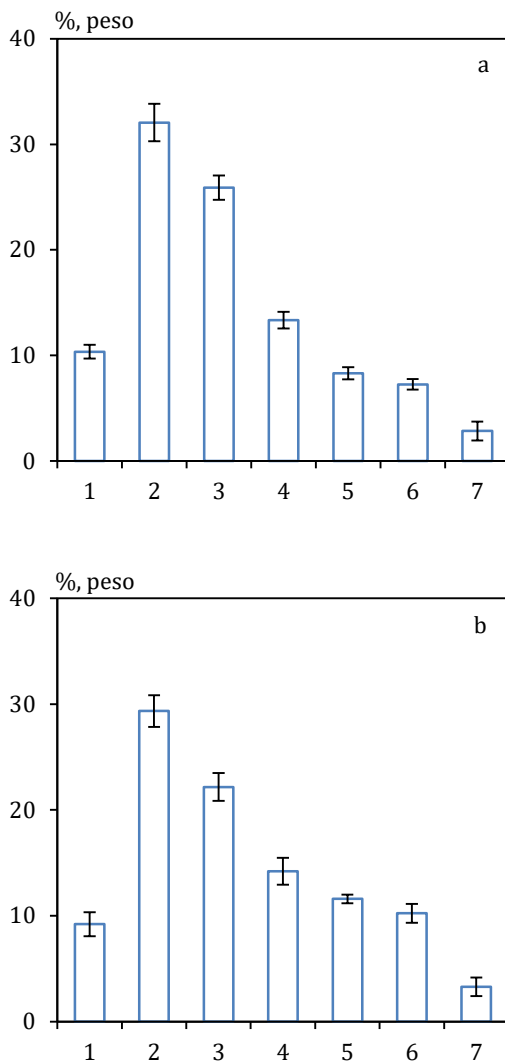


Figura 5.1.a: Fracciones de material de poda completo y b: material de poda sin hoja obtenidas tras la operación de tamizado. Tamaños de partícula: 1: $1,200 < \phi < 2,000$, 2: $0,850 < \phi < 1,200$, 3: $0,600 < \phi < 0,850$, 4: $0,425 < \phi < 0,600$, 5: $0,300 < \phi < 0,425$, 6: $0,125 < \phi < 0,300$, 7: $\phi < 0,125$.

Tabla 5.1.a:
Caracterización de la poda de olivar en el Dpto. de Ingeniería Química,
Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén.

Material	HMV, %	HEM, %	CEL, %	LIG, %	CEN, %
P. de olivo completa	6,91 ± 0,42	15,41 ± 1,03	25,19 ± 1,12	18,55 ± 0,87	3,09 ± 0,04
P. de olivo sin hoja	7,41 ± 0,84	27,87 ± 0,43	41,87 ± 1,44	16,43 ± 0,66	1,39 ± 0,11

Humedad y material volátil (HMV), hemicelulosa (HEM), celulosa (CEL), lignina (LIG) y cenizas (CEN).

Tabla 5.1.b:
Caracterización de la poda de olivar en el Dpto. de Biotecnología
de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de São Paulo (Brasil).

Material	HMV, %	HEM, %	CEL, %	LIGi, %	LIGs, %	CEN, %	GAC, %
P. de olivo completa	7,84 ± 0,32	14,76 ± 1,01	27,41 ± 0,86	23,01 ± 0,73	4,97 ± 0,14	5,04 ± 0,23	1,84 ± 0,11
P. de olivo sin hoja	7,55 ± 0,64	18,64 ± 1,07	33,83 ± 1,07	18,93 ± 0,09	4,20 ± 0,11	3,79 ± 0,07	2,08 ± 0,09

Humedad y material volátil (HMV), hemicelulosa (HEM), celulosa (CEL), lignina insoluble (LIGi), lignina soluble (LIGs), cenizas (CEN) y grupos acetilo (GAC).

Para aclarar las diferencias que existen en los datos que se recogen en la Tabla 5.1. (a y b) se debe acudir a lo que señalan Mateo *et al.* (2013b), y es que la correcta caracterización de la poda de olivar no es fácil debido a la propia estructura del material. Concretamente, si se usan métodos tradicionales se puede cometer el error de asignar a la fracción celulósica moléculas de D-glucosa que realmente provienen de la fracción hemicelulósica o incluso del material de reserva que se encuentra en el parénquima que rodea a la pared celular. En ese último caso, se trataría de moléculas de carácter insoluble como β -1,3 glucanos o, por otro lado, oleuropeína y otros compuestos fenólicos formados, entre otras moléculas, por D-glucosa, Tabla 5.2 (a y b); en consideración a lo indicado se podrían generar monómeros de D-glucosa bajo condiciones de hidrólisis.

Por todo lo expuesto anteriormente, se está en disposición de aclarar que, en caso de utilizar el método propuesto por Browning (1967) y Rocha (2000), parte de la D-glucosa

que forma parte de la hemicelulosa y aquella que forma parte del parénquima celular se considerarían incorrectamente parte de la fracción celulósica, ya que en este método se definen las diferentes fracciones por suma de monosacáridos. Por otro lado, en caso de usar la metodología propuesta por Van Soest y Wine (1967), la D-glucosa que forma parte del parénquima sería solubilizada por las disoluciones detergentes, por lo que no se tendrían en cuenta en los cálculos, mientras que la D-glucosa que forma parte de la hemicelulosa se consideraría de manera correcta, aunque, respecto a la primera metodología comentada, se pierde información respecto a la composición estructural de las cadenas polisacáridicas que forman el material de estudio.

Tabla 5.2.a:
Cuantificación de compuestos fenólicos identificados en hoja de olivo de variedad 'Picual', Talhaoui *et al.* (2014)

Compuesto fenólico	Concentración, g kg ⁻¹
Oleuropeína	19,55
Luteolina glucósido	6,91
Ácido elenólico glucósido	3,29
Secologanósido	4,79
Ligustrósido	3,25
2''-Metoxioleuropeína	3,11
Oleuropeína/Oleurosido	2,10
Oleuropeínadiglucósido	1,56
Dimetiloleuropeína	1,34
Verbascósido	1,13
Tirosol glucósido	0,86
Hidroxitirosol-hexosa	0,83
Otros	3,06

Tabla 5.2.b:
 Cuantificación de compuestos fenólicos identificados en madera de olivo
 de variedad 'Picual', Salido *et al.* (2015).

Compuesto fenólico	Concentración, g kg ⁻¹
Oleuropeína	42,30
(+)-1-hidroxipinoresinol 1-O-β-D-glucopiranosido	38,99
Jaspoliósido	38,32
Ligustrósido	35,00
Jaspolianósido	26,31
(-)-olivil	20,70
(-)-olivil 4-O-β-D-glucopiranosido	19,20
Forma aldehídica de la oleuropeínaaglicona	17,92
2"-hidroxioleuropeína	15,57
Eriodictiol	7,420
Tirosol	0,92
Hidroxitirosol	0,34

5.2. Hidrólisis

Los experimentos de hidrólisis se han aplicado sobre la biomasa generada en la operación de la poda de olivos. Si bien cabe resaltar, como uno de los elementos diferenciadores de esta Tesis, que esta operación se aplicó sobre material de poda de olivar completa y, por otro lado, a la poda de olivar exenta de hoja. Aunque se han realizado ensayos con agua líquida en caliente (autohidrólisis), el cuerpo principal de la investigación se centra en la hidrólisis con disoluciones ácidas, empleando ácido sulfúrico y ácido clorhídrico como agentes hidrolíticos.

Con objeto de clasificar los experimentos y propiciar el mejor manejo de los datos, se ha procedido a una codificación de los ensayos. En este sentido, se ha optado por identificar todos los experimentos con la letra H (hidrolizado), seguida de la letra C (ensayos realizados con poda de olivo completa) o seguida de la letra Sh (ensayos realizados con poda de olivar sin hoja). Tras estas iniciales aparece un guión, al que le sigue una letra que indica el tipo de ácido utilizado: ácido sulfúrico (S) o ácido clorhídrico (Cl). Por último encontramos un número, que está en relación directa con la temperatura de operación y concentración de ácido utilizada, si bien, en este último caso, habrá que recurrir a la tabla de datos primarios contenida en los apéndices para conocer el valor de estas dos variables.

Los resultados de los experimentos de hidrólisis se han expresado a través de los rendimientos en azúcares totales, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa y D-fructosa; estos rendimientos se han determinado a partir de las concentraciones de estos monómeros obtenidos en cada ensayo. Las ecuaciones empleadas son las siguientes:

$$Y_{\text{Tot}} = \frac{\text{kg azúcares totales}}{\text{kg residuo seco inicial}} 100 \quad [5.1]$$

$$Y_{\text{D-glu}} = \frac{\text{kg D-glucosa}}{\text{kg residuo seco inicial}} 100 \quad [5.2]$$

$$Y_{\text{D-xil}} = \frac{\text{kg D-xilosa}}{\text{kg residuo seco inicial}} 100 \quad [5.3]$$

$$Y_{\text{L-ara}} = \frac{\text{kg L-arabinosa}}{\text{kg residuo seco inicial}} 100 \quad [5.4]$$

$$Y_{D-gal} = \frac{\text{kg D-galactosa}}{\text{kg residuo seco inicial}} 100 \quad [5.5]$$

$$Y_{D-fru} = \frac{\text{kg D-fructosa}}{\text{kg residuo seco inicial}} 100 \quad [5.6]$$

En cuanto al residuo sólido resultante tras la hidrólisis, una vez ha sido caracterizado, se han determinado las conversiones fraccionales de hemicelulosa, X_H , y de celulosa, X_C , dadas por las expresiones que se muestran a continuación:

$$X_H = \frac{\text{kg de hemicelulosa transformados}}{\text{kg iniciales de hemicelulosa}} 100 \quad [5.7]$$

$$X_C = \frac{\text{kg de celulosa transformados}}{\text{kg iniciales de celulosa}} 100 \quad [5.8]$$

5.2.1. Naturaleza del sustrato

En una primera etapa de la investigación se han realizado una serie de tratamientos térmicos con el objetivo de analizar el comportamiento del material de poda de olivo completo respecto a temperaturas (75 a 95 °C) y tiempos crecientes (0 a 240 min), Figura 5.2.

En todos los experimentos realizados, se observa, Figura 5.2, un aumento del rendimiento en azúcares con el tiempo y la temperatura de trabajo. Por otro lado, cabe resaltar que en estos experimentos no se consigue la solubilización de la L-arabinosa, D-galactosa, D-xilosa o D-manosa (si se compara con los subsecuentes experimentos de hidrólisis ácida), mientras que se aprecia una concentración constante de D-fructosa a lo largo del experimento, efecto observado por García (2007) y creciente de D-glucosa. Sin embargo, como se verá más adelante, en todos los casos, los rendimientos obtenidos con agua caliente son bajos, consiguiéndose una conversión fraccional y prácticamente constante en celulosa (próximo al 5 %) y con un ligero aumento en el caso de hemicelulosa, variando entre 10 y 12 %, Figura 5.3.

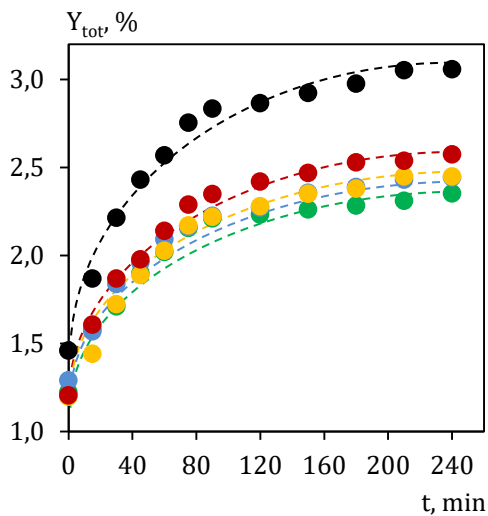


Figura 5.2: Variación del rendimiento en azúcares totales en los tratamientos térmicos realizados a 75 (●), 80 (●), 85 (●), 90 (●) y 95 °C (●) sobre material de poda completo. Para ampliar información véanse las Tablas AP2.3 a AP2.7 y Figuras AP2.1 a AP2.5. (Apéndice 2).

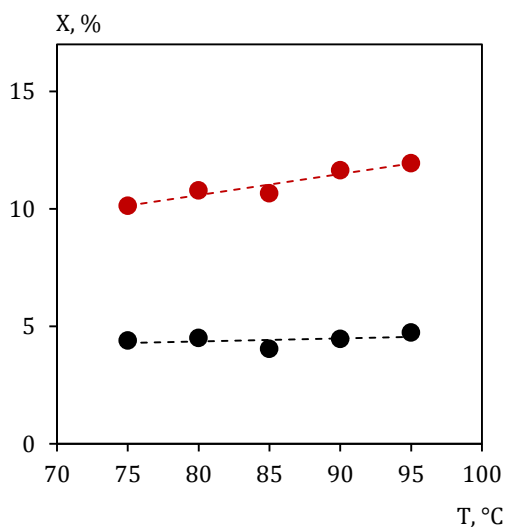


Figura 5.3: Conversiones de celulosa (X_C , ●) y hemicelulosa (X_H , ●) respecto al material de poda completo en los tratamientos térmicos. Para ampliar información véase la Tabla AP2.2 (Apéndice 2).

Para poder comparar las variables del tratamiento en cuanto a su efecto sobre el sustrato, se ha empleado el factor severidad (ver apartado 4.5.2.2). Se trata de un índice propuesto por Overend y Chornet (1987), actualmente muy extendido y utilizado en la comunidad científica, Chum *et al.* (1990^a, b), Van Walsum *et al.* (2004), Galbe y Zacchi (2007), Rogalinski *et al.* (2008), Liang *et al.* (2017). En la Figura 5.4, se representa la relación entre el rendimiento en azúcares totales y el rendimiento en D-glucosa frente a Log R₀, para los tratamientos térmicos (75 a 95 °C) realizados sobre el material de poda de olivo completo. Al ser D-glucosa el monómero más representativo, en cuanto a solubilización se refiere, se ha optado por representar este, junto a los azúcares totales y como puede apreciarse, se produce un aumento de ambos rendimientos con el incremento de la severidad del tratamiento (Log R₀) o lo que es lo mismo, con un aumento de la temperatura. También cabe indicar que, tanto los rendimientos como las severidades, son menores que en experimentos en los que se emplea disoluciones ácidas, como se verá más adelante.

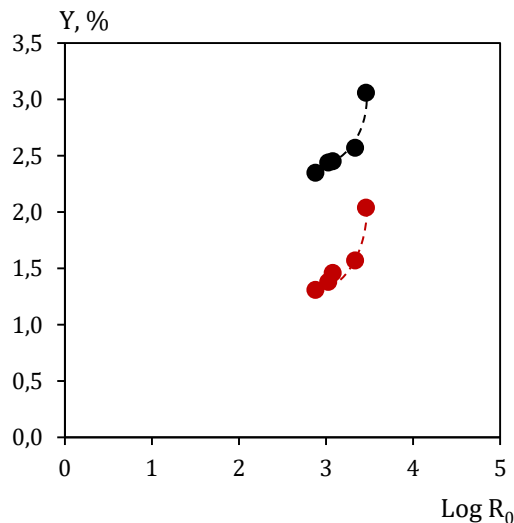


Figura 5.4: Variación del rendimiento en azúcares totales (Y_{tot} , ●) y D-glucosa (Y_{D-glu} , ●) en relación a la severidad de los tratamientos térmicos realizados sobre poda de olivo completa.

5.2.2. Naturaleza y concentración del agente hidrolítico. Hidrólisis con ácido sulfúrico

En este apartado se va a analizar tanto la composición de los residuos resultantes en los ensayos de hidrólisis como los rendimientos en azúcares de los hidrolizados obtenidos.

Para poder analizar conjuntamente las variables de operación, temperatura, tiempo y concentración de ácido, se ha calculado, en todos los ensayos, el parámetro denominado factor de severidad combinado, Chum *et al.* (1990^a, b), Abatzoglou *et al.* (1992). Este parámetro se ha desarrollado en el apartado 4.5.2.2.

5.2.2.1. Hidrólisis con ácido sulfúrico sobre material de poda completo

Se han realizado un total de 20 experimentos con vistas a analizar el comportamiento del material de poda completo bajo concentraciones fijadas de ácido sulfúrico, en el rango 0,1 a 1,0 N, y temperatura de trabajo, entre 75 y 95 °C. Como se comentó, se ha utilizado en todos los experimentos una relación de biomasa/disolución de ácido de 1/10 p/v.

a) Composición del residuo. La Tabla AP2.31 (Apéndice 2), recoge la composición química de los diferentes residuos resultantes de la operación de hidrólisis para los 20 experimentos realizados con ácido sulfúrico sobre material de poda completo. Se observa una disminución del contenido en cenizas proporcional al aumento de la concentración de ácido, efecto también observado por Mateo (2011), aunque la temperatura de trabajo no parece ser influyente sobre este parámetro. De acuerdo con esta autora, que comprueba mediante técnicas gravimétricas la no variación del contenido en lignina entre el material de partida y el residuo resultante, se acepta la hipótesis de no degradación de esta fracción composicional. Siguiendo esta premisa se han calculado las conversiones de celulosa y hemicelulosa en todo este trabajo. Figura 5.5.

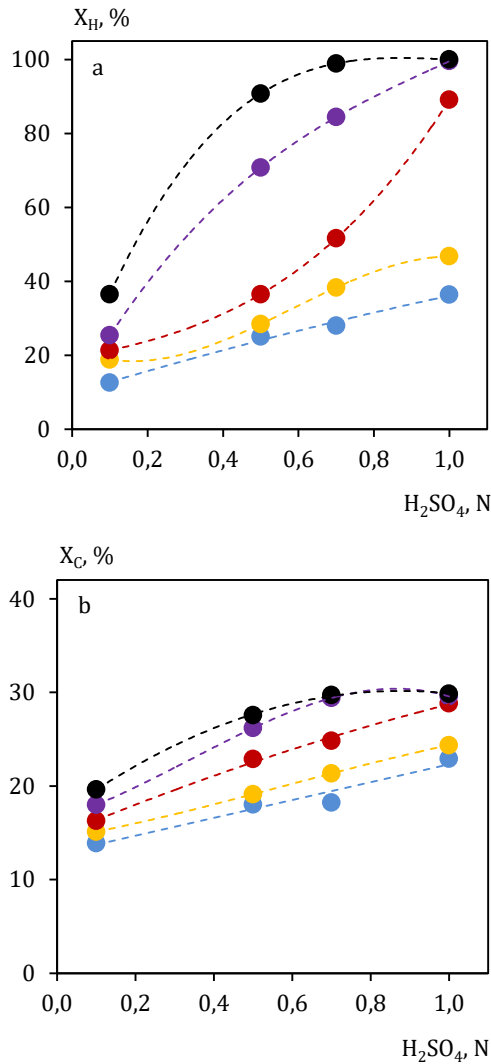


Figura 5.5.a: Conversiones de hemicelulosa (X_H) y b: celulosa (X_C) respecto al material de poda completo inicial en los experimentos de hidrólisis con ácido sulfúrico realizados a 75 (●), 80 (●), 85 (●), 90 (●) y 95 °C (●).

En relación con la conversión hemicelulósica, se puede observar como es el polímero que en mayor medida se consigue solubilizar (Fig. 5.5.a), efecto observado también por de Carvalho *et al.* (2017), en estudios realizados con biomasa de eucalipto, bagazo y paja de caña de azúcar. También se muestra como la hemicelulosa sufre una conversión creciente en relación al aumento de la concentración de ácido y de la temperatura. Ahora bien, existen tres experimentos en los que la conversión es total, son los realizados a 95 °C y una concentración de ácido sulfúrico de 0,7 N, y a 90 y 95 °C con una concentración

de ácido sulfúrico de 1,0 N. Los experimentos en los que se consigue una conversión superior al 80 %, son los realizados a 95 °C y 0,5 N de ácido sulfúrico, a 90 °C con 0,7 N, y 85 °C con 1,0 N de ácido sulfúrico. Finalmente, cabe decir que es inviable utilizar temperaturas por debajo de los 85 °C, con el conocimiento de que si se fijara esta temperatura se tendría que ir a la máxima concentración de ácido ensayada. Por otro lado, si lo que se quiere es operar a bajas concentraciones de ácido, se podría fijar una concentración de 0,5 N, aunque en este caso se deberá trabajar a la máxima temperatura ensayada, es decir, 95 °C.

En cuanto a la conversión de la celulosa (Fig.5.5.b) se aprecia una conversión creciente tanto con la concentración de ácido como con la temperatura, aunque es una conversión baja, en comparación con la hemicelulosa. Este efecto también ha sido reportado por Aguilar *et al.* (2002), en estudios realizados sobre bagazo de caña de azúcar usando una concentración de ácido sulfúrico al 2 % y una temperatura de 122 °C durante 24 min. En este estudio, en ningún ensayo se supera una conversión del 30 %, 160 siendo los 160 160 experimentos que se acercan a este valor los realizados a 90 °C y 1,0 N de ácido sulfúrico y, a 95 °C con concentraciones de ácido sulfúrico de 0,7 y 1,0 N.

b) Rendimiento en azúcares. Inicialmente se han calculado los rendimientos puntuales de los principales monómeros (D-glucosa y D-xilosa) y de azúcares totales a tiempo final de ensayo (240 min), Tabla 5.3; es un resumen de las Tablas AP2.32 a AP2.51 (Apéndice 2). Cabe indicar que, en los experimentos realizados, los rendimientos en azúcares totales, D-glucosa y D-xilosa aumentan con el tiempo de hidrólisis, llegando solo en algunos casos, a una estabilización, Tablas AP2.32 a AP2.51 y Figuras AP2.26 a AP2.45 (Apéndice 2). A partir de la Tabla 5.3, se ha elaborado la Figura 5.6, en esta se aprecia un aumento de los rendimientos en azúcares totales, D-glucosa y D-xilosa con la temperatura y concentración de ácido fijada. Sin embargo, si nos referimos a monómeros concretos, son mayores los rendimientos que se alcanzan para D-glucosa frente a D-xilosa; esto ocurre, sobre todo a bajas temperaturas de operación Figura 5.3. En este caso, de acuerdo con Lis *et al.* (2000), se puede comprobar como a 75, incluso 80 °C, los rendimientos en D-xilosa son muy bajos, inclusive nulos, efecto que apenas desaparece cuando se aumenta la concentración de ácido, de manera que solo se consiguen progresivos aumentos en los rendimientos cuando se aumenta la temperatura de operación. Finalmente, cabe indicar que son en los experimentos HC-S16, HC-S19 y HC-S20 donde se alcanzan valores

máximos de rendimientos, entre 31 a 34 % en azúcares totales, 14 a 15 % en D-glucosa y 8 a 9 % en D-xilosa. Como dato comparativo cabe indicar los rendimientos obtenidos por Shatalov y Pereira (2012), que trabajando con *Arundo donax* L. alcanzaron rendimientos en D-glucosa y D-xilosa de 2,84 y 20,35 %, respectivamente; estos autores emplearon 130 °C, 60 min y H₂SO₄ 0,3 N. Por otra parte, Fonseca *et al.* (2013), alcanzaron rendimientos próximos en D-glucosa y D-xilosa de 10,6 y 9,3 %, respectivamente, empleando poda de olivo completa bajo condiciones de hidrólisis de 120 °C, 90 min y H₂SO₄ 0,4 N; estos resultados son similares a los obtenidos por Mateo *et al.* (2013b), empleando un residuo de la misma naturaleza.

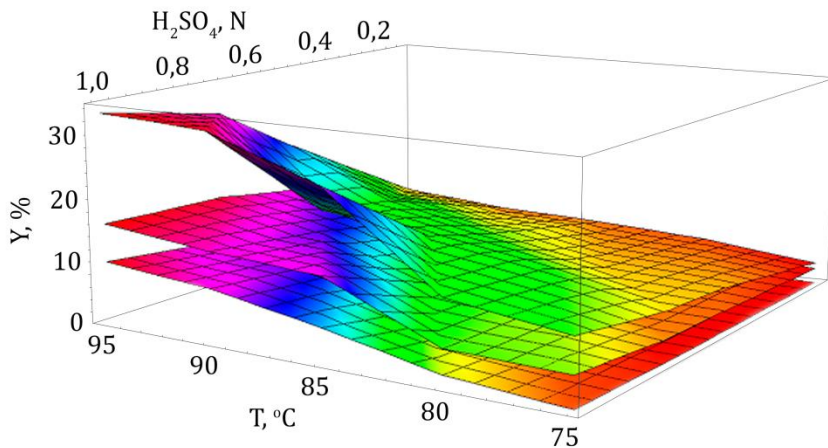


Figura 5.6: Variación de los rendimientos en azúcares totales (plano superior), D-glucosa (plano intermedio) y D-xilosa (plano inferior) en los 20 experimentos realizados con H₂SO₄ sobre material de poda sin hoja.

Tabla 5.3: Rendimientos en azúcares totales, D-glucosa, D-xilosa en experimentos de hidrólisis sobre material de poda completo empleando H₂SO₄.Tiempo: 240 min.

Expto	H ₂ SO ₄ , N	T, °C	Y _{tot} , %	Y _{D-glu} , %	Y _{D-xil} , %
HC-S1	0,1	75	3,39	2,41	n.d.
HC-S2	0,5	75	7,00	3,35	0,07
HC-S3	0,7	75	7,82	3,59	0,13
HC-S4	1,0	75	10,45	5,31	0,50
HC-S5	0,1	80	4,74	3,20	n.d.
HC-S6	0,5	80	7,53	3,40	n.d.
HC-S7	0,7	80	10,70	5,18	0,64
HC-S8	1,0	80	12,83	5,65	1,88
HC-S9	0,1	85	5,69	3,12	n.d.
HC-S10	0,5	85	10,76	5,17	0,72
HC-S11	0,7	85	13,72	6,22	2,06
HC-S12	1,0	85	25,46	13,22	5,47
HC-S13	0,1	90	6,02	3,35	0,02
HC-S14	0,5	90	19,96	9,56	5,15
HC-S15	0,7	90	25,01	12,03	6,64
HC-S16	1,0	90	30,75	14,18	8,38
HC-S17	0,1	95	10,68	6,49	0,03
HC-S18	0,5	95	26,41	13,34	5,79
HC-S19	0,7	95	31,07	15,32	7,76
HC-S20	1,0	95	33,58	15,88	9,87

n.d.: no detectado

c) Efecto combinado de la concentración de ácido y la temperatura de trabajo.

Para analizar el efecto conjunto de la concentración de ácido sulfúrico y la temperatura de trabajo sobre los rendimientos en azúcares totales, D-glucosa y D-xilosa, se han calculado los valores del parámetro Log R₀' de cada experimento, de acuerdo con Chum *et al.* (1990a, b) y Abatzoglou *et al.* (1992), lo que ha permitido representar, Figura 5.7, todos los experimentos de la serie que se tratan conjuntamente. A grandes rasgos, se puede observar un aumento creciente del rendimiento en monómeros y azúcares totales. Entrando en detalle, puede apreciarse como D-glucosa comienza a ser solubilizada a bajos valores de severidad, Log R₀' = 1, mientras que D-xilosa lo hace a partir de valores de 2,16. Es a partir de este valor cuando el rendimiento en azúcares totales aumenta de manera más rápida, coincidiendo con los experimentos cuya severidad se encuentra en el

rango de 2,16 a 3,03. También, se observa que los experimentos con rendimientos más elevados son precisamente en los que la severidad/rendimiento en azúcares totales es más alta: 2,88/33,58 %, 2,92/30,75 %, 3,03/31,07 %. Finalmente, cabe señalar que, en consonancia con Shatalov y Pereira (2012), se debe llegar a un compromiso en cuanto a la severidad del tratamiento y el rendimiento obtenido, ya que, de cara a la recuperación de los monosacáridos para una ulterior utilización como sustrato de fermentación, altas severidades otorgan altos rendimientos, pero también provocan mayores concentraciones en compuestos de degradación, que a su vez son indeseables por ser inhibidores del crecimiento microbiano, Nguyen *et al.* (1999) y Mussatto y Roberto (2005).

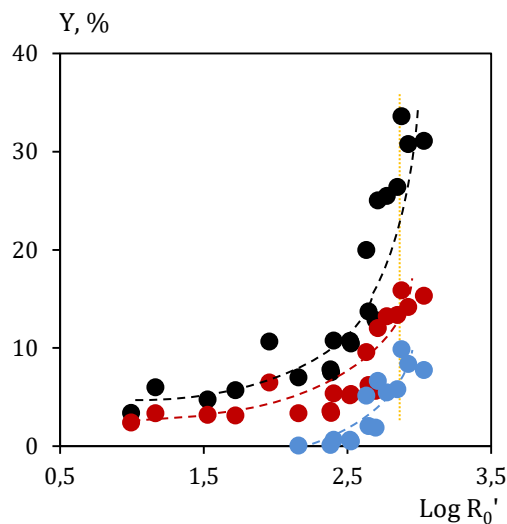


Figura 5.7: Representación del factor de severidad combinado sobre el rendimiento en azúcares totales (Y_{Tot} , ●), D-glucosa (Y_{D-glu} , ●) y D-xilosa (Y_{D-xil} , ●), en los experimentos de hidrólisis realizados sobre material de poda de olivo completo usando ácido sulfúrico.

5.2.2.2. Hidrólisis con ácido sulfúrico sobre material de poda sin hoja

Tras la realización de los experimentos con material completo, en una segunda etapa del trabajo de investigación, se ha utilizado material de poda de olivo sin hoja. El comportamiento de este material ofrece algunas diferencias y semejanzas respecto al material de poda completo, las cuales van a ser analizadas.

En este caso, se llevaron a cabo 16 experimentos con vista a analizar el comportamiento del material bajo concentraciones fijadas de ácido sulfúrico, en el rango 0,5 a 2,0 N, y temperatura de trabajo, entre 85 y 100 °C. La relación biomasa/disolución de ácido se ha mantenido, al igual que para el material de poda completo, en 1/10 p/v.

a) Composición del residuo. En consonancia con los experimentos realizados al material completo, la hemicelulosa es el polímero que en mayor medida se consigue solubilizar, y es que en la mayoría de los ensayos se han conseguido conversiones del 100 %. En la Tabla AP2.71 (Apéndice 2), se ha recogido la composición química de todos los residuos sólidos resultantes de la operación de hidrólisis para los 16 experimentos realizados con ácido sulfúrico sobre material de poda sin hoja.

En general, se observa un contenido en cenizas muy bajo, ya que en ningún experimento se supera el 0,2 %. Además, los datos son bastante homogéneos. En cuanto a la conversión de hemicelulosa, según se aprecia en la Figura 5.8.a, se produce un aumento a medida que lo hace también la temperatura de trabajo, cuando se fijan concentraciones de ácido sulfúrico de 0,5, 1,0 y 1,5 N. En los casos de los experimentos realizados con una concentración fija de ácido de 2,0 N (para todas las temperaturas de trabajo estudiadas) o una temperatura fija de 100 °C (para todas las concentraciones de ácido ensayadas), se aprecia una conversión total de este polímero. Cabe resaltar también que, en los ensayos realizados con una concentración fija de ácido de 1,5 N (para todas las temperaturas de trabajo fijadas) o una temperatura fija de 95 °C (para todas las concentraciones de ácido estudiadas), se consiguen conversiones fraccionales superiores al 95 %.

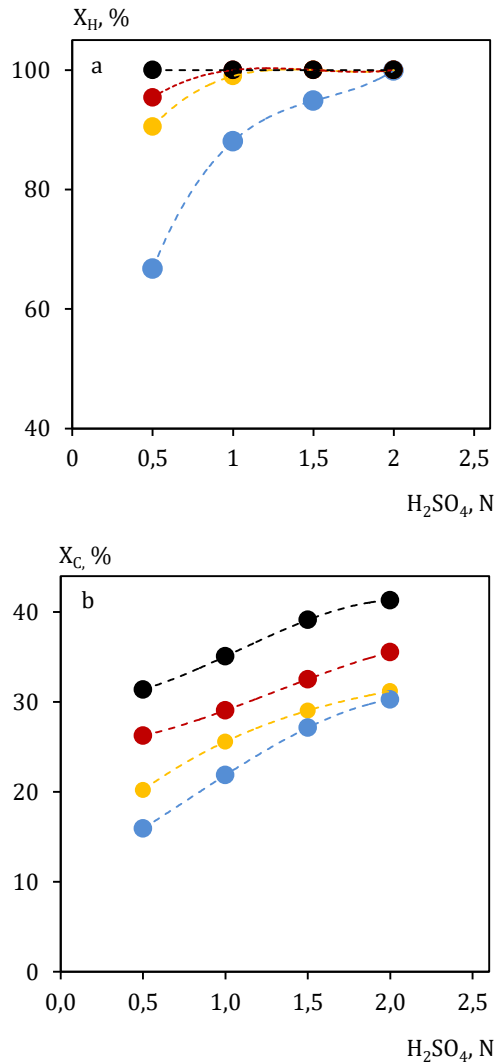


Figura 5.8.a: Conversiones de hemicelulosa (X_H) y b) conversiones de celulosa (X_C) respecto al material de poda sin hoja en los experimentos de hidrólisis con ácido sulfúrico a 85 (●), 90 (●), 95 (●) y 100 °C (●).

Finalmente, en cuanto a la despolimerización de la hemicelulosa, se aprecia una tendencia similar en comparación con el material de poda completo, Figura 5.5.a, por lo que se está en disposición de decir que siguen el efecto observado por Carvalho *et al.* (2017), el cual se ha explicado más arriba.

Por último, la celulosa, Figura 5.8.b., muestra una tendencia que permite afirmar que este polímero consigue solubilizarse a medida que aumenta la temperatura y la concentración de ácido, aunque solo y en caso más extremo se llega a un 40 %.

b) Rendimiento en azúcares. Una de las principales diferencias entre el material de poda completo y el material sin hoja es la composición química, este hecho ya se justificó en el apartado correspondiente a la caracterización del material de partida, pero, también puede ser justificado o reafirmado en estos dos últimos apartados, y es que si se observan las Tablas 5.3. y 5.4., lo primero que resalta es una diferente composición, ya que, mientras en las hidrólisis realizadas sobre material de poda completo el monosacárido predominante es D-glucosa; en este último caso, al trabajar con material de poda sin hoja, es D-xilosa el monosacárido principal. Este efecto es debido a la estructura química del material de partida, ya que la composición en monómeros es dependiente directamente del material lignocelulósico inicial, como así concluyen Lee *et al.* (1999), Mosier *et al.* (2005), Taherzadeh y Karimi (2007a), Akpinar *et al.* (2009) o Lenihan *et al.* (2011). Por otro lado, si se aprecian los rendimientos máximos en azúcares totales (Experimento a 95 °C y 1 N), se detecta como apenas hay diferencia entre los materiales de partida. Estos últimos rendimientos están en consonancia con los publicados por García (2003) y Mateo (2011), en trabajos en los que se utilizó material de poda de olivo.

Tabla 5.4: Rendimientos en azúcares totales, D-glucosa, y D-xilosa, en los experimentos de hidrólisis sobre material de poda sin hoja empleando H₂SO₄. Tiempo: 240 min.

Expto	H ₂ SO ₄ , N	T, °C	Y _{Tot} , %	Y _{D-glu} , %	Y _{D-xil} , %
HSh-S1	0,5	85	13,88	4,31	4,35
HSh-S2	1,0	85	26,89	8,10	13,05
HSh-S3	1,5	85	29,23	8,36	14,32
HSh-S4	2,0	85	33,90	11,25	16,01
HSh-S5	0,5	90	20,79	6,60	9,54
HSh-S6	1,0	90	28,44	8,97	14,04
HSh-S7	1,5	90	32,52	9,96	16,01
HSh-S8	2,0	90	33,98	11,32	16,06
HSh-S9	0,5	95	25,68	7,82	12,23
HSh-S10	1,0	95	33,36	11,18	16,05
HSh-S11	1,5	95	34,18	11,45	16,10
HSh-S12	2,0	95	32,98	11,26	16,09
HSh-S13	0,5	100	34,38	11,40	16,04
HSh-S14	1,0	100	33,25	11,13	16,10
HSh-S15	1,5	100	31,87	11,06	16,09
HSh-S16	2,0	100	31,58	11,01	16,01

Se ha elaborado la Tabla 5.4, a modo resumen de las Tablas AP2.72 a AP2.87 (Apéndice 2). Como puede observarse, reflejan los rendimientos puntuales de los principales monómeros (D-glucosa y D-xilosa) y de azúcares totales a tiempo final de cada ensayo (240 min). Al igual que sucede en las hidrólisis donde se utiliza material de poda completo, los rendimientos en azúcares totales, D-glucosa y D-xilosa aumentan con el tiempo de proceso, llegando generalmente a una estabilización a tiempos de hidrólisis medios y finales, apreciando en los casos más extremos cierta degradación de algunos monómeros. También, se puede apreciar como en gran parte de los experimentos realizados se consiguen valores máximos en rendimientos en azúcares totales, D-xilosa y D-glucosa, tanto es así que a 85 °C, y a concentración de ácido 2 N, ya se consiguen maximizar estos rendimientos. A 90 °C se alcanza el máximo a partir de 1,5 N, aunque a 1,0 N se obtienen valores cercanos al máximo. A 95 °C el máximo se consigue a partir de una concentración de ácido de 0,5 N y a 100 °C en todos los casos. En estudios realizados sobre tallos de maíz, Hong *et al.* (2016), utilizan ácido sulfúrico (0 - 4,5 % p/v), una temperatura de 120 °C y tiempos de hidrólisis de 0 a 90 min, y demuestran como con

aumentos en la concentración de ácido sulfúrico, de entre 0 a 2,5 % p/v se consigue incrementar la concentración de D-glucosa en el hidrolizado, mientras que en el rango 2,5 a 4,5 % p/v, no se aprecian cambios y la concentración de este monómero se mantiene constante en 2,4 kg m⁻³; este efecto es similar al que ocurre en el caso de este estudio en lo que se refiere a D-glucosa. Por otro lado, en cuanto a D-xilosa, Hong *et al.* (2016) señalan un aumento progresivo hasta una concentración de ácido de 2,5 % p/v, donde la concentración de D-xilosa es de 6,1 kg m⁻³; sin embargo, a partir de este punto, el monosacárido sufre una progresiva degradación hasta la máxima concentración de ácido empleada (disminuyendo hasta 5,12 kg m⁻³ de D-xilosa al emplear 4,5 % p/v de ácido sulfúrico). En relación a D-xilosa, este último efecto no se observa en la Tabla 5.4. Como se exponía más arriba, se observa una concentración creciente de D-xilosa con la concentración de ácido y la temperatura, pero es un efecto que tiende a estabilizarse. Finalmente, cabe señalar que al utilizar material de poda sin hoja, bajo las condiciones expresadas, los rendimientos máximos en azúcares totales presentan un rango de 30 a 34 %, mientras D-xilosa presenta máximos de un 16 % y D-glucosa de 11 %.

c) Efecto combinado de la concentración de ácido y la temperatura de trabajo. Tal como se ha planteado en apartados anteriores, el efecto combinado de la concentración de ácido y la temperatura puede ser estudiado utilizando el parámetro Log R₀' (Chum *et al.* (1990a, b) y Abatzoglou *et al.* (1992)). A tal fin, se ha elaborado la Figura 4.9, cuya importancia se encuentra en que recoge todos los experimentos de la serie que se trata, de manera que se puede analizar de manera global la severidad de los tratamientos y su efecto sobre los rendimientos obtenidos (azúcares totales, D-glucosa y D-xilosa). A grandes rasgos, se observa un aumento creciente del rendimiento en monómeros y azúcares totales hasta valores de Log R₀' próximos a 3. A partir de este valor, el comportamiento mostrado difiere entre las tres series representadas y esto ocurre debido a que aumentos de la severidad del tratamiento inducen la degradación de monosacáridos presentes en el hidrolizado, provocando que el rendimiento en azúcares totales vaya disminuyendo hasta los valores de severidad máxima ensayada (Log R₀' = 3,5). En el caso los rendimientos en D-xilosa se mantienen estables, mientras que en D-glucosa comienza a mostrar signos de degradación a partir de severidades superiores a 3,2. Cabe resaltar las conclusiones a las que se llegaba en el apartado 5.2.2.1.c, en relación a los estudios de Shatalov y Pereira (2012), máxime cuando se detecta claramente la degradación de azúcares y, por ende, la aparición de otros compuestos indeseables por

ser inhibidores del crecimiento microbiano, Nguyen *et al.* (1999) y Mussatto y Roberto (2005), efecto que será discutido en los próximos apartados.

Para finalizar, cabría citar los valores en los que se maximizan los rendimientos y que corresponderían a los ensayos realizados con una concentración de ácido sulfúrico de 0,5 N y una temperatura de 100 °C ($\text{Log } R_0' = 3,1$), 1,5 N y 95 °C ($\text{Log } R_0' = 3,2$) y 2,0 N y 90 °C ($\text{Log } R_0' = 3,1$), aunque existen ensayos con valores próximos a los máximos referidos.

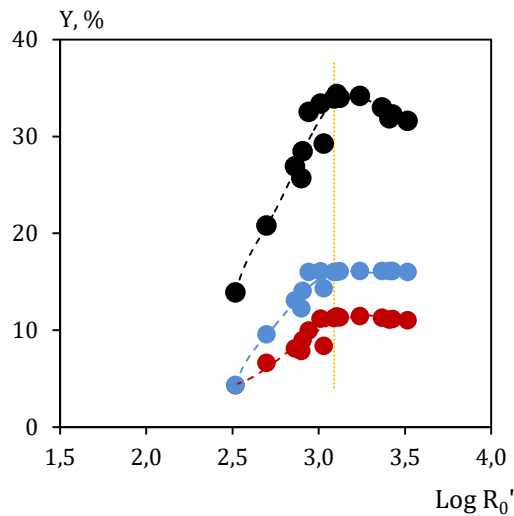


Figura 5.9: Representación del factor de severidad combinado sobre los rendimientos en azúcares totales (Y_{Tot} , ●), D-xilosa ($Y_{\text{D-xil}}$, ●) y D-glucosa ($Y_{\text{D-glu}}$, ●), en los experimentos de hidrólisis realizados sobre material de poda de olivo sin hoja utilizando ácido sulfúrico.

5.2.3. Naturaleza y concentración del agente hidrolítico. Hidrólisis con ácido clorhídrico

5.2.3.1. Hidrólisis con ácido clorhídrico sobre material de poda completo

En la primera etapa de este trabajo, complementaria a la del apartado 5.2.2.1, se han realizado un total de 20 experimentos con vistas a analizar el comportamiento del material de poda completo bajo condiciones fijadas de concentración de ácido clorhídrico (0,1 a 1,0 N) y temperatura de trabajo (75 a 95 °C).

a) Composición del residuo. Dando por válidas las premisas expuestas en los apartados 5.2.2.1 y 5.2.2.2, las conversiones fraccionales de hemicelulosa y celulosa se han determinado y se representan en la Figura 5.10 (a y b), valores que han sido calculados con los datos extraídos de la Tabla AP2.9 (Apéndice 2). Por otro lado, respecto a las cenizas resultantes de los residuos, tras los ensayos de hidrólisis, se observa el mismo efecto que en los experimentos realizados con ácido sulfúrico, es decir, una disminución del contenido en cenizas proporcional al aumento de la concentración de ácido, sin que la temperatura de trabajo ejerza una clara influencia sobre este parámetro.

La facilidad para fraccionar la hemicelulosa al emplear ácido clorhídrico ha sido reportada en estudios realizados por Hernández *et al.* (2009), efecto que, en el caso de este trabajo, es más o menos efectivo según las condiciones operatorias definidas, como así se observa en la Figura 5.10.a. donde se resalta cómo la conversión de este heteropolímero aumenta con la concentración de ácido y la temperatura. En consonancia, se consigue una conversión superior al 95 % en seis de los 20 experimentos realizados, siendo estos los siguientes: concentración de ácido clorhídrico 1 N y 85 °C, 0,7 y 1,0 N a 90 °C, y 0,5, 0,7 y 1,0 N a 95 °C. Conversiones superiores a 80 % se consiguen cuando se emplea una concentración de ácido clorhídrico de 0,5 N y una temperatura de 90 °C o 0,7 N y 85 °C. Concluyendo, se puede indicar que es inviable utilizar temperaturas por debajo de los 85 °C, con el conocimiento de que si se fijara esta temperatura se tendría que ir a la máxima concentración de ácido utilizada en orden a alcanzar altos rendimientos en monómeros y azúcares totales. Por otra parte, y con el mismo objetivo indicado, si lo que

se quiere es operar a bajas concentraciones de ácido, se podría fijar una concentración de 0,5 N, aunque en este caso se deberá trabajar a la máxima temperatura ensayada, 95 °C.

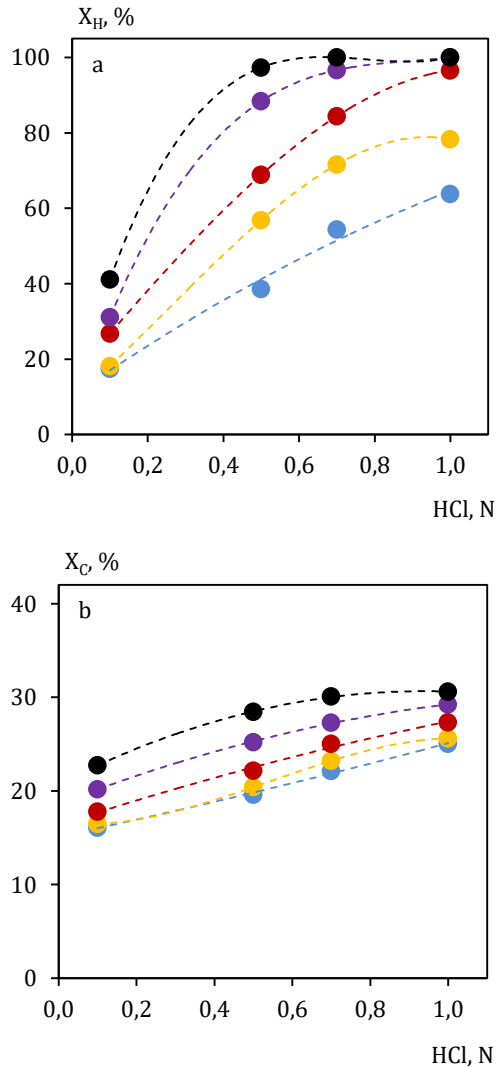


Figura 5.10.a: Conversiones de hemicelulosa (X_H) y b) celulosa (X_C) respecto al material de poda completo en los experimentos de hidrólisis con ácido clorhídrico a 75 (●), 80 (●), 85 (●), 90 (●) y 95 °C (●).

Para finalizar, puede afirmarse, de acuerdo con Carvalho *et al.* (2017), que la hemicelulosa, frente a la celulosa, es el polisacárido mayormente solubilizado, Fig. 5.10 (a y b), y es que la celulosa no sufre conversión total, tal como se aprecia también en la Fig. 5.5.b, cuando se usó ácido sulfúrico en el proceso de hidrólisis. No obstante, sí puede indicarse una conversión creciente tanto con la concentración de ácido como con la temperatura, si bien, como se sostiene, es una conversión baja en comparación con la hemicelulosa, efecto similar al afirmado por Aguilar *et al.* (2002). Se puede destacar que en ningún experimento se supera una conversión de la celulosa del 30 %.

b) Rendimiento en azúcares. Los rendimientos (%) en azúcares totales, D-glucosa y D-xilosa se recogen en la Tabla 5.5. Esta tabla es un resumen elaborado con los datos finales de cada experimento de hidrólisis (tiempo igual a 240 min), Tablas AP2.10 a AP2.29 (Apéndice 2). El comportamiento del material lignocelulósico en las hidrólisis con ácido clorhídrico, en cuanto a tendencias, no sufre variación respecto a los tratamientos realizados con ácido sulfúrico. De esta manera, puede notarse un efecto tendente al aumento de las concentraciones de los principales monómeros conforme se incrementa la concentración de ácido y la temperatura, que solo en algunos ensayos tiende a estabilizarse y que coincide con los últimos tiempos del experimento. Este efecto, se observa claramente en la Figura 5.11, donde pueden apreciarse tres superficies de respuesta que corresponden con los rendimientos en azúcares totales, D-glucosa y D-xilosa. Cada superficie integra a todos los experimentos de la serie que se trata, de ahí la importancia de esta gráfica, ya que permite observar de manera global la respuesta conjunta de todos los tratamientos ensayados.

Puede verse cómo D-glucosa es el monosacárido con mayor rendimiento en el hidrolizado (superficie intermedia de la Fig. 5.11) y D-xilosa está en un segundo lugar (superficie inferior de la Fig. 5.11), efecto también reportado por Lis *et al.* (2000), aunque inverso a los resultados de Hernández *et al.* (2009), en estudios de hidrólisis de bagazo de ágave con HCl para su posterior fermentación. Este efecto también sucedía en el apartado 5.2.2.1, junto al hecho de no haber detectado D-xilosa en los experimentos realizados a bajas concentraciones de ácido y temperaturas (Tabla 5.5). Ahora bien, una vez se aumentan las condiciones de hidrólisis, se consiguen alcanzar los máximos rendimientos en azúcares totales, entre 30 y 34 %, D-glucosa, de 14 a 16 % y 9 a 11 % de D-xilosa,

siendo estos experimentos los siguientes: HC-Cl12, HC-Cl15, HC-Cl16, HC-Cl18, HC-Cl19 y HC-Cl20.

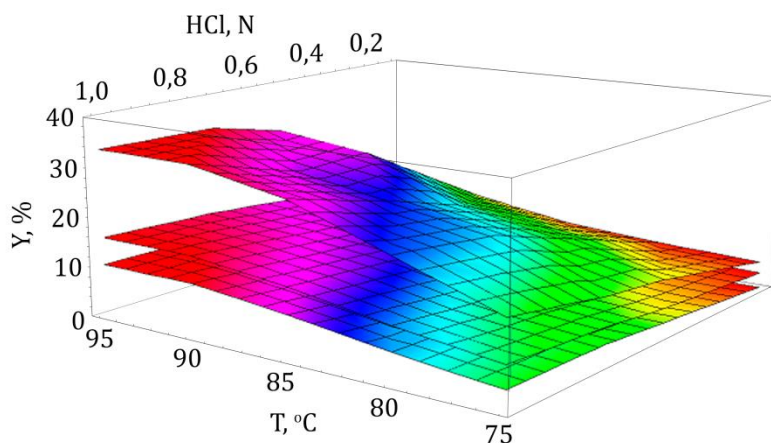


Figura 5.11: Rendimientos en azúcares totales (plano superior), D-glucosa (plano intermedio) y D-xilosa (plano inferior) de los 16 experimentos realizados con HCl sobre material de poda completo, determinados al final del proceso de hidrólisis (240 min).

Como datos comparativos, Domínguez *et al.* (1997b), obtuvieron unos rendimientos en azúcares totales de hasta 48,8 %, 37,8 % en D-xilosa y 4,2 % en D-glucosa, bajo unas condiciones de hidrólisis de 100 °C, tiempo variable entre 1 a 3 h y concentraciones de ácido clorhídrico de 1 a 5 %, utilizando como fuente de biomasa mazorcas de maíz. Cabe indicar también los rendimientos en azúcares totales obtenidos por Hernández *et al.* (2009), que son de entre 32 a 40 %, bajo condiciones constantes de temperatura (121 °C) y tiempo (4 h), y concentraciones de ácido clorhídrico variables (30, 60 y 90 mg HCl/g de materia seca). Por último, citar el trabajo de Herrera *et al.* (2004), que, utilizando paja de sorgo, reportan concentraciones de hasta 21,3 g D-xilosa dm^{-3} y 4,7 g D-glucosa dm^{-3} , empleando condiciones fijas de temperatura (100 °C), tiempo (0-300 min) y concentraciones de ácido clorhídrico variable (2-6 %).

Tabla 5.5: Rendimiento en azúcares totales, D-glucosa, D-xilosa, en los experimentos de hidrólisis realizados sobre material de poda completo empleando HCl. Tiempo: 240 min.

Expto.	HCl, N	T, °C	Y _{tot} , %	Y _{D-glu} , %	Y _{D-xil} , %
HC-Cl1	0,1	75	5,52	3,12	nd
HC-Cl2	0,5	75	12,13	5,17	2,34
HC-Cl3	0,7	75	15,28	6,79	3,56
HC-Cl4	1,0	75	17,55	8,23	3,87
HC-Cl5	0,1	80	6,24	3,67	nd
HC-Cl6	0,5	80	15,38	6,87	2,77
HC-Cl7	0,7	80	20,66	8,47	5,18
HC-Cl8	1,0	80	22,97	10,65	5,87
HC-Cl9	0,1	85	7,24	3,48	0,01
HC-Cl10	0,5	85	18,93	8,33	5,16
HC-Cl11	0,7	85	24,30	11,99	6,07
HC-Cl12	1,0	85	29,54	13,72	8,43
HC-Cl13	0,1	90	9,45	4,02	0,03
HC-Cl14	0,5	90	27,07	12,54	7,64
HC-Cl15	0,7	90	29,64	13,83	8,59
HC-Cl16	1,0	90	33,49	15,87	10,47
HC-Cl17	0,1	95	12,36	7,67	0,23
HC-Cl18	0,5	95	30,06	13,76	9,30
HC-Cl19	0,7	95	32,99	15,04	10,27
HC-Cl20	1,0	95	33,75	15,92	10,46

c) Efecto combinado de la concentración de ácido y la temperatura de trabajo.

Para abordar este apartado, al igual que en los precedentes 5.2.2.1.c y 5.2.2.2.c, se han considerado los rendimientos (en azúcares totales, D-glucosa y D-xilosa) de cada experimento de hidrólisis (a tiempo de 240 min) de la serie que se trata, realizada sobre material de poda completo empleando ácido clorhídrico, Figura 5.12, donde se relacionan estos datos con los valores del parámetro de severidad combinada o $\text{Log } R_0'$ de cada experimento, Chum *et al.* (1990a, b) y Abatzoglou *et al.* (1992). En una primera aproximación se puede observar un aumento de los rendimientos en las tres series representadas: azúcares totales, D-glucosa y D-xilosa, efecto que consigue estabilizarse en los tres procesos en los que se maximiza la severidad: HC-Cl16 ($\text{Log } R_0' = 3,21$), HC-Cl19 ($\text{Log } R_0' = 3,23$), HC-Cl20 ($\text{Log } R_0' = 3,24$). Cabe puntualizar cómo D-xilosa no se solubiliza a bajas severidades, necesitando superar valores de $\text{Log } R_0' = 2$ para comenzar a hacerlo.

Aparentemente, no se observa degradación en los azúcares representados, aunque si se observan otros monómeros como puede ser D-fructosa. Sin embargo, sí que puede sostenerse la existencia de cierta degradación a altas severidades, aspecto importante a tratar debido a lo reportado en bibliografía sobre la generación de compuestos indeseables por ser inhibidores del crecimiento microbiano, Mussatto y Roberto (2005), Nichols *et al.* (2010) y Wang *et al.* (2014), aspecto que será discutido en los próximos apartados ya que, debido a existencia de estos compuestos, es necesario alcanzar un compromiso entre la severidad de los tratamientos, el rendimiento en monómeros obtenido y la generación de dichos compuestos, Shatalov y Pereira (2012).

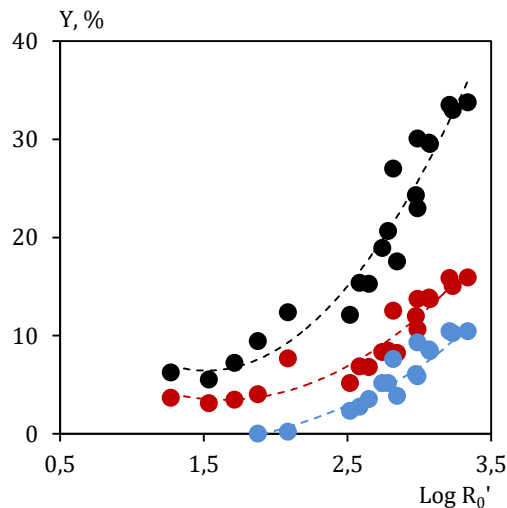


Figura 5.12: Factor de severidad combinado sobre los rendimientos en azúcares totales (Y_{tot} , ●), D-glucosa (Y_{D-glu} , ●) y D-xilosa (Y_{D-xil} , ●), en los experimentos de hidrólisis realizados sobre material de poda de olivo completo utilizando ácido clorhídrico.

5.2.3.2. Hidrólisis con ácido clorhídrico sobre material de poda sin hoja

El tratamiento ácido sobre la poda de olivar sin hoja, como se ha comentado en el apartado 5.2.2.2, corresponde a una segunda etapa del trabajo de investigación. Si bien, el objetivo de este apartado ha sido estudiar la respuesta al tratamiento con ácido clorhídrico y también se reportará, a modo de puntualizaciones durante el desarrollo del apartado, una comparativa del comportamiento de los dos materiales empleados (poda completa y sin hoja) al ataque con ácido clorhídrico.

Se han llevado a cabo 16 experimentos con vistas a analizar el comportamiento del material bajo concentraciones fijadas de ácido clorhídrico, en el rango 0,5 a 2,0 N, y temperatura de trabajo, entre 85 y 100 °C. Al igual que en todas las series comentadas hasta ahora, la relación biomasa/disolución de ácido ha sido de 1/10 p/v.

a) Composición del residuo. De entre los dos polisacáridos analizados, celulosa y hemicelulosa, es esta segunda la que sufre mayor conversión fraccional, Figura 5.13 (elaborada a partir de la Tabla AP2.53, Apéndice 2), de acuerdo con Carvalho *et al.* (2017), al igual que se ha reportado en los apartados anteriores. Este efecto se repite en un mayor número de experimentos respecto a la serie realizada con material completo, ya que en la presente serie las condiciones experimentales son más severas, alcanzándose conversiones del 100 % en la mayor parte de los ensayos, Fig. 5.13.a.

Respecto a la composición del residuo sólido resultante de hidrólisis, cabe comentar cómo el contenido en cenizas ofrece un valor bastante homogéneo y en ningún experimento se supera el 0,3 %. Además, los datos son del mismo orden de magnitud a los obtenidos en los ensayos realizados con material de poda completo, en cuanto a condiciones experimentales se refiere.

Otro de los parámetros analizados, como se ha comentado en el primer párrafo, es la conversión de la hemicelulosa, Figura 5.13.a. Como se ha dicho, este parámetro alcanza valores del 100 % en gran parte de los experimentos, ya que solo 3 de los 16 realizados no alcanzan la conversión total. En cuanto a las series planteadas, las realizadas a 95 y 100 °C muestran una conversión total independientemente de la concentración de ácido fijada, mientras que las series ejecutadas a 85 y 90 °C sí que muestran un incremento de

la conversión a medida que aumenta la concentración de ácido clorhídrico, aunque cabe destacar que a 90 °C se alcanzan en todos los ensayos conversiones superiores al 94 %.

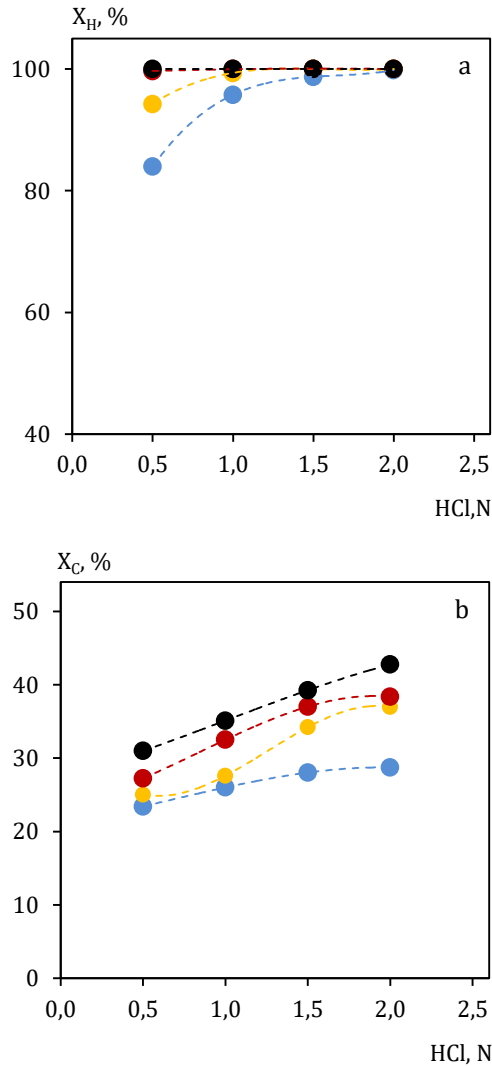


Figura 5.13.a: Conversiones de hemicelulosa (X_H) y b) celulosa (X_C) respecto al material de poda sin hoja en los experimentos de hidrólisis con ácido clorhídrico realizados a 85 (●), 90 (●), 95 (●) y 100 °C (●).

Finalmente, la celulosa, Figura 5.13.b, muestra una tendencia que permite afirmar que este polímero consigue solubilizarse a medida que aumenta la temperatura y la concentración de ácido. Aunque solo en el caso más extremo se llega a superar ligeramente una conversión del 40 %. Este comportamiento viene reportado en la bibliografía por autores como Foyle *et al.* (2007) o Shi *et al.* (2015), los cuales afirman que, al comparar el comportamiento de la celulosa y la hemicelulosa al ataque ácido, esta hidroliza con mayor facilidad la segunda debido a la mayor accesibilidad y menor grado de polimerización frente a la difícil solubilización de la celulosa cristalina.

b) Rendimiento en azúcares. El comportamiento que muestra el material bajo las condiciones operatorias fijadas, Tabla 5.6 (resumen de las Tablas AP2.54 a AP2.69, Apéndice 2), es de un aumento en los rendimientos con el tiempo de ensayo tendente a una rápida estabilización que es conseguida en la mayoría de los experimentos; efecto que sucedía igualmente al trabajar con material completo (véanse los experimentos análogos entre las dos series realizadas con material completo y sin hoja). De cualquier forma, en gran parte de los ensayos se consigue maximizar los rendimientos a 95 y 100 °C para todas las concentraciones estudiadas y, a 85 y 90 °C a partir de 1 N de HCl (a modo de comparación se sugiere ver los estudios reportados en el apartado 5.2.3.1.b.). Solamente en algunos casos puntuales, coincidiendo con las condiciones más severas, se aprecia cierta degradación de algunos monómeros, efecto que será más perceptible en el siguiente apartado 5.2.3.2.c.

Como se ha afirmado en los apartados donde se ha empleado ácido sulfúrico en la hidrólisis del material de poda, una de las principales diferencias entre el material de poda completo y sin hoja es la composición química. Diferencia observable en la caracterización del material (ver apartado 5.1) y que puede ser corroborada al observar los rendimientos en monosacáridos, Tablas 5.5 y 5.6. Tras lo que se puede concluir que existe diferencia composicional entre los dos materiales de partida utilizados en este trabajo y, al igual que sucedía al emplear ácido sulfúrico (apartado 5.2.2.2.b), el monosacárido predominante derivado tras la hidrólisis del material de poda completo es D-glucosa, mientras que al trabajar con material de poda sin hoja es D-xilosa. Como se concluyó, este efecto es debido a la estructura del material lignocelulósico de partida, Lee *et al.* (1999), Mosier *et al.* (2005), Taherzadeh y Karimi (2007a), Akpinar *et al.* (2009) y Lenihan *et al.* (2011).

Tabla 5.6: Rendimientos en azúcares totales, D-glucosa y D-xilosa en los experimentos de hidrólisis realizados sobre material de poda sin hoja empleando HCl. Tiempo: 240 min.

Expto.	HCl, N	T, °C	Y _{tot} , %	Y _{D-glu} , %	Y _{D-xil} , %
HSh-CI1	0,5	85	20,97	7,03	10,47
HSh-CI2	1,0	85	30,09	10,54	15,26
HSh-CI3	1,5	85	31,56	10,69	16,10
HSh-CI4	2,0	85	32,36	11,07	16,04
HSh-CI5	0,5	90	28,61	9,86	14,23
HSh-CI6	1,0	90	29,38	9,63	15,21
HSh-CI7	1,5	90	30,81	9,99	15,99
HSh-CI8	2,0	90	32,39	11,04	16,06
HSh-CI9	0,5	95	30,88	10,48	15,62
HSh-CI10	1,0	95	31,15	10,65	15,67
HSh-CI11	1,5	95	30,79	10,22	16,06
HSh-CI12	2,0	95	32,38	11,01	16,00
HSh-CI13	0,5	100	31,84	10,63	16,08
HSh-CI14	1,0	100	31,60	10,87	16,03
HSh-CI15	1,5	100	32,06	10,69	15,89
HSh-CI16	2,0	100	32,27	11,09	16,03

Finalmente, cabe señalar que al utilizar material de poda sin hoja, bajo las condiciones expresadas, los rendimientos máximos en azúcares totales presentan un rango de 31 a 32 %, D-xilosa presenta máximos de un 16 % y D-glucosa de 11 %. Por tanto, si se consideran los rendimientos máximos de ambos azúcares simples, al emplear material de poda completo y sin hoja, se aprecia como apenas hay diferencia entre los materiales de partida.

c) Efecto combinado de la concentración de ácido y la temperatura de trabajo. Al igual que en apartados anteriores, la severidad de los tratamientos sobre el rendimiento en azúcares totales, D-xilosa y D-glucosa se va analizar a través del parámetro denominado factor de severidad combinado, expresado como $\text{Log } R_0'$, Chum *et al.* (1990a, b) y Abatzoglou *et al.* (1992). En este sentido, se observa un aumento de los rendimientos hasta alcanzar valores de $\text{Log } R_0'$ próximos a 3, en caso de D-xilosa y D-glucosa y, de 3,2 para el rendimiento en azúcares totales, Figura 5.14. A partir de estas severidades los rendimientos se estabilizan entorno a los valores máximos comentados en el apartado anterior. Aunque cabe indicar cómo, en los experimentos donde la severidad ha sido

máxima ($\text{Log } R_0' = 3,7$), se aprecia cierta caída en el valor del rendimiento debido a la degradación de monosacáridos, aunque solo en el caso de azúcares totales y D-glucosa, ya que los rendimientos en D-xilosa se mantienen estables, al igual que ocurre en la serie realizada con ácido sulfúrico.

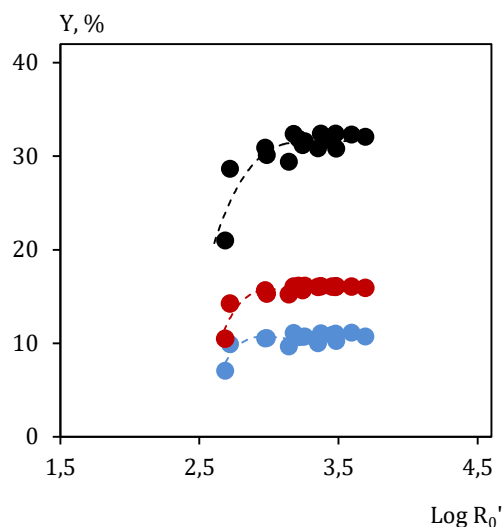


Figura 5.14: Factor de severidad combinado sobre el rendimiento en azúcares totales (Y_{tot} , ●), D-xilosa ($Y_{\text{D-xil}}$, ●) y D-glucosa ($Y_{\text{D-glu}}$, ●), en los experimentos de hidrólisis realizados sobre material de poda de olivo sin hoja utilizando ácido clorhídrico.

Tras esta observación anterior, como se ha venido reiterando, de acuerdo con Shatalov y Pereira (2012), a la hora de trasladar las condiciones operatorias a una escala de trabajo superior o con la finalidad de utilizar el hidrolizado resultante en un aprovechamiento vía fermentativa, debe establecerse un compromiso entre severidad combinada y maximización de rendimientos. Debido a que, como concluyen ciertos autores, Nguyen *et al.* (1999), Mussatto y Roberto (2005) y Wang *et al.* (2014), la presencia de ciertos compuestos de degradación podrían inhibir el crecimiento de microorganismos de uso biotecnológico.

Por último, cabría citar los valores en los que se maximizan los rendimientos y que corresponderían a los ensayos HSh-Cl4 ($\text{Log } R_0' = 3,18$), HSh-Cl8 ($\text{Log } R_0' = 3,38$), HSh-Cl12 ($\text{Log } R_0' = 3,48$) y HSh-Cl16 ($\text{Log } R_0' = 3,59$), aunque el resto de experimentos ofrecen valores próximos a los máximos referidos, Tabla 5.6 y Fig. 5.14.

5.2.4. Efecto del tipo de ácido

En este estudio, como ha quedado plasmado en los anteriores apartados, se han empleado dos agentes hidrolíticos, ácidos sulfúrico y clorhídrico. Pues bien, el efecto de cada uno de ellos sobre el material de partida va a ser el objeto de discusión en los dos siguientes apartados.

El ácido sulfúrico, Nguyen *et al.*, (1999), Sun y Cheng, (2002), Muktham *et al.* (2016), y el ácido clorhídrico, Sun y Cheng (2002), Hernández *et al.* (2009), Mateo *et al.* (2010), Muktham *et al.* (2016), son ácidos potencialmente utilizables para la hidrólisis de material lignocelulósico, habiendo sido los únicos ácidos empleados a nivel industrial en la hidrólisis de material lignocelulósico, según reportan Galbe y Zacchi (2007).

5.2.4.1. Influencia del tipo de ácido sobre el material de poda completo

Respecto al contenido en cenizas resultante tras los ensayos con material de poda completo, se puede observar como no existe diferencia al emplear uno u otro ácido, Tablas AP2.9 y AP2.31 (Apéndice 2). Por otro lado, la conversión de la hemicelulosa en las series realizadas a baja y media temperatura es más efectiva cuando se emplea ácido clorhídrico, aunque a medida que se van alcanzando las condiciones más extremas, y al emplear indistintamente uno u otro ácido, se consiguen conversiones totales de hemicelulosa, por lo que se consigue igualar este efecto, Fig. 5.5.a y 5.10.a. Más adelante, cuando se trate el tema de la generación de inhibidores, se constatará como afecta de forma más pronunciada el ácido clorhídrico frente al sulfúrico en la formación de compuestos indeseables en fermentación.

En cuanto a la conversión de la celulosa, se ha reportado que al trabajar con bajas concentraciones de ácido y temperaturas moderadas, la conversión es baja, Mussatto (2016). En este sentido, si se comparan las Fig. 5.5.b y 5.10.b, se puede decir que la conversión de la celulosa es baja, no superándose el 30 % con ninguno de los dos ácidos. Aunque puede observarse como a bajas concentraciones es el ácido clorhídrico, frente a sulfúrico, con el que se consigue atacar la celulosa en una proporción ligeramente superior.

Por otro lado, en cuanto a rendimientos y severidad de los tratamientos, en la Figura 5.15, se representa el rendimiento en azúcares totales de todos los experimentos realizados con ácido sulfúrico y clorhídrico frente al factor de severidad combinado. En una primera aproximación, pueden identificarse comportamientos similares independientemente del tipo de ácido empleado. Así pues, en todos los casos se observan tendencias exponenciales que llevan a rendimientos crecientes con el aumento de la severidad de los tratamientos. Ahora bien, si se observa detenidamente las nubes de puntos y se desglosan cada una de las series representadas, puede concluirse la existencia de una barrera (líneas verticales discontinuas en la figura) que representa el comportamiento diferente de ambos ácidos y el efecto sobre el material que se trata.

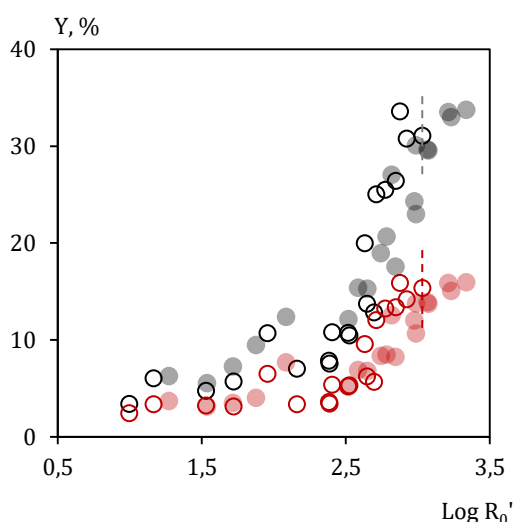


Figura 5.15: Rendimientos en azúcares totales y D-glucosa en todos los procesos de hidrólisis realizados sobre material de poda de olivo completo utilizando ácido sulfúrico ($Y_{\text{totH}_2\text{SO}_4}$, \circ y $Y_{\text{D-gluH}_2\text{SO}_4}$, \circ) y ácido clorhídrico (Y_{totHCl} , \bullet y $Y_{\text{D-gluHCl}}$, \bullet) frente al factor de severidad combinado.

En consonancia, puede observarse como, bajo las mismas condiciones de operación, los tratamientos con ácido clorhídrico son de una severidad superior a los realizados con sulfúrico, lo que no conlleva obtener rendimientos superiores. Es más, si se observan las series en las que es representada D-glucosa, podrá apreciarse como se obtienen rendimientos ligeramente superiores al emplear ácido sulfúrico frente a clorhídrico, sin la necesidad de tener que alcanzar altos valores de severidad.

5.2.4.2. Influencia del tipo de ácido sobre el material de poda sin hoja

El material de poda sin hoja, no evidencia diferencias en cuanto a la producción de cenizas al aplicar ácido sulfúrico o ácido clorhídrico. En todos los casos y bajo las condiciones ensayadas los resultados se acercan a cero, Tablas AP2.53 y AP2.71 (Apéndice 2).

Respecto al comportamiento de la hemicelulosa al ataque de los dos ácidos empleados, Fig. 5.8.a y 5.13.a, donde se plasma la conversión de este heteropolímero, puede observarse que es más efectiva cuando se emplea ácido clorhídrico en condiciones de operación bajas y medias, aunque a medida que se van alcanzando condiciones de operación medias y altas, se igualan los valores de conversión. En cuanto a la celulosa, la conversión de este homopolímero se recoge en las Figuras 5.8.b y 5.13.b. Puede decirse que es baja, ya que presenta valores máximos del 41,30 % y 42,75 % al utilizar ácido sulfúrico y ácido clorhídrico, respectivamente.

Por otro lado, en lo que se refiere a los rendimientos en azúcares totales y al monosacárido principal para este tipo de material (D-xilosa), en relación al factor de severidad combinado, se pueden reconocer dos series diferentes, que corresponden a los experimentos realizados con H_2SO_4 y HCl , Figura 5.16. A grandes rasgos, se puede observar un comportamiento paralelo de ambos ácidos, aunque si se entra en detalle, a partir de valores de $\text{Log } R_o' \geq 2,90$, se refleja cómo el aumento de la severidad combinada no mejora los rendimientos de hidrólisis, sino que puede notarse un efecto negativo sobre estos. Este efecto es notable sobre todo al representar el rendimiento en azúcares totales en la serie realizada con ácido sulfúrico y está en consonancia con los resultados publicados por Mateo (2011), al realizar tratamientos térmicos sobre material de poda de olivo completo. Es más, si se observan las series representadas, se puede apreciar cómo para valores a partir de $\text{Log } R_o' = 2,97$, los rendimientos más altos se obtienen con ácido sulfúrico. Para finalizar, se han incluido unas líneas discontinuas que indican como, a partir de valores de $\text{Log } R_o' \geq 3,50$, puede notarse, al igual que en el apartado anterior, una mayor severidad de los tratamientos realizados con ácido clorhídrico que no conllevan un aumento de los rendimientos en carbohidratos.

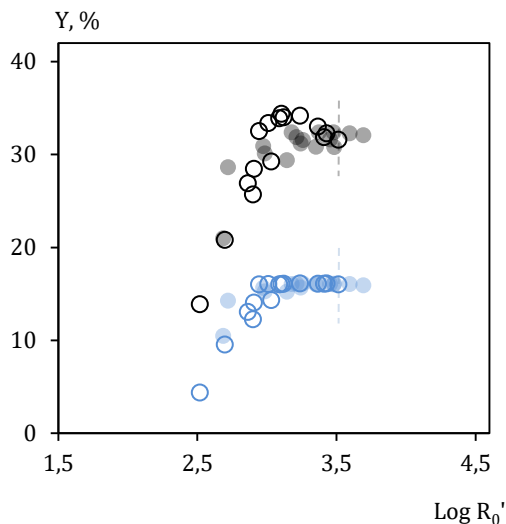


Figura 5.16: Rendimientos en azúcares totales y D-xilosa en los experimentos de hidrólisis sobre material de poda de olivo sin hoja, utilizando los ácidos sulfúrico ($Y_{\text{tot H}_2\text{SO}_4}$, ○ y $Y_{\text{xil H}_2\text{SO}_4}$, ●) y clorhídrico ($Y_{\text{tot HCl}}$, ● y $Y_{\text{xil HCl}}$, ●) vs al factor de severidad combinado.

Por último, como conclusión al apartado 5.2.4, cabe reiterar la importancia que a nivel industrial tiene la recuperación del ácido empleado y la ventaja económica del ácido sulfúrico frente al clorhídrico, debido a que presenta un menor coste por mol de protones, es menos corrosivo y volátil, Moya (1997) y García (2007), presentando alta efectividad cuando es usado en concentraciones por debajo de 4 % (p/v), Mussatto (2016). También conviene indicar que la concentración de ácido a emplear varía en función de los objetivos marcados e influye de diferente forma según el monosacárido que se trate, Domínguez *et al.* (1997b). Estos autores observaron una mayor susceptibilidad a la degradación de D-xilosa frente a D-glucosa o L-arabinosa cuando emplean una secuencia creciente de concentraciones de HCl.

5.2.5. Generación de compuestos inhibidores

El aprovechamiento del material lignocelulósico por vía bioquímica, a través de hidrólisis ácida y fermentación, requiere de un control exhaustivo de las variables que intervienen en cada una de las operaciones básicas. Todos los autores consultados modifican estas variables con objeto de mejorar el proceso, entre los que se encuentran: Du Toit *et al.* (1984), Roberto *et al.* (1991), Herrera *et al.* (2004), Villarreal *et al.* (2006), Hernández *et al.* (2009), Shatalov y Pereira (2012). Si bien, todos ellos coinciden en la necesidad de obtener un caldo de cultivo apto para los microorganismos que mediarán la producción de bioproductos, y con la menor concentración posible de compuestos tóxicos para el desarrollo de los mismos, Luo *et al.* (2002), Liu y Blaschek (2010). Este es un aspecto importante de cara a lograr la economía en el proceso al disminuir costes posteriores por necesidad de detoxificación, Mussatto (2016).

En este apartado se van a analizar los resultados obtenidos tras el análisis de compuestos inhibidores tales como: ácido acético, furfural, 5-hidroximetil furfural (HMF) y compuestos fenólicos totales (CFT).

5.2.5.1. Generación de compuestos fenólicos totales (CFT)

El metabolismo microbiano puede verse inhibido debido a la interacción de compuestos fenólicos sobre determinadas zonas hidrófobas de la membrana celular, de manera que esta perdería su capacidad de actuar como barrera selectiva, Almeida *et al.* (2007).

En las series realizadas con los ácidos sulfúrico y clorhídrico sobre material de poda completo, se observa una generación de CFT creciente a favor de incrementos del factor de severidad combinada, al mismo efecto hay que añadir un paralelismo que surge al utilizar uno u otro ácido, Figura 5.17.a. Sin embargo, si se observa la Figura 5.17.b, en la que se representan las series realizadas con material de poda sin hoja, puede observarse el mismo efecto de generación creciente de CFT a favor del aumento de la severidad, pero con una pendiente mayor cuando se emplea ácido clorhídrico, tendencia que se puede justificar considerando que el HCl es un ácido más fuerte.

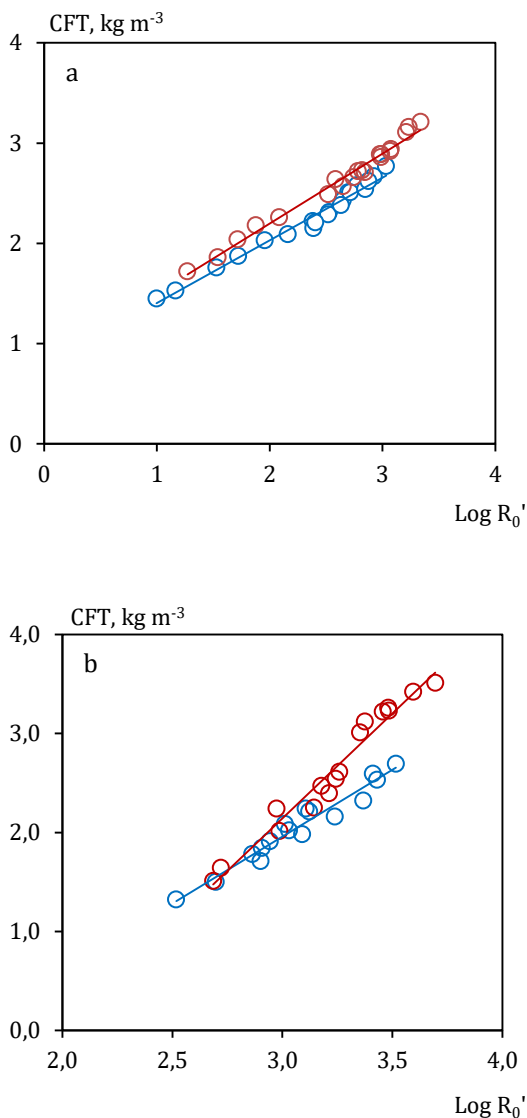


Figura 5.17.a: Generación de compuestos fenólicos totales (CFT) en los experimentos realizados con material de poda completo y b: sin hoja, empleando H_2SO_4 (o) y HCl (o).

El rango de concentraciones de CFT generados al emplear material de poda completo, Fig. 5.17.a, está entre 1,45 y 2,77 kg m^{-3} al emplear ácido sulfúrico, y 1,72 a 3,21 kg m^{-3} al usar ácido clorhídrico, mientras que al utilizar material sin hoja, Fig. 5.17.b, los respectivos rangos son de 1,32-2,69 kg m^{-3} y 1,51-3,51 kg m^{-3} . En ambos casos, estos resultados se sitúan por debajo de los valores obtenidos por Fonseca *et al.* (2013), al hidrolizar poda de olivo completa durante 90 min a 120 °C y utilizando como agente

hidrolítico ácido sulfúrico al 2 % p/p. Aunque sí que está en consonancia con los valores reportados por estos mismos autores al caracterizar hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz obtenido al hidrolizar este material con ácido sulfúrico al 1 % p/p a una temperatura de 120 °C durante 30 min. Por otro lado, García (2007) aporta en sus estudios una concentración de CFT de 6,16 mg kg⁻¹ en hidrolizado de poda de olivo var. 'Picual' sin hoja obtenido a 90 °C con ácido sulfúrico 1 N, siendo hidroxitirosol, 4-hidroxibenzaldehído, ácido cafeico y vainillina los compuestos más representativos.

En cuanto al tipo de material empleado, según los trabajos de Talhaoui *et al.* (2014) y Salido *et al.* (2015), realizados con objeto de caracterizar la madera y hoja de olivo (variedad 'Picual'), los compuestos fenólicos identificados serían los que se recogen en las Tablas 5.2.a y b. Estos autores reportan unas concentraciones de CFT en madera de olivo de 262,99 g kg⁻¹ y 51,78 g kg⁻¹ en hoja de olivo.

Como enlace al siguiente gran apartado de este estudio, fermentación de hidrolizados, cabe aludir a la sección 2.5.5.1.c, donde, autores como Delgenes *et al.* (1996), Almeida *et al.* (2007), Cortez (2010), Pereira *et al.* (2011), Silva *et al.* (2013) o Fonseca *et al.* (2013) hacen mención al poder inhibitorio de varios compuestos fenólicos sobre el crecimiento de las levaduras *C. guilliermondii* y *P. stipitis*.

5.2.5.2. Generación de ácido acético

El ácido acético es el principal ácido alifático presente en la poda de olivar, Mateo *et al.* (2013^a) que junto al ácido levulínico y fórmico son los generalmente presentes en los hidrolizados hemicelulósicos, Lohmeier-Vogel *et al.* (1998) y Scordia *et al.* (2012). Estos mismos autores afirman que el efecto nocivo de estos ácidos aparece por acidificación del citoplasma celular por debajo de los límites fisiológicos. Así mismo, sugieren que la difusión de estos compuestos a través de la membrana celular se produce cuando están en forma no disociada, presentando carácter liposoluble, efecto que se produce cuando las concentraciones son tales que el pH del medio es menor a sus respectivos pK_{as}.

En el presente trabajo, la poda de olivar completa, tras ser sometida a tratamientos de hidrólisis ácida, presenta concentraciones de ácido acético que aumentan de forma directamente proporcional al aumento de la severidad combinada de los tratamientos,

Figura 5.18.a, alcanzando máximos en las condiciones de máxima severidad: 4,74 o 4,07 kg m⁻³, con ácido clorhídrico y sulfúrico respectivamente, mientras que a valores de severidad media la concentración de ácido acético es de orden de 2 kg m⁻³. Por otro lado, respecto al comportamiento del material de poda sin hoja en cuanto a la producción de este inhibidor bajo los tratamientos empleados, Figura 5.18.b, puede observarse un una tendencia logarítmica, en la que una primera etapa de crecimiento, coincidente con los valores de severidad combinada bajos, precede a una segunda de estabilización, de acuerdo con los valores de severidad combinada medios y altos. Este comportamiento se cumple para los dos agentes hidrolíticos empleados, aunque los resultados obtenidos con ácido clorhídrico son superiores. En este caso, las concentraciones máximas obtenidas que coinciden con los valores máximos de severidad combinada son de 3,95 y 3,73 kg m⁻³, referidas a HCl y H₂SO₄ respectivamente.

Concluyendo, si comparamos los resultados obtenidos en este estudio con valores dados en bibliografía y atendiendo a experimentos realizados en condiciones similares, se puede decir que son superiores a los reportados por Mateo *et al.* (2013a), al hidrolizar poda de olivar completa con H₂SO₄ al 2 % p/p y una temperatura de 120 °C durante 90 min; autores que señalan una concentración de 1,67 kg m⁻³. Aunque sí que estarían cercanos a obtenidos por Fonseca *et al.* (2013), que señalan una concentración de 2,2 kg m⁻³, al utilizar hidrolizado hemicelulósico de poda de olivar completa obtenido bajo las mismas condiciones de hidrólisis que los anteriores autores.

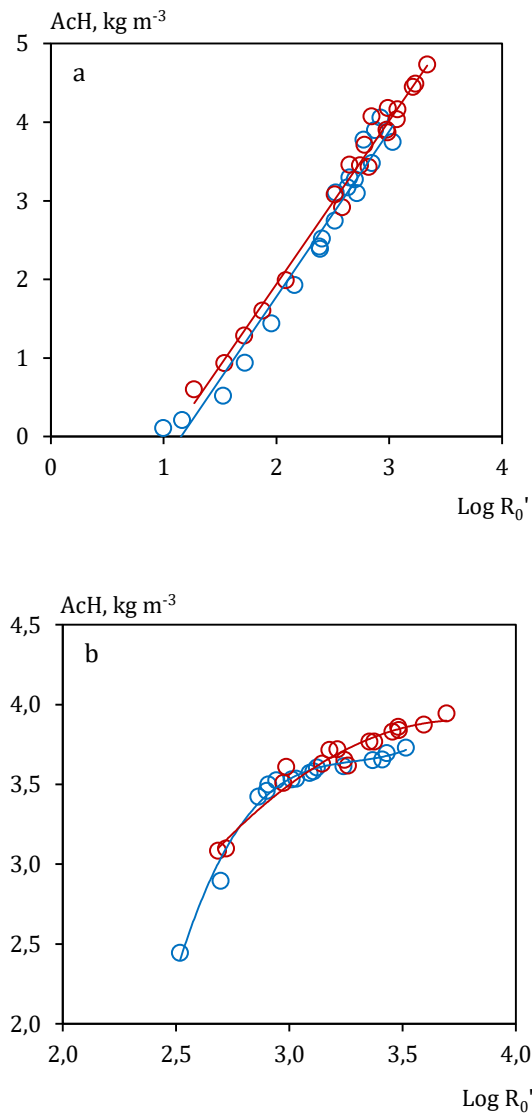


Figura 5.18.a: Generación de ácido acético en los experimentos realizados con material de poda completo y b: sin hoja, empleando ácido sulfúrico (●) y ácido clorhídrico (○).

Finalmente, siguiendo la argumentación del apartado anterior, con objeto de enlazar al siguiente gran apartado de este estudio, fermentación de hidrolizados, cabe aludir al apartado 2.5.5.1.c, donde, autores como Roberto *et al.* (1991), Felipe *et al.* (1996), Silva *et al.* (2004), Pereira *et al.* (2011), Bellido *et al.* (2011), Castro *et al.* (2013), hacen mención

al comportamiento de las levaduras *C. guilliermondii* y *P. stipitis*; en relación a la concentración de ácido acético presente en medio de cultivo.

5.2.5.3. Generación de furanos

La relevancia de estudiar estos compuestos, generados por degradación de hexosas y pentosas: 5-hidroximetil furfural (HMF) y furfural; respectivamente, Palmqvist y Hahn-Hägerdal (2000), se debe a su carácter inhibitorio señalado por diversos autores, Roberto *et al.* (1991), Felipe *et al.* (1996), Bellido *et al.* (2011), Mateo *et al.* (2013b), y es que estos son capaces de alterar ciertos enzimas como: alcohol deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, hexoquinasa; o, por otro lado, también pueden sufrir la conversión a alcoholes furánicos y alterar la concentración de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, desbalanceando las rutas metabólicas, Fonseca (2011).

Las concentraciones de furfural y HMF respecto al hidrolizado de poda completo, Figuras 5.19.a y 5.20.a, siguen un comportamiento exponencial de acuerdo a valores crecientes del factor de severidad combinado. Las concentraciones máximas de furfural son de 81,34 g m⁻³ al emplear ácido sulfúrico y 141,23 g m⁻³ al emplear ácido clorhídrico, y se obtienen, respectivamente, para valores de Log R₀' de 2,88 y 3,34. El HMF, sigue el mismo comportamiento que el furfural, así mismo, las concentraciones máximas se alcanzan para los mismos valores de Log R₀', siendo: 337,43 y 421,33 g m⁻³, en los tratamientos realizados con ácido sulfúrico y clorhídrico respectivamente. En este sentido, puede notarse el efecto del tipo de ácido empleado, ya que en ambos casos la producción de estos compuestos es mayor cuando se emplea ácido clorhídrico como agente hidrolítico.

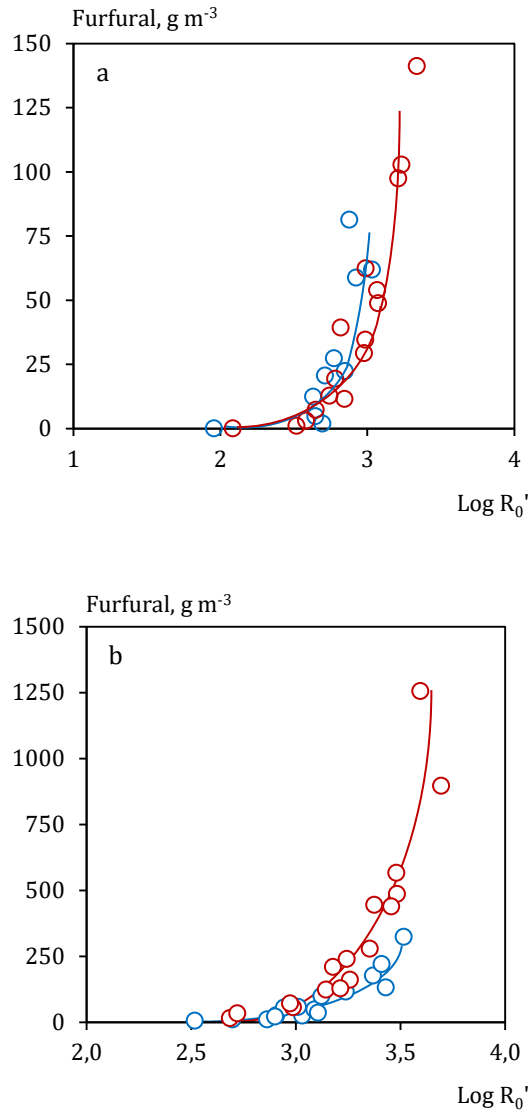


Figura 5.19.a: Generación de furfural en los experimentos realizados con material de poda completo y b: sin hoja, empleando ácido sulfúrico (o) y ácido clorhídrico (o).

Respecto al material de poda sin hoja, Figuras 5.19.b y 5.20.b, la generación de furfural sigue un comportamiento exponencial, mientras que en el caso del HMF es lineal. Los valores máximos, en el caso del furfural, se obtienen para valores de $\text{Log } R_0'$ de 3,59 y 3,52 y son de 1,26 y 0,32 kg m^{-3} , al utilizar ácido clorhídrico y sulfúrico respectivamente. En el caso del HMF, los resultados son más bajos, y es que para valores de $\text{Log } R_0'$ de 3,59 y 3,48 se obtienen, respectivamente: 83,2 y 63,0 g m^{-3} , al utilizar ácido clorhídrico y sulfúrico respectivamente.

Como puede observarse, la concentración de furfural máxima es superior a 1 kg m^{-3} , cuando se emplea material de poda sin hoja frente al material completo, efecto lógico debido a la mayor concentración de pentosas en el material sin hoja frente al material completo. En este sentido, tal como se trata en el apartado 2.5.5.1.c, y según reportan autores como, Roberto *et al.* (1991), Felipe *et al.* (1996), Delgenes *et al.* (1996), Liu *et al.* (2005), Gorsich *et al.* (2006), Slininger *et al.* (2006), Bellido *et al.* (2011), Silva *et al.* (2013) o Fonseca *et al.* (2013), se debe atender a este compuesto, por su carácter dual, ya que puede actuar como compuesto inhibitorio o como fuente de carbono, dependiendo de la concentración en la que se encuentre en el caldo de cultivo, Roberto *et al.* (1991). Estos mismos autores señalan que a partir de 1 kg m^{-3} de furfural y 0,5 kg m^{-3} de HMF, estos compuestos se clasificarían como inhibidores del crecimiento de la lavadura *P. stipitis*. Mientras que en el caso de *C. guilliermondii*, según los estudios de Felipe *et al.* (1996) este efecto de obtendría a unas concentraciones de 0,25 kg m^{-3} de furfural y 0,42 kg m^{-3} de HMF.

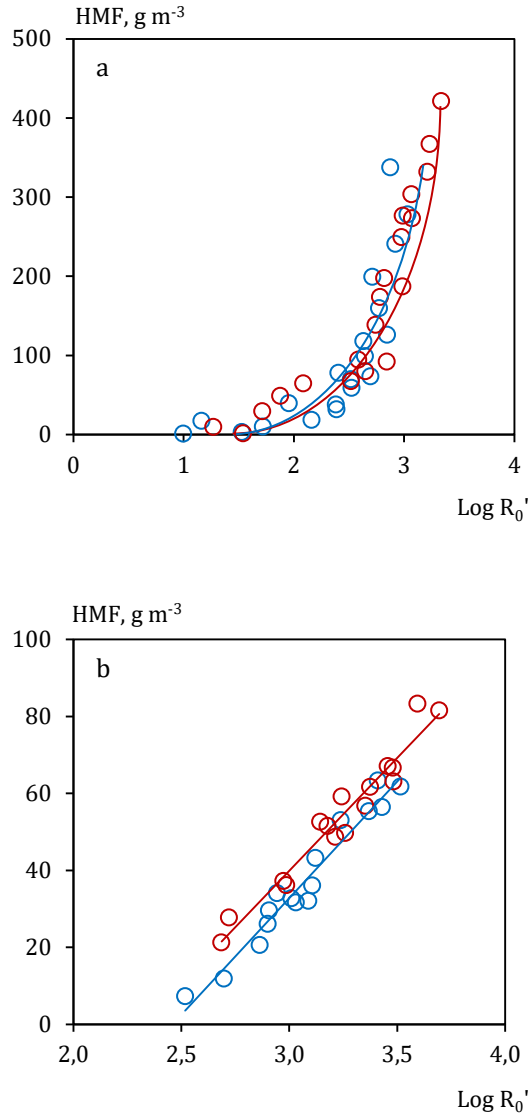


Figura 5.20.a: Generación de HMF en los experimentos realizados con material de poda completo y b: sin hoja, empleando ácido sulfúrico (o) y ácido clorhídrico (o).

5.3. Fermentación

Las levaduras empleadas en este estudio han sido *P. stipitis* y *C. guilliermondii*, ambas con capacidad para fermentar hexosas y pentosas y, producir etanol o etanol junto a xilitol, tal como se ha argumentado en la Introducción de este trabajo.

Se van a estudiar las particularidades de cada levadura al fermentar varios medios de cultivo bajo diferentes condiciones de operación. Los comportamientos de cada microorganismo se han analizado a partir de la determinación de los parámetros cinéticos del crecimiento celular, consumo de monosacáridos y formación de bioproductos. Con estos datos se han calculado los correspondientes rendimientos globales y puntuales, velocidades específicas y productividades másicas y volumétricas referidos a formación de biomasa, consumo de sustrato y generación de bioproductos.

5.3.1. Selección y acondicionamiento de los hidrolizados hemicelulósicos

Tras la realización de los ensayos de hidrólisis, se han obtenido hidrolizados ricos en D-xilosa y D-glucosa, principalmente. Pero a la vez, como se ha venido argumentando, se han producido otros componentes no deseables. Por tal motivo y reiterando lo expuesto en apartados anteriores, la selección del hidrolizado debe ser realizada llegando a un compromiso entre altos rendimientos en monosacáridos y bajos rendimientos en componentes no deseables. Estas dos premisas son las que se han tenido en cuenta para la selección de las condiciones operatorias para la obtención de un hidrolizado hemicelulósico adecuado.

5.3.1.1. Hidrolizado de poda de olivar

Una vez observados y analizados de los resultados obtenidos en el apartado de hidrólisis, se llegó a la conclusión de utilizar, para la obtención del hidrolizado fermentable, las condiciones empleadas en el ensayo HC-S20, con $\text{Log } R_0'$ de 2,88, fijando un tiempo operativo de 240 min, una concentración de H_2SO_4 de 1,0 N y una temperatura de 95 °C. En estas condiciones se obtuvo un perfil en monosacáridos constituido, fundamentalmente, por 2 pentosas y 4 hexosas, Tabla 5.7.

Tabla 5.7: Experimento HC-S20. H₂SO₄ 1 N, T = 95 °C
Idem a Tabla AP2.51 (Apéndice 2)

t, min	Rendimientos, Y (%)						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	Tot
0	2,55	0,22	5,03	0,69	0,03	1,14	9,66
15	2,60	0,69	6,77	1,98	0,03	1,36	13,42
30	3,15	0,66	7,85	2,45	0,07	1,53	15,71
45	3,61	0,75	8,18	3,07	0,09	1,61	17,31
60	3,81	0,33	9,63	3,58	0,11	1,55	19,01
75	4,28	0,83	10,67	4,66	0,12	1,58	22,14
90	4,29	0,96	11,49	5,74	0,13	1,52	24,14
120	4,31	1,27	12,45	6,74	0,15	1,49	26,41
150	4,31	1,34	13,77	7,42	0,19	1,51	28,54
180	4,31	1,50	14,04	8,85	0,23	1,53	30,46
210	4,35	1,52	15,06	9,76	0,23	1,49	32,42
240	4,54	1,57	15,88	9,87	0,24	1,48	33,58

En este ensayo se consigue llegar al 100 % de conversión de hemicelulosa, a tiempo de 240 min, Fig. 5.5.a (Apartado 5.2.2.1). Así mismo, este sería el punto en el que se han conseguido maximizar los rendimientos en azúcares totales, D-glucosa y D-xilosa. Si se atiende a los rendimientos en azúcares totales, D-glucosa y D-xilosa, puede observarse cómo este ensayo se encuentra en un punto que representa al rendimiento más elevado (Fig. 5.7, línea vertical de puntos de color naranja) respecto a los demás experimentos de la serie realizada sobre material de poda completo utilizando H₂SO₄.

En cuanto al contenido en compuestos inhibidores, este ensayo muestra a 240 min unas concentraciones en ácido acético de 3,90 kg m⁻³, 81,34 g m⁻³ de furfural, 337,43 g m⁻³ de HMF y 2,62 kg m⁻³ de CFT. Los umbrales en que estos compuestos son capaces de inhibir el desarrollo celular, se han tratado en el apartado 2.5.5.1.c de la Introducción.

5.3.1.2. Hidrolizado de poda de olivar sin hoja

Tras la discusión de los resultados del proceso de hidrólisis del material de poda sin hoja, se ha considerado como experimento más idóneo el ensayo HSh-S13 que fue realizado en las condiciones de operación de 0,5 N en H₂SO₄, 100 °C y 180 min, con Log R₀' de 3,11. En estas condiciones también se obtuvo un perfil constituido, fundamentalmente, por 6 monosacáridos, Tabla 5.8.

Tabla 5.8: Experimento HSh-S13. H₂SO₄ 0,5 N. T = 100 °C.
Idem a Tabla AP2.88 (Apéndice 2)

t, min	Rendimientos, Y (%)						Tot
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	0,95	0,04	0,76	0,00	n.d.	n.d.	1,74
15	2,24	0,13	2,00	0,27	n.d.	n.d.	4,63
30	2,28	0,22	2,66	1,06	0,02	n.d.	6,23
45	2,20	0,31	3,54	2,56	0,06	n.d.	8,67
60	2,27	0,41	4,56	4,02	0,09	n.d.	11,36
75	3,00	0,60	6,60	7,06	0,18	n.d.	17,38
90	3,92	0,76	8,85	10,74	0,31	n.d.	24,58
120	4,40	1,08	10,00	14,06	0,55	n.d.	30,10
150	4,30	1,10	10,60	16,05	0,80	n.d.	32,85
180	4,28	1,28	11,29	16,03	0,99	n.d.	33,87
210	4,28	1,35	11,12	16,09	1,00	n.d.	33,84
240	4,28	1,48	11,40	16,04	1,18	n.d.	34,38

n.d.: no detectado.

Respecto a la conversión de hemicelulosa, en este ensayo se consigue llegar al 100 % a tiempo de 240 min, Fig. 5.8.a. Se puede pensar que esta conversión se ha alcanzado también a 180 min, hecho que se puede justificar considerando que se calculan rendimientos significativamente similares a los obtenidos al final del experimento. El motivo de seleccionar este tiempo de contacto sólido/líquido se debe a que conllevaría a una menor degradación de monosacáridos disueltos en el licor junto a un ahorro económico y energético global al acortar en 60 min el proceso de hidrólisis.

Si se atiende a los rendimientos en azúcares totales, D-glucosa y D-xilosa, puede observarse cómo este ensayo el que muestra los valores más elevados respecto a los

demás experimentos de la serie realizada sobre material de poda sin hoja utilizando H_2SO_4 , Fig. 5.9 (línea vertical de puntos de color naranja).

En cuanto al contenido en compuestos inhibidores, este ensayo muestra a 240 min unas concentraciones de $3,58 \text{ kg m}^{-3}$ de ácido acético, $35,8 \text{ g m}^{-3}$ de furfural, $36,0 \text{ g m}^{-3}$ de HMF y $2,39 \text{ kg m}^{-3}$ de CFT. Cabe reiterar, como se ha hecho anteriormente, que los datos reportados en bibliografía (Cortez y Roberto (2010), Scordia *et al.* (2012), Pereira *et al.* (2011) o Silva *et al.* (2013)) adquieren especial relevancia respecto al umbral en que los citados compuestos son capaces de inhibir el desarrollo celular, aspecto que ya se ha desarrollado en el apartado 2.5.5.1.c de la Introducción.

Finalmente, a modo de resumen entre los dos hidrolizados tratados, pueden observarse ciertas diferencias, algunas de ellas ya tratadas en el apartado de hidrólisis, como el diferente perfil en monosacáridos, la inversión D-glucosa – D-xilosa o la diferencia entre el contenido en inhibidores.

5.3.1.3. Acondicionamiento de los hidrolizados

El apartado 4.5.4, recoge el procedimiento para la preparación de los hidrolizados hemicelulósicos. La primera etapa de acondicionamiento sería una concentración a vacío del hidrolizado obtenido tras la hidrólisis ya que como se ha señalado en el apartado de introducción, para alcanzar altos rendimientos en bioproductos es de gran importancia comenzar a fermentar concentraciones tan elevadas de azúcares como sea posible de acuerdo con el microorganismo empleado, es decir, sin llegar a producirle inhibición por sustrato, Ikeuchi *et al.* (1999), Mussatto y Roberto (2003) y Mussatto y Roberto (2008). Las concentraciones de partida en monosacáridos, tipo de hidrolizados y microorganismos empleados por algunos autores, pueden consultarse en el apartado 2.5.3 y en el Apéndice 1, en el que se recogen las leyendas extendidas de las Tablas 2.25 y 2.26. Tras esto, la siguiente etapa sería un ajuste de pH (pH inicial del experimento de fermentación), aunque previamente a esta etapa y si es requerido por el microorganismo utilizado, puede realizarse una detoxificación con carbón activo.

A tal efecto, tanto en la Escuela de Ingeniería de Lorena como en la Universidad de Jaén, se llevó a cabo la concentración a vacío de los hidrolizados. Además, en la primera se

realizó la detoxificación del mismo. Puede observarse, Tabla 5.9, cómo tras la concentración a vacío, se consigue aumentar la concentración de monosacáridos hasta 2,7 veces la concentración de partida. En cuanto a los compuestos no deseables, inhibidores, la concentración de ácido acético solo aumenta en 1,3 veces, los fenoles aumentan en 2,3 veces y los furanos aumentan 1,9 veces; lo que significa que se producen pérdidas de los mismos tras el tratamiento, sobre todo de ácido acético, efectos igualmente observados por Canilha *et al.* (2005), Dehkhoda *et al.* (2009) o Mateo *et al.* (2013a). Tras estos resultados se podría concluir que el tratamiento de concentración a vacío conlleva una detoxificación parcial del hidrolizado.

Tabla 5.9: Composición del hidrolizado de poda sin hoja antes y después (en kg m⁻³) de los tratamientos de concentración a vacío y detoxificación con carbón activo.

	H. original	H. concentrado	H. detoxificado
D-xilosa	15,31±0,23	41,23±0,36	36,29±0,24
D-glucosa	10,23±0,17	27,18±0,12	24,24±0,17
L-arabinosa	2,54±0,11	6,6±0,14	5,75±0,09
Ác. Acético	2,96±0,06	3,99±0,17	2,44±0,04
CFT	2,95±0,08	6,94±0,12	1,06±0,02
Furanos	0,28±0,02	0,55±0,03	0,02±0,01

El otro tratamiento referido, se trata de una detoxificación con carbón activo, que se ha realizado siguiendo los trabajos de Mateo *et al.* (2013a), cuyo procedimiento se describe en el apartado 4.5.4. Este tratamiento se ha aplicado debido a la dificultad de la levadura *P. stipitis* para fermentar el hidrolizado de poda sin hoja concentrado, como se verá en los próximos apartados. Puede observarse en la Tabla 5.9, que en comparación al hidrolizado concentrado, este tratamiento conlleva ligeras pérdidas de monosacáridos, cercanas al 10 %, mientras que los compuestos inhibidores se reducen en un 96 % en el caso de los furanos, en un 85 % en el caso de los compuestos fenólicos y en un 39 % respecto al ácido acético. Resultados que están en consonancia con los trabajos de Villareal *et al.* (2006), Kamal *et al.* (2011), Mateo *et al.* (2013a) y Freitas *et al.* (2019). A modo de información cualitativa, la Figura 5.21, recoge la pigmentación del hidrolizado tras la aplicación de los tratamientos realizados.

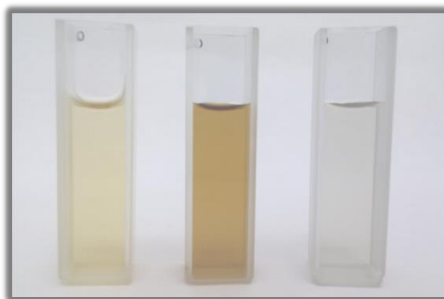


Figura 5.21: Pigmentación del hidrolizado tras hidrólisis (■), concentración a vacío (■) y detoxificación con carbón activo (■).

5.3.2. Selección de la levadura y medio de cultivo

En los laboratorios del Dpto. de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil), se han realizado una serie de experimentos preliminares con objeto de evaluar el comportamiento de las levaduras *P. stipitis* y *C. guilliermondii*, utilizando diferentes medios de cultivo. Posteriormente, tras seleccionar el medio de cultivo más favorable a los objetivos de este trabajo, se ha programado un diseño de experimentos y algunos ensayos complementarios con la idea de ampliar el conocimiento sobre el comportamiento de las levaduras, finalmente se ha escalado la fermentación con *C. guilliermondii* a un biorreactor discontinuo tipo tanque agitado.

En los laboratorios del Dpto. de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén, se han desarrollado una serie de fermentaciones en biorreactor discontinuo tipo tanque agitado variando diferentes parámetros, en vistas a mejorar el proceso de fermentación, y considerando las experiencias previas realizadas en la Escuela de Ingeniería de Lorena.

Los parámetros fermentativos calculados son los siguientes:

a) Producción de biomasa. Se ha estudiado a través de dos parámetros: velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , h^{-1} y la productividad volumétrica en biomasa, b , $kg\ m^{-3}\ h^{-1}$.

La velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , h^{-1} , es el parámetro que define la fase de crecimiento exponencial que tiene lugar tras la fase en la que el microorganismo

adapta sus sistemas enzimáticos para metabolizar el sustrato, la denominada fase de latencia o *lag*, que puede durar más o menos tiempo en función de características asociadas al medio de cultivo y a la propia biomasa.

La fase de crecimiento exponencial, Figura 5.22, se puede describir y cuantificar usando la ecuación 5.9, donde x_1 , representa la concentración de biomasa al inicio de esta fase (valor no conocido). Si se toman logaritmos, la ec. 5.9 se expresa como indica la expresión 5.10, pudiendo ser representada gráficamente a partir de la ecuación 5.11, cuya modificación está ampliamente aceptada y en la que se sustituye el término x_1 , por la concentración inicial de inóculo, x_0 (valor conocido y que provoca que la ordenada en el origen, a , sea distinta de cero).

$$x = x_1 e^{\mu_m t} \quad (5.9)$$

$$\ln \frac{x}{x_1} = \mu_m t \quad (5.10)$$

$$\ln \frac{x}{x_0} = a + \mu_m t \quad (5.11)$$

Tras la fase exponencial, la velocidad de crecimiento se ralentiza y comienza la fase de desaceleración. Se ha observado que en esta fase la concentración de biomasa aumenta de forma lineal con el tiempo. Este hecho puede ser debido a una limitación de carácter físico tal como se ha justificado en estudios previos, donde se indica que el control cinético del proceso de fermentación está en la transferencia de oxígeno en el biorreactor, Sánchez *et al.* (2002). Esta etapa puede definirse según la ecuación 5.12, a través del parámetro, b , que representa la productividad volumétrica en biomasa ($\text{kg m}^{-3} \text{h}^{-1}$).

$$x = c + b t \quad (5.12)$$

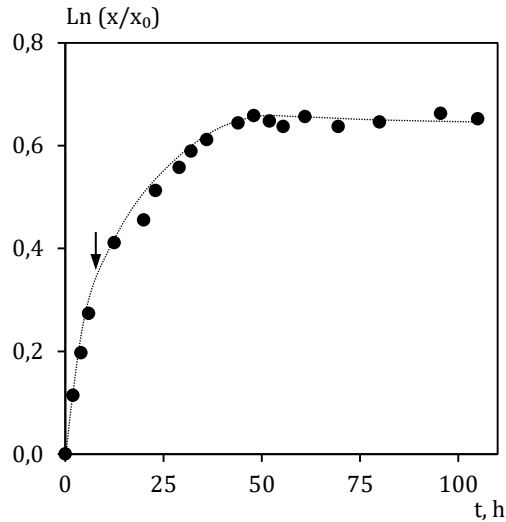


Figura 5.22: Curva de crecimiento celular (●) en el experimento realizado con *C. guilliermondii*, utilizando hidrolizado de poda sin hoja en las siguientes condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$, $A = 500 \text{ rpm}$, $\text{AE} = 0,15 \text{ vvm}$.

La etapa siguiente, fase estacionaria, puede estar relacionada con varios aspectos, como puede ser un metabolismo endógeno en el que el microorganismo, por falta de sustrato o nutrientes vitales, asimila su propio citoplasma con objeto de mantenerse con vida. Por otro lado, puede darse un aumento de algún componente inhibidor o tóxico que retarde o detenga el desarrollo celular y, por último, que ciertos microorganismos sufran lisis y los componentes liberados sean utilizados por células vivas para mantenerse. En todo caso, el periodo de tiempo en que esta etapa está activa es reducido, ya que acaba siendo insostenible; dando paso a una etapa final de muerte, donde el balance entre generación y muerte celular, si inclina hacia esta última.

b) Consumo de sustrato. A partir de los resultados obtenidos se han calculado los parámetros: velocidad específica de consumo de sustrato, q_s , de D-glucosa, $q_{D\text{-}glu}$, de D-xilosa, $q_{D\text{-}xil}$, $\text{kg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y, los rendimientos instantáneos, $Y_{x/s}$, kg kg^{-1} y global en biomasa, $Y_{x/s}^G$, kg kg^{-1} .

El parámetro q_s , viene definido por la ecuación 5.13, y para su cálculo se ha empleado el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos. De tal forma, que para su determinación directa se debe evaluar la velocidad de consumo de sustrato por unidad de

volumen, que correspondería a la tasa volumétrica de consumo de sustrato ($d(s_0-s)/dt$), a cada tiempo y, tras esto, dividir por la concentración de biomasa.

$$q_s = \frac{1}{x} \frac{d(s_0 - s)}{dt} \quad (5.13)$$

El inconveniente en la resolución de la ec. 5.13 está en la evaluación de la derivada y, aunque se podría acudir al método gráfico, esto conllevaría una baja precisión y dificultad de aplicar cuando se dispone de pocos datos experimentales. Por tanto, se decide realizar un ajuste empírico de estos datos usando una ecuación que muestre la variación de la concentración de sustrato con el tiempo y tras esto, determinar analíticamente la derivada.

Las fermentaciones discontinuas muestran, en general, un consumo de sustrato inicial lento, seguido de una etapa de consumo de sustrato acelerado que perdura hasta el agotamiento de este, y da paso a una nueva ralentización. Este hecho resulta un inconveniente para ajustar todo el intervalo de tiempo mediante ecuaciones simples.

En este trabajo, se ha optado por aplicar la ecuación 5.14, que, aunque conlleva cierta complejidad, permite obtener una alta reproducibilidad de los datos $s-t$. Esta ecuación cumple con la condición inicial de que para $t = 0 \rightarrow s = s_0$.

$$s = s_0 \alpha^{-t^\beta} \quad (5.14)$$

Para la evaluación de los parámetros α y β se puede linealizar la ec. 5.14, quedando como muestra la ecuación 5.15, que permite aplicar el método de mínimos cuadrados. A modo de ejemplo, para visualizar este ajuste, se muestra la Figura 5.23, donde se representa la ec. 5.15.

$$\text{Ln} \left(\text{Ln} \frac{s_0}{s} \right) = \text{Ln}(\text{Ln} \alpha) + \beta \text{Ln} t \quad (5.15)$$

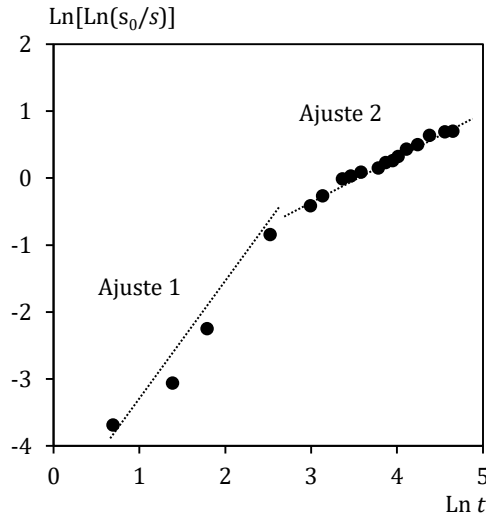


Figura 5.23: Ajuste de los resultados experimentales de sustrato residual (●) para el experimento realizado con *C. guilliermondii* en biorreactor de bancada. Se ha utilizado un hidrolizado de poda sin hoja en las siguientes condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$, $A = 500 \text{ rpm}$, $\text{AE} = 0,15 \text{ vvm}$.

En general todos los experimentos de fermentación muestran dos zonas lineales correspondientes a los consumos secuenciales de D-glucosa (ajuste 1) y D-xilosa (ajuste 2), Fig. 5.23. Por lo que existen dos zonas diferenciadas o dos tipos de velocidades específicas de consumo de sustrato, $q_{D\text{-glu}}$, y $q_{D\text{-xil}}$, hecho relevante que se ha tenido en cuenta a la hora de realizar los cálculos.

Partiendo de la ec. 5.14, se ha determinado analíticamente la derivada $d(s_0-s)/dt$ y al sustituir en la ec. 5.13, se obtiene la expresión para la velocidad específica de consumo de sustrato en función del tiempo, ecuación 5.16.

$$q_s = \frac{s_0 \beta (\text{Ln } \alpha)(t^{\beta-1})(\alpha^{-t^\beta})}{x} \quad (5.16)$$

Por otro lado, a partir del rendimiento instantáneo en biomasa, $Y_{x/s}$, definido por el cociente entre la producción neta de biomasa y consumo neto de sustrato, ecuación (5.17), puede obtenerse el rendimiento global en biomasa, $Y_{x/s}^G$. Este corresponde a la pendiente de la recta que surge cuando se representan los datos $(x-x_0)$ vs (s_0-s) y corresponde al rendimiento de todo el experimento. Aunque esto sería válido solo en

caso de que el rendimiento instantáneo sea constante, de manera que la línea obtenida al representar dichos datos tendría ordenada en el origen nula, aunque también sería efectivo si esta es distinta de cero. Este aspecto, Figura 5.24, se ha comprobado en todos los experimentos de fermentación obteniendo resultados aceptables.

$$Y_{x/s} = \frac{dx}{d(s_0 - s)} \quad (5.17)$$

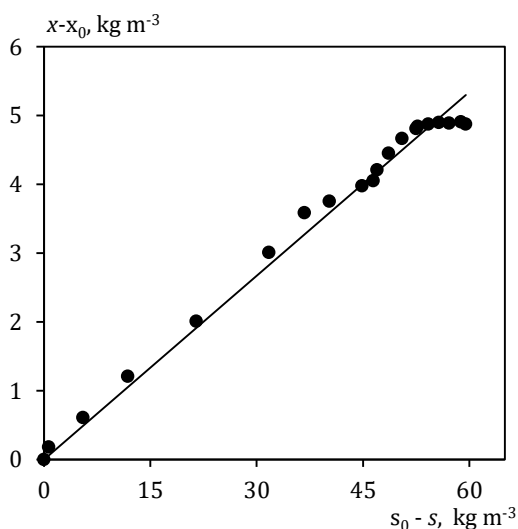


Figura 5.24: Rendimiento en biomasa (●) del experimento realizado con *C. guilliermondii* en biorreactor de bancada, utilizando hidrolizado de poda sin hoja en las siguientes condiciones: $x_0 = 0,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$, $A = 500 \text{ rpm}$, $AE = 0,3 \text{ vvm}$.

c) Formación de bioproductos. Los principales productos de fermentación son etanol y xilitol. Para la correcta discusión de los resultados obtenidos, se han calculado los siguientes parámetros: velocidades específicas de producción de etanol q_E , y xilitol q_{Xi} , $\text{kg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y rendimientos en etanol, $Y_{E/s}$, y xilitol $Y_{Xi/s}$, kg kg^{-1} .

El cálculo de q_E , $\text{kg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, ecuación 5.18, se ha realizado al igual que para q_s , utilizando el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos. Este método conlleva los mismos inconvenientes que el cálculo de q_s , por lo que se realiza un ajuste empírico de los datos $E-t$ de cada fermentación, para determinar analíticamente la derivada dE/dt , siendo la ecuación 5.19, la que mejor reproduce las variaciones experimentales observadas.

$$q_E = \frac{1}{x} \frac{dE}{dt} \quad (5.18)$$

$$\frac{E}{E_T} = Z e^{-B/t} \quad (5.19)$$

Donde E_T , representa la concentración máxima alcanzable si el rendimiento de la transformación de sustrato (D-xilosa y D-glucosa) fuese teórico, quedando definido por la ecuación 5.20, donde el parámetro τ equivale a 2 si el sustrato es D-glucosa y 5/3 si es D-xilosa.

$$E_T = s_0 \tau \frac{P_m(\text{etanol})}{P_m(\text{xilitol})} \quad (5.20)$$

Los parámetros Z y B , se pueden determinar si se linealiza la ecuación 5.19, que cumple con la condición de que para $t = 0 \rightarrow E = 0$. De esto resultaría la nueva ecuación 5.21.

$$\ln \frac{E}{E_T} = \ln Z - B \frac{1}{t} \quad (5.21)$$

Finalmente, a partir de la ecuación 5.19 se puede resolver analíticamente la derivada dE/dt , por sustitución en la ecuación 5.18, resultando la ecuación 5.22. Donde x , representa la concentración de biomasa a tiempo t .

$$q_E = \frac{E_T Z B e^{-B/t}}{x t^2} \quad (5.22)$$

El segundo parámetro calculado es el rendimiento instantáneo en etanol, $Y_{E/s}$, ecuación 5.23. Si $Y_{E/s}$, permanece constante a lo largo del experimento, la representación de los datos E vs $(s_0 - s)$ podría conducir a una línea recta en la que la pendiente correspondería al rendimiento global de todo el ensayo, $Y_{E/s}^G$. Cabe indicar que el primer paso a la hora de obtener el rendimiento global en etanol sería comprobar que el rendimiento instantáneo permanece constante. Esto se ha hecho en todos los casos, obteniendo resultados aceptables, Figura 5.25.

$$Y_{E/s} = \frac{dE}{d(s_0 - s)} \quad (5.23)$$

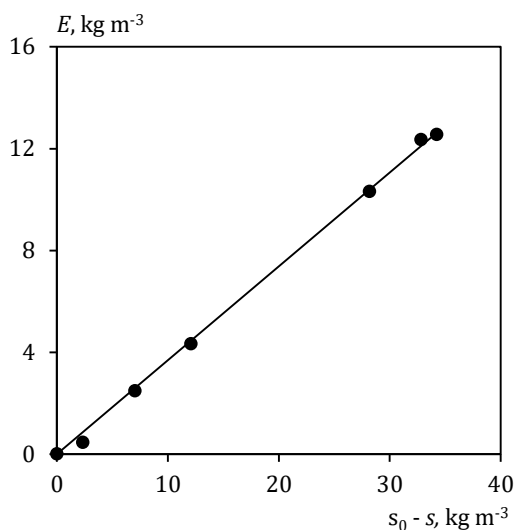


Figura 5.25: Rendimiento en etanol (●). Experimento realizado con *C. guilliermondii* en biorreactor de bancada, utilizando hidrolizado de poda sin hoja en las siguientes condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$, $A = 500 \text{ rpm}$, $AE = 0,3 \text{ vvm}$.

Para calcular la velocidad específica de producción de xilitol, q_{Xi} , ecuación 5.24, se ha aplicado el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos, al igual que para q_E y q_s . En consonancia con los anteriores cálculos, el inconveniente se presenta a la hora de evaluar la velocidad de producción de xilitol por unidad de volumen, dXi/dt . Por lo que, al igual que en los casos anteriores, se opta por la realización de un ajuste empírico de los datos $Xi-t$ que permita determinar analíticamente la derivada.

$$q_{Xi} = \frac{1}{x} \frac{dXi}{dt} \quad (5.24)$$

La variación observada al representar los datos Xi vs t , permite realizar un ajuste lineal de estos, ecuación 5.25. De esta forma se obtiene el valor de los parámetros G y R mediante ajustes por mínimos cuadrados de los valores de concentración de xilitol frente al tiempo, como se representa, a modo de ejemplo, en la Figura 5.26.

$$X_i = G t + R \quad (5.25)$$

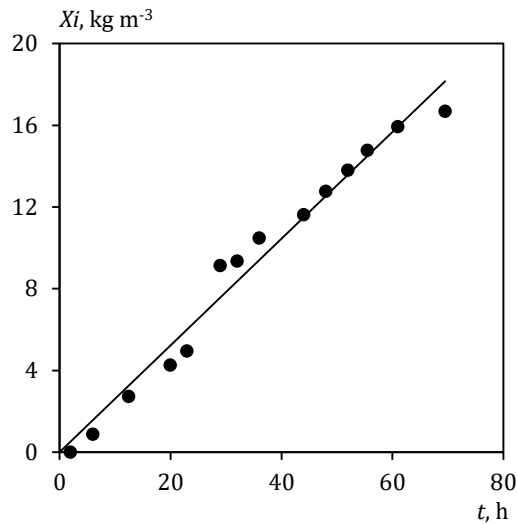


Figura 5.26: Ajuste de la concentración de xilitol con el tiempo (●), ecuación 5.25. Experimento realizado con *C. guilliermondii* en biorreactor de bancada, utilizando hidrolizado de poda sin hoja en las siguientes condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$, $A = 500 \text{ rpm}$, $\text{AE} = 0,3 \text{ vvm}$.

La determinación analítica de la derivada dX_i/dt , se ha realizado mediante la ecuación 5.25, que permite sustituir en la ecuación 5.24 para obtener la expresión que define de nuevo q_{xi} , ecuación 5.26.

$$q_{xi} = \frac{G}{x} \quad (5.26)$$

El siguiente parámetro a determinar sería el rendimiento instantáneo en xilitol, $Y_{xi/s}$, ecuación 5.27, que si permanece constante a lo largo del experimento, hecho comprobado y aceptado (Figura 5.27), la pendiente resultante de la representación de los datos x_i vs $(s_0 - s)$ representará el rendimiento global de todo el proceso, $Y_{E/s}^G$.

$$Y_{xi/s} = \frac{dX_i}{d(s_0 - s)} \quad (5.27)$$

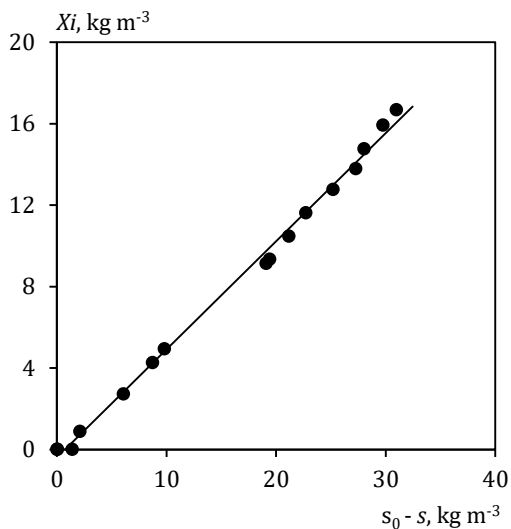


Figura 5.27: Rendimiento en xilitol (●). Experimento realizado con *C. guilliermondii* en biorreactor de bancada, utilizando hidrolizado de poda sin hoja en las siguientes condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$, $A = 500 \text{ rpm}$, $AE = 0,3 \text{ vvm}$.

En los experimentos realizados en Erlenmeyer, no ha sido posible el cálculo de las velocidades específicas q_E o q_{X_i} . Se ha optado por determinar la productividad volumétrica instantánea en bioproductos: Q_E o Q_{X_i} ($\text{kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$), ecuación 5.28 y 5.29.

$$Q_E = \frac{\Delta_E}{\Delta_t} \quad (5.28)$$

$$Q_{X_i} = \frac{\Delta_{X_i}}{\Delta_t} \quad (5.29)$$

donde Δ_E y Δ_{X_i} , corresponden a la diferencia entre la concentración inicial de bioproducto a tiempo t , kg m^{-3} , y Δt , la diferencia entre el tiempo inicial y final considerado (h).

5.3.2.1. *Candida guilliermondii*

Este apartado recoge los resultados obtenidos de las fermentaciones realizadas con *C. guilliermondii*, en la Escuela de Ingeniería de Lorena. Se tratan de una serie de fermentaciones preliminares, ensayos siguiendo un diseño experimental, una serie de experimentos complementarios y, por último, un proceso en biorreactor discontinuo tipo tanque agitado.

a) Fermentaciones preliminares. Esta serie de fermentaciones realizadas en Erlenmeyer, Tabla 5.10, tienen como objetivo realizar una primera aproximación al comportamiento de la levadura frente a diferentes medios de cultivo. Se ha fermentado hidrolizado de poda sin hoja sin adición de nutrientes (*Cg-H*), hidrolizado de poda sin hoja con adición de nutrientes propuestos por Roberto *et al.* (1994) (*Cg-HR*), hidrolizado sin hoja con adición de nutrientes propuestos por Lindegren *et al.* (1958) al 50 % según Cuevas (2007) (*Cg-HL*) y otros dos experimentos en un medio sintético elaborado con la misma concentración de azúcares del hidrolizado sin hoja; estos dos últimos ensayos están constituidos por medio sintético con adición nutrientes propuestos por Roberto *et al.* (1994) (*Cg-SR*), y medio sintético con adición de nutrientes según Lindegren *et al.* (1958) al 50 %, Cuevas (2007) (*Cg-SL*). En los cinco casos, la concentración inicial de inóculo ha sido de $1,5 \text{ kg m}^{-3}$, temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, pH igual a 5 y vórtice (ω) de 0,4.

Tabla 5.10: Parámetros de las fermentaciones preliminares con *C. guilliermondii*, obtenidos a partir de los datos que se encuentran en el Apéndice 3.

X ₀ = 1,5 kg m ⁻³ T = 30 °C pH = 5 A = 200 rpm ω = 0,4 Material: poda sin hoja					
Experimento	<i>Cg-H</i>	<i>Cg-HR</i>	<i>Cg-HL</i>	<i>Cg-SR</i>	<i>Cg-SL</i>
Y ^G _{x/s} , kg kg ⁻¹	-	0,05±0,01	0,06±0,01	0,10±0,01	0,09±0,01
Y ^G _{x/s+Ac} , kg kg ⁻¹	-	0,05±0,01	0,06±0,01	-	-
Y ^G _{E/s} , kg kg ⁻¹	-	0,33±0,01	0,36±0,01	0,19±0,01 ¹⁶	0,38±0,01
E _{max} , kg m ⁻³	-	15,09±0,01 ⁸⁸	18,42±0,18 ⁸⁸	6,16±0,03 ⁴⁰	15,18±0,05 ⁴⁰
Q _E , kg m ⁻³ h ⁻¹	-	0,17±0,01 ⁶⁴	0,24±0,01 ⁶⁴	0,32±0,01 ¹⁶	0,57±0,01 ¹⁶
Y ^G _{Xi/s} , kg kg ⁻¹	-	0,25±0,01	0,39±0,01	0,56±0,01	0,40±0,01
Xi _{max} , kg m ⁻³	-	7,98±0,01 ¹¹²	10,84±0,17 ⁸⁸	24,99±0,31 ⁶⁴	13,74±0,02 ⁸⁸
Q _{Xi} , kg m ⁻³ h ⁻¹	-	0,07±0,01 ⁶⁴	0,12±0,01 ⁸⁸	0,54±0,01 ⁴⁰	0,19±0,01 ⁶⁴

Los superíndices indican tiempo (h). Valores de r² > 0,953 en todos los ajustes.

C. guilliermondii es incapaz de fermentar el hidrolizado de poda sin hoja sin la adición de nutrientes (*Cg-H*), Tabla 5.10, efecto que se revierte en los experimentos *Cg-HR* y *Cg-HL*, ya que al componer un medio de cultivo formado por hidrolizado y nutrientes añadidos, sí se consigue que la levadura se desarrolle, consuma el sustrato y genere bioproductos. Ahora bien, en cuanto a estos dos últimos experimentos, y observando conjuntamente los dos restantes realizados con medio sintético (*Cg-SR* y *Cg-SL*), puede verse como el medio suplementado con nutrientes reportados por Lindegren *et al.* (1958) al 50 %, Cuevas (2007), ofrecen los mejores resultados fermentativos; se alcanzan rendimientos globales en etanol y xilitol de 0,36 kg kg⁻¹ y 0,39 kg kg⁻¹ respectivamente, en el caso del experimento *Cg-HL* y, 0,38 kg kg⁻¹ y 0,40 kg kg⁻¹ respectivamente, en el caso del ensayo *Cg-SL*. El rendimiento en etanol en el experimento *Cg-HL*, está acorde con los resultados obtenidos por Mateo (2011), sin embargo, los rendimientos en xilitol reportados por esta autora son menores. En este sentido, el rendimiento en xilitol estaría más cerca de los obtenidos por Rao *et al.* (2006). Si se atiende a la productividad volumétrica en bioproductos, puede observarse como el valor más elevado corresponde a los experimentos realizados en medio sintético, siendo mayor Q_{Xi} , en el experimento *Cg-SR* y Q_E , en el experimento en el experimento *Cg-SL*. Los rendimientos en biomasa son mayores en los experimentos en medio sintético, del orden del doble, efecto observado también por Fonseca (2014).

Finalmente, exponer que los resultados obtenidos por adición de nutrientes propuestos por Lindegren *et al.* (1958), o la modificación de estos realizada por Cuevas (2007), son los más extendidos en las fermentaciones de hidrolizados de poda de olivo u otros subproductos de olivar, Moya (1997), García (2007), Cuevas *et al.* (2009), Mateo *et al.* (2015) o Moya *et al.* (2016).

b) Fermentaciones considerando un diseño de experimentos. La realización de las fermentaciones analizadas en el apartado anterior conllevan a la elección del medio nutricional más efectivo para la consecución de los objetivos que se persiguen en este trabajo. Para tal efecto, se ha considerado suplementar los hidrolizados proveniente de poda de olivar sin hoja con los nutrientes reportados por Lindegren *et al.* (1958) al 50 %, Cuevas (2007). Para llevarlo a cabo, se plantea un diseño de 11 experimentos (ver apéndice 3), en Erlenmeyer, donde intervienen 3 factores a 3 niveles: x_0 (concentración inicial de biomasa, 0,5, 1,5, 2,5 kg m⁻³), ω (vórtice, volumen medio/volumen Erlenmeyer,

0,2, 0,4, 0,6), T (temperatura, 25, 30 y 35 °C). El pH fue de 5 y la agitación de 200 rpm en todos los experimentos, Tabla 5.11.

Tabla 5.11: Diseño de experimentos con *C. guilliermondii*.

Expto.	X_0 , kg m ⁻³	ω	T, °C
Cg-1	-1	-1	-1
Cg-2	1	-1	-1
Cg-3	-1	1	-1
Cg-4	1	1	-1
Cg-5	-1	-1	1
Cg-6	1	-1	1
Cg-7	-1	1	1
Cg-8	1	1	1
Cg-9	0	0	0
Cg-10	0	0	0
Cg-11	0	0	0

La realización de estos experimentos no fue satisfactoria de cara al análisis estadístico de los datos debido a que en ciertos experimentos no hubo fermentación. Concretamente, los realizados a 35 °C. Por tal motivo, no se han indicado en la Tabla 5.12, donde se recogen los parámetros de los demás ensayos en los que interactúan los factores concentración inicial de inóculo en sus tres niveles, el factor de aeración en sus tres niveles y, por último, el nivel temperatura, solo en dos de los niveles prefijados.

Inicialmente, cabe destacar que los rendimientos globales en biomasa oscilan en el rango 0,07 a 0,11 kg kg⁻¹ y con resultados muy próximos si el ácido acético es considerado como sustrato junto con los azúcares. Desde el punto de vista de fermentación etanólica estos valores de $Y_{x/s}$, próximos a 0,10 kg⁻¹ kg⁻¹, son muy favorables para realizar un bioproceso eficiente.

Los rendimientos globales en etanol varían entre 0,22 y 0,36 kg kg⁻¹, estando de acuerdo a la bibliografía, Pessani *et al.* (2011) o Hickert *et al.* (2013), Tabla 5.12, obteniendo buenos ajustes en todos los casos. El mayor rendimiento, y concentración máxima de etanol, se obtienen en el experimento Cg-E9 a Cg-E11, que correspondería a los niveles centrales de los factores: $x_0 = 1,5$ kg m⁻³, $\omega = 0,4$ y T = 30 °C. Los restantes

experimentos corresponden a una temperatura de 25 °C y variaciones en los factores x_0 (0,5 y 2,5 kg m⁻³) y ω (0,2 y 0,6). El rendimiento global en xilitol y concentración puntual más elevados también corresponden a los valores centrales de los factores implicados, lo contrario que sucede con los rendimientos globales en biomasa. Es lógico pensar que cuando el sustrato se invierte en formar biomasa la generación de producto es menor. Este hecho está plenamente justificado en estos experimentos que se han llevado a cabo, donde se observa que los rendimientos globales en etanol y xilitol más elevados coinciden con los menores rendimientos globales en biomasa. Los valores de Q_E y Q_{Xi} , son también más elevados en los experimentos Cg-E9 a Cg-E11.

Tabla 5.12: Parámetros de las fermentaciones realizadas considerando un diseño de experimentos con *C. guilliermondii*, obtenidos a partir de los datos que se encuentran en el Apéndice 3.

Experimento	Cg-E1	Cg-E2	Cg-E3	Cg-E4	Cg-E9 a Cg-E11
$Y_{x/s}^G$, kg kg ⁻¹	0,11±0,01	0,10±0,01	0,08±0,01	0,07±0,01	0,07±0,01
$Y_{x/s+Ac}^G$, kg kg ⁻¹	0,10±0,01	0,10±0,01	0,08±0,01	0,07±0,01	0,07±0,01
$Y_{E/s}^G$, kg kg ⁻¹	0,22±0,01	0,25±0,01	0,27±0,01	0,33±0,01	0,36±0,01
E_{max} , kg m ⁻³	8,68±0,31 ¹⁴⁴	8,08±0,06 ¹²⁰	10,19±0,3253 ¹⁴⁴	10,17±0,74 ¹²⁰	12,94±0,07 ⁹⁶
Q_E , kg m ⁻³ h ⁻¹	0,06±0,01 ¹⁴⁴	0,07±0,01 ¹²⁰	0,06±0,01 ¹⁶⁸	0,10±0,01 ⁹⁶	0,14±0,01 ⁷²
$Y_{Xi/s}^G$, kg kg ⁻¹	0,23±0,01	0,26±0,01	0,35±0,01	0,36±0,02	0,38±0,02
Xi_{max} , kg m ⁻³	7,38±0,08 ¹⁶⁸	7,88±0,13 ¹⁶⁸	7,69±0,33 ¹⁹²	8,15±0,05 ¹⁶⁸	9,15±0,34 ¹⁴⁴
Q_{Xi} , kg m ⁻³ h ⁻¹	0,04±0,01 ¹⁶⁸	0,05±0,01 ¹⁶⁸	0,04±0,01 ¹⁹²	0,06±0,01 ¹⁴⁴	0,07±0,01 ¹²⁰

Los superíndices indican tiempo (h). Valores de $r^2 > 0,958$ en todos los ajustes.

d) Fermentaciones complementarias modificando la concentración inicial de inóculo. Diversos autores señalan la necesidad de comenzar el proceso de fermentación utilizando una alta concentración de células, Roberto *et al.* (1995), Agbogbo *et al.* (2007), Mateo (2011) o Fonseca (2014). En este trabajo y debido a inconveniente surgido con el diseño de experimentos, se plantea la realización de fermentaciones complementarias en Erlenmeyer con objeto de obtener mayores conocimientos sobre el comportamiento de *C. guilliermondii*. Los códigos con lo que se nombra a cada experimento serían, en primer lugar 'Cg' (que hace referencia a *C. guilliermondii*), seguido de la concentración inicial de inóculo y finalmente el valor de pH.

Se plantean un total de 5 experimentos, Tabla 5.13. En los tres primeros la concentración inicial de inóculo varía entre 1,5 y 3,5 kg m⁻³ (pH = 5,5) y en los dos restantes varía entre 1,5 y 2,5 kg m⁻³ (pH = 6). La elección de estos parámetros se hace de acuerdo a bibliografía consultada, Tabla 2.25. Se han fermentado hidrolizados provenientes de poda de olivar sin hoja suplementados con los nutrientes reportados por Lindegren *et al.* (1958) al 50 %, Cuevas (2007).

Respecto a los rendimientos en biomasa es destacable cómo son menores al aplicar pH 5,5 frente a pH 6,0. Y si se observa específicamente la serie realizada a pH 5,5, disminuye al aumentar la concentración inicial de inóculo, Tabla 5.13.

Atendiendo al rendimiento en bioproductos, los valores más elevados se obtienen al emplear $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$ y pH = 5,5, experimento Cg-2,5-5,5. Los referidos a etanol están de acuerdo a otros autores, al emplear microorganismos como *C. tropicalis* (Mateo, 2011); sin embargo, los de xilitol son, en general, más bajos que los reportados por otros autores, Mussatto *et al.* (2005) o Pereira *et al.* (2011), aunque en consonancia con los publicados por Schirmer-Michel *et al.* (2009) o Castro *et al.* (2013). Los valores de concentración puntual máxima de etanol se obtienen en todos los casos (menos en el cultivo Cg-1,5-6,0) a las 48 h de experimento, mientras que en el caso del xilitol hay más variación, encontrando el tiempo más corto (48 h) en el experimento Cg-2,5-6,0. Las productividades volumétricas de los experimentos son mayores para etanol, Q_E , que para xilitol Q_{X_i} , siendo el valor más elevado, 0,57 kg m⁻³ h⁻¹, el obtenido en el cultivo Cg-2,5-5,5, Tabla 5.13.

Tabla 5.13: Fermentaciones complementarias *C. guilliermondii* modificando la concentración de inóculo.

T = 30 °C	A = 200 rpm		$\omega = 0,4$	Material: poda sin hoja	
Experimento	<i>Cg-1,5-5,5</i>	<i>Cg-2,5-5,5</i>	<i>Cg-3,5-5,5</i>	<i>Cg-1,5-6,0</i>	<i>Cg-2,5-6,0</i>
$Y_{x/s}^G$, kg kg ⁻¹	0,07±0,01	0,06±0,01	0,05±0,01	0,09±0,01	0,08±0,01
$Y_{x/s+Ac}^G$, kg kg ⁻¹	0,07±0,01	0,06±0,01	0,05±0,01	0,09±0,01	0,08±0,01
$Y_{E/s}^G$, kg kg ⁻¹	0,35±0,01	0,38±0,01	0,32±0,01	0,28±0,01	0,29±0,01
E_{max} , kg m ⁻³	13,88±0,23 ⁴⁸	14,91±0,12 ⁴⁸	14,52±0,11 ⁴⁸	11,38±0,49 ⁹⁶	14,62±0,01 ⁴⁸
Q_E , kg m ⁻³ h ⁻¹	0,53±0,01 ²⁴	0,57±0,01 ²⁴	0,48±0,01 ²⁴	0,15±0,01 ⁷²	0,51±0,01 ²⁴
$Y_{xi/s}^G$, kg kg ⁻¹	0,44±0,01	0,46±0,02	0,34±0,01	0,27±0,01	0,25±0,01
Xi_{max} , kg m ⁻³	8,21±0,03 ⁷²	8,11±0,11 ⁴⁸	8,43±0,13 ⁷²	8,07±0,16 ¹⁴⁴	7,47±0,21 ⁷²
Q_{xi} , kg m ⁻³ h ⁻¹	0,17±0,01 ⁴⁸	0,17±0,01 ²⁴	0,17±0,01 ⁴⁸	0,06±0,01 ¹⁴⁴	0,15±0,01 ⁴⁸

Los superíndices indican tiempo (h). Valores de $r^2 > 0,926$ en todos los ajustes.

d) Fermentaciones complementarias modificando el pH. Los códigos con lo que se nombra a cada experimento serían en primer lugar 'Cg' (que hace referencia a *C. guilliermondii*), seguido de la concentración inicial de inóculo y finalmente el valor de pH.

El rango de pH inicial utilizado por los autores consultados no es muy amplio, suele variar entre 5,5 y 6,5, ver Tabla 2,25. En este caso, se ha querido constatar los valores reportados, encontrando cómo los resultados más idóneos se obtienen entre pH 5,0 y 6,0, y que no sería efectivo situar el pH inicial del medio por debajo de estos valores, ya que, a pH 3 o incluso 4, el proceso fermentativo, en el caso de este estudio, no se activa, Tabla 5.14. El experimento más ventajoso de esta serie realizada en Erlenmeyer sería el realizado a pH 5,0 (cultivo *Cg-1,5-5,0*).

Tabla 5.14: Fermentaciones complementarias con *C. guilliermondii* modificando el pH.

T = 30 °C A = 200 rpm $\omega = 0,4$ Material: poda sin hoja				
Experimento	Cg-1,5-3,0	Cg-1,5-4,0	Cg-1,5-5,0	Cg-1,5-6,0
$Y_{X/s}^G, \text{kg kg}^{-1}$	-	-	0,06±0,01	0,09±0,01
$Y_{X/s+Ac}^G, \text{kg kg}^{-1}$	-	-	0,06±0,01	0,09±0,01
$Y_{E/s}^G, \text{kg kg}^{-1}$	-	-	0,36±0,01	0,28±0,01
$E_{max}, \text{kg m}^{-3}$	-	-	18,42±0,18 ¹⁴⁴	11,38±0,49 ⁹⁶
$Q_E, \text{kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$	-	-	0,14±0,01 ⁹⁶	0,15±0,01 ⁷²
$Y_{Xl/s}^G, \text{kg kg}^{-1}$	-	-	0,39±0,01	0,27±0,01
$X_{lmax}, \text{kg m}^{-3}$	-	-	10,84±0,17 ¹⁶⁸	8,07±0,16 ¹⁴⁴
$Q_{Xl}, \text{kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$	-	-	0,07±0,01 ¹⁶⁸	0,06±0,01 ¹⁴⁴

Los superíndices indican tiempo (h). Valores de $r^2 > 0,938$ en todos los ajustes.

A partir de los resultados indicados en las Tablas 5.13 y 5.14, se puede deducir que las mejores condiciones experimentales para la fermentación de material de poda de olivo sin hoja, bajo las condiciones de hidrólisis dadas, serían: concentración inicial de inóculo de 2,5 kg m⁻³, temperatura de cultivo 30 °C, relación volumen del medio/volumen del matraz Erlenmeyer de 0,4 y pH de 5,5. Valores todos dentro de los rangos dados en bibliografía (Tabla 2.25).

e) Fermentación en biorreactor discontinuo tipo tanque agitado. Ensayo realizado en los laboratorios de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil). Una vez realizadas las fermentaciones en Erlenmeyer, con las que se ha conseguido conocer el comportamiento de la levadura respecto al hidrolizado de poda sin hoja, se decide elevar el volumen de cultivo a un biorreactor de bancada B. Braun Biotech International, mod. Biostat B (descrito en apartado 4.2.3.2). Las condiciones del proceso han sido: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, T = 30 °C, pH = 5,5, AE = 0,4 vvm, A = 350 rpm, $K_{La} = 17 \text{ h}^{-1}$ (apartado AP3.1.5, apéndice 3).

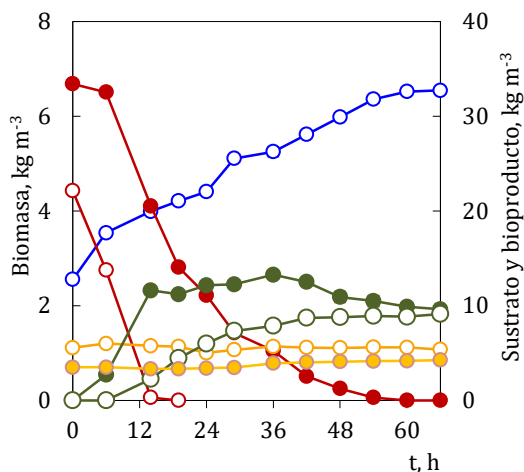


Figura 5.28: Fermentación en biorreactor discontinuo B. Braun Biotech International, modelo Biostat B. *C. guilliermondii*. Biomasa (○), D-xilosa (●), D-glucosa (○), L-arabinosa (○), etanol (●), xilitol (○) y ácido acético (●).

Respecto al comportamiento de la biomasa, no se apreció fase de adaptación, y una fase exponencial de muy corta duración que no ha sido posible establecer. Hecho, que puede deberse a la falta de puntos de muestreo en las primeras horas del experimento, Figura 5.28. Sí puede observarse un crecimiento rápido en las primeras 6 h del experimento, que duraría hasta las 12 h, coincidiendo con el consumo total de D-glucosa. Si se atiende a las velocidades específicas de consumo de sustrato a diferentes tiempos, Tabla 5.15, puede verse cómo va descendiendo desde las primeras horas de ensayo, con una productividad volumétrica y rendimiento en biomasa de $0,06 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, y $0,06 \text{ kg kg}^{-1}$. Estos parámetros están de acuerdo con los obtenidos por García (2007) y Mateo (2011), empleando *C. tropicalis* y *D. hansenii*.

La concentración inicial en monosacáridos es de $33,44 \text{ kg m}^{-3}$ de D-xilosa, $22,14 \text{ kg m}^{-3}$ de D-glucosa y $5,57 \text{ kg m}^{-3}$ de L-arabinosa, Figura 5.28. Se aprecia un consumo cuasi secuencial de los dos azúcares principales, tal como describen Kim *et al.* (2002). Solo hasta que se acerca el consumo total de D-glucosa, no comienza la conversión de D-xilosa a xilitol. En este cultivo no existe consumo de L-arabinosa o ácido acético, el cual posee el efecto dual inhibitor/sustrato según describen Felipe *et al.* (1996), Lohmeier-Vogel *et al.* (1998), Silva *et al.* (2004), Pereira *et al.* (2011), Scordia *et al.* (2012) o Castro *et al.* (2013), (ver apartado 2.5.5.1.c).

Tabla 5.15: Parámetros fermentativos obtenidos en biorreactor discontinuo, B. Braun Biotech International, modelo Biostat B. *C. guilliermondii*.

Parámetro	Valor
b , kg m ⁻³ h ⁻¹	0,06
q_s , kg kg ⁻¹ h ⁻¹	0,07 ⁵
q_s , kg kg ⁻¹ h ⁻¹	0,01 ³⁰
q_s , kg kg ⁻¹ h ⁻¹	<0,01 ⁶⁰
$Y^{G_{x/s}}$, kg kg ⁻¹	0,06
$Y^{G_{E/s}}$, kg kg ⁻¹	0,28
E_{max} , kg m ⁻³	13,32 ³⁶
q_E , kg kg ⁻¹ h ⁻¹	mal ajuste
Q_E , kg m ⁻³ h ⁻¹	0,84 ¹⁴
$Y^{G_{Xi/s}}$, kg kg ⁻¹	0,37
Xi_{max} , kg m ⁻³	9,13 ⁶⁶
q_{Xi} , kg kg ⁻¹ h ⁻¹	mal ajuste
Q_{Xi} , kg m ⁻³ h ⁻¹	0,26 ²⁹

Los superíndices indican tiempo (h).
Valores de $r^2 > 0,956$ en todos los ajustes.

La formación de etanol a partir de D-glucosa y D-xilosa, comenzó desde los primeros compases del experimento, mientras que, como se ha dicho, los primeros datos de producción de xilitol se obtienen posteriormente, tras el agotamiento de esta hexosa, Fig. 5.28. Los rendimientos en bioproductos son medios si se comparan con la bibliografía, Tabla 5.15, aunque si cabe decir que no se encuentran demasiados datos de producción de etanol con *C. guilliermondii*, que aun siendo una levadura buena productora de ambos bioproductos, centra comúnmente los objetivos hacia la producción de xilitol, Aguiar *et al.* (2002), Schirmer-Michel *et al.* (2008), Schirmer-Michel *et al.* (2009), Cortez y Roberto (2010), Pereira *et al.* (2011) o Medeiros *et al.* (2017), Tabla 5.15.

5.3.2.2. *Pichia stipitis*

Se van a tratar los resultados obtenidos en las fermentaciones realizadas con *P. stipitis*, en la Escuela de Ingeniería de Lorena. Se incluyen los resultados obtenidos tras la realización de una serie de ensayos preliminares, fermentaciones considerando un diseño de experimentos y, finalmente, una serie de fermentaciones complementarias.

a) Fermentaciones preliminares. Se ha planteado la realización de 7 ensayos en Erlenmeyer, entre los cuales en solo 3 se produjo fermentación, Tabla 5.16. Esta serie tiene como objetivo conocer la adaptación del microorganismo a diferentes medios de cultivo. A tal efecto, se han mantenido las mismas condiciones de operación en todos los experimentos, siendo la concentración inicial de inóculo de $1,5 \text{ kg m}^{-3}$, la temperatura $30 \text{ }^\circ\text{C}$, pH igual a 5 y ω de 0,4. El hidrolizado utilizado procede de poda sin hoja.

La descripción y claves de los experimentos serían, *Ps-H*, realizado con hidrolizado sin nutrientes añadidos, *Ps-HD*, con adición de nutrientes propuestos por Debus *et al.* (1983), *Ps-HL*, con adición de nutrientes propuestos por Lindegren *et al.* (1958) al 50 %, Cuevas (2007) y, finalmente *Ps-HF*, añadiendo los nutrientes propuestos por Fonseca *et al.* (2011). Los 3 restantes se han realizado en medio sintético (con la misma concentración de azúcares del hidrolizado sin hoja), siendo, *Ps-SD*, en el que se han añadido los nutrientes propuestos por Debus *et al.* (1983), *Ps-SL* con los publicados por Lindegren *et al.* (1958) al 50 %, Cuevas (2007), y *Ps-SF* con los reportados por Fonseca (2011).

De los siete ensayos realizados con *P. stipitis* sólo los que se realizaron en medio sintético fueron satisfactorios, Tabla 5.16. De entre estos, el experimento con mejores resultados fue el *Ps-SL*. En este caso se obtiene un rendimiento global en etanol de $0,39 \text{ kg kg}^{-1}$, que representa un valor ligeramente superior al 76 % respecto al rendimiento teórico. Aunque se ha obtenido un rendimiento puntual de $0,46 \text{ kg kg}^{-1}$ a las 16 h de experimento y que es próximo al 90 % respecto al teórico. La productividad volumétrica en etanol ha sido de $1,14 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y la concentración máxima de etanol, alcanzada a las 40 h, ha sido de $22,29 \text{ kg m}^{-3}$. Estos valores están de acuerdo con los estudios de Roberto *et al.* (1991), Nigam (2001^a), Silva *et al.* (2010) o Fonseca *et al.* (2013). Los rendimientos en biomasa, Tabla 5.16 son prácticamente idénticos en los tres experimentos y del orden de los reportados por Fonseca (2014), aunque menores a los de Silva *et al.* (2012).

Tabla 5.16: Parámetros correspondientes a las fermentaciones preliminares con *P. stipitis*. Obtenidos a partir de los datos que se encuentran en el Apéndice 3.

X ₀ = 1,5 kg m ⁻³ T = 30 °C pH = 5 ω = 0,4 Material: poda sin hoja			
Experimento	<i>Ps</i> -SD	<i>Ps</i> -SL	<i>Ps</i> -SF
Y ^G _{X/s} , kg kg ⁻¹	0,08±0,01	0,08±0,01	0,07±0,01
Y ^G _{E/s} , kg kg ⁻¹	0,28±0,01	0,39±0,02	0,25±0,01
E _{max} , kg m ⁻³	16,86±0,05 ⁴⁰	22,79±0,88 ⁴⁰	9,72±0,03 ⁴⁴
Q _E , kg m ⁻³ h ⁻¹	0,85±0,01 ¹⁶	1,14±0,02 ¹⁶	0,47±0,01 ²⁰
Y ^G _{Xi/s} , kg kg ⁻¹	mal ajuste	mal ajuste	-
Y _{Xi/s} , kg kg ⁻¹	0,08±0,01 ¹¹²	0,09±0,01 ¹¹²	-
X _{i max} , kg m ⁻³	3,29±0,01 ¹¹²	3,71±0,21 ¹¹²	-
Q _{Xi} , kg m ⁻³ h ⁻¹	0,03±0,01 ⁴⁰	0,04±0,01 ⁴⁰	-

Los superíndices indican tiempo (h). Valores de r² > 0,951 en todos los ajustes.

El hecho de no haber obtenido resultados positivos en las fermentaciones en las que se ha usado hidrolizado, puede explicarse a través de las afirmaciones de diversos autores como Bellido *et al.* (2011), que sostienen que el ácido acético sería el principal compuesto inhibidor para *P. stipitis* DSM 3651 y añaden que tanto el crecimiento celular como la formación de bioproductos se ven totalmente inhibidos con una concentración de ácido acético de 3,5 kg m⁻³. Igualmente, concluyen que el crecimiento celular y el consumo de azúcares se ve directamente afectado con el aumento de la concentración de ácido acético, obteniéndose una producción de etanol en el control del 76,5 % de la producción teórica, un 35,4 % cuando la concentración de ácido acético fue de 2,5 kg m⁻³, 61,8 % con 1,5 kg m⁻³ y 63,8 % con 0,5 kg m⁻³. Tras estos resultados, se propone realizar una operación de detoxificación con carbón activo previa a las próximas fermentaciones a realizar (ver apartado 5.3.1.3), que aunque aumentaría en coste del proceso permitirán conocer la viabilidad de esta operación y estudiar el comportamiento de este microorganismo respecto al hidrolizado utilizado.

Aunque no se han obtenido resultados respecto a la fermentación de hidrolizados por *P. stipitis*, se tomarán como concluyentes los resultados obtenidos en medio sintético para los siguientes apartados. De manera que se opta por suplementar los hidrolizados según se ha hecho en el experimento *Ps*-SL.

b) Fermentaciones considerando un diseño de experimentos. Tal como se ha propuesto en el apartado anterior, en este se va a fermentar, utilizando Erlenmeyer, hidrolizado de poda sin hoja, detoxificado y suplementado con los nutrientes propuestos por Lindegren *et al.* (1958) al 50 %, Cuevas (2007). El diseño experimental lo integran 11 ensayos (ver apéndice 3), Figura 5.17, donde aparecen 3 factores con 3 niveles: x_0 (0,5, 1,5, 2,5 kg m⁻³), ω (0,2, 0,4, 0,6), T (25, 30 y 35 °C). Siendo el pH de 5 y la agitación de 250 rpm.

Tabla 5.17: Diseño de experimentos proyectado.

Expto.	X_0 , kg m ⁻³	ω	T, °C
Ps-1	-1	-1	-1
Ps-2	1	-1	-1
Ps-3	-1	1	-1
Ps-4	1	1	-1
Ps-5	-1	-1	1
Ps-6	1	-1	1
Ps-7	-1	1	1
Ps-8	1	1	1
Ps-9	0	0	0
Ps-10	0	0	0
Ps-11	0	0	0

Tal como ha ocurrido con *C. guilliermondii*, no ha sido posible el tratamiento estadístico de los datos obtenidos debido a que varios experimentos no fueron positivos. Se tratarían de los experimentos realizados para el nivel máximo del factor temperatura, es decir, los experimentos realizados a 35 °C. De tal forma, los factores x_0 y ω , interactúan en sus tres niveles, mientras que la temperatura lo haría solo en dos, Tabla 5.18. Por tal motivo, se ha optado por mostrar solo los experimentos positivos.

Tabla 5.18: Parámetros correspondientes a las fermentaciones realizadas considerando un diseño de experimentos con *P. stipitis*.

Experimento	<i>Ps-E1</i>	<i>Ps-E2</i>	<i>Ps-E3</i>	<i>Ps-E4</i>	<i>Ps-E9 a Ps-E11</i>
$Y_{G/s}^G$, kg kg ⁻¹	0,10±0,01	0,08±0,01	0,07±0,01	0,03±0,01	0,06±0,01
Adaptación, h	48	24	48	48	24
$Y_{E/s}^G$, kg kg ⁻¹	0,31±0,01	0,34±0,01	0,16±0,01	0,36±0,01	0,39±0,01
E_{max} , kg m ⁻³	13,63±0,34 ¹²⁰	13,98±0,11 ⁹⁶	2,10±0,07 ¹⁴⁴	14,31±0,11 ¹⁶⁸	12,99±0,17 ⁹⁶
Q_E , kg m ⁻³ h ⁻¹	0,13±0,01 ⁹⁶	0,14±0,01 ⁹⁶	0,01±0,01 ⁷²	0,08±0,01 ¹⁶⁸	0,17±0,01 ⁷²

Los superíndices indican tiempo (h). Valores de $r^2 > 0,926$ en todos los ajustes.

En una primera aproximación, puede observarse como la aplicación de una operación de detoxificación con carbón activo, tal cual se ha descrito (apartado 4.5.4), es positiva de cara a la fermentación, mediada por *P. stipitis*, del hidrolizado de poda sin hoja, Tabla 5.18. Tal es así que en el mejor de los casos se logra alcanzar un rendimiento global en etanol superior al 76 % respecto al teórico, con una concentración máxima de 12,99 kg m⁻³, a las 96 h de experimento. Valores que se encontrarían dentro de la media, respecto a los estudios consultados, Du Preez *et al.* (1986), Roberto *et al.* (1991), Nigam (2001a), Nigam (2002), Scordia *et al.* (2010), Silva *et al.* (2010), Bellido *et al.* (2011), Fonseca *et al.* (2013), Silva *et al.* (2013) o Fonseca (2014).

En cuanto a los rendimientos en biomasa, varían entre 0,03 y 0,10 kg kg⁻¹, siendo de 0,06 kg kg⁻¹ en los experimentos *Ps-E9* a *Ps-E11*, que corresponde al ensayo de los niveles medios de los factores implicados, resultados acordes con los obtenidos por Fonseca 2014.

c) Fermentaciones complementarias modificando la concentración inicial de inóculo. Como se ha indicado anteriormente, es recomendado comenzar el proceso de fermentación con una alta concentración de células. Tras los problemas surgidos con el diseño de experimentos, se ha planteado la realización de ciertas fermentaciones complementarias en Erlenmyer para conocer el comportamiento de esta levadura. Tabla 5.19. Se ha empleado hidrolizado de poda sin hoja, detoxificado y suplementado con los nutrientes propuestos por Lindegren *et al.* (1958) al 50 %.

Se han realizado 4 experimentos, Tabla 5.19, variando la concentración inicial de inóculo entre 1,5 y 5,0 kg m⁻³ (pH = 5,5), condiciones seleccionadas tras consultar la bibliografía, Tabla 2.26. Los códigos usados para nombrar a cada experimento serían, en primer lugar 'Ps' (que hace referencia a *P. stipitis*), seguido de la concentración inicial de inóculo y finalmente el valor de pH.

Tabla 5.19: Fermentaciones complementarias.
Serie concentración de inóculo con *P. stipitis*.

	T = 30 °C	$\omega = 0,4$	Material: poda sin hoja	
Experimento	Ps-1,5-5,5	Ps-2,5-5,5	Ps-3,5-5,5	Ps-5,0-5,5
Y _{G_{x/s}} , kg kg ⁻¹	0,07±0,01	0,06±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01
Y _{G_{E/s}} , kg kg ⁻¹	0,36±0,01	0,40±0,01	0,29±0,01	0,28±0,01
E _{max} , kg m ⁻³	13,08±0,01 ¹²⁰	15,95±0,01 ⁹⁶	16,64±0,01 ⁹⁶	16,88±0,07 ⁷²
Q _E , kg m ⁻³ h ⁻¹	0,15±0,01 ⁷²	0,20±0,01 ⁷²	0,22±0,01 ⁷²	0,23±0,01 ⁷²

Los superíndices indican tiempo (h). Valores de r² > 0,950 en todos los ajustes.

Atendiendo al rendimiento en biomasa, puede verse una tendencia negativa hacia los experimentos en los que se emplea mayor concentración inicial de inóculo, efecto contrario observado con la productividad volumétrica en etanol. El rendimiento más alto alcanzado se sitúa en un 78,4 % respecto al máximo teórico alcanzable y corresponde al experimento Ps-2,5-5,5, y que se sitúa en la media de los trabajos consultados, aunque por debajo de los alcanzados por Du Preez *et al.* (1986), Eken-Saraçoglu y Arslan (2000), Agbogbo *et al.* (2006) o Silva *et al.* (2010). Se aprecia también una tendencia que indica que superar esta concentración inicial de inóculo no conlleva a mejores resultados en cuanto a rendimientos, incluso la productividad volumétrica evoluciona poco.

d) Fermentaciones complementarias modificando el pH. Paralelamente al anterior apartado, se han realizado 5 experimentos en Erlenmeyer en los que se ha variado el pH (3,0 a 6,0) manteniendo la concentración inicial de inóculo constante. Los códigos usados para identificar a cada experimento serían, en primer lugar 'Ps' (que hace referencia a *P. stipitis*), seguido de la concentración inicial de inóculo y finalmente el valor de pH. Se ha

empleado hidrolizado de poda sin hoja detoxificado y suplementado con los nutrientes propuestos por Lindegren *et al.* (1958) al 50 %, Cuevas (2007).

Tabla 5.20: Fermentaciones complementarias. Serie de pH con *P. stipitis*.

T = 30 °C	$\omega = 0,4$	Material: poda sin hoja		
Experimento	<i>Ps-1,5-3,0</i> y <i>Ps-1,5-4,0</i>	<i>Ps-1,5-5,0</i>	<i>Ps-1,5-5,5</i>	<i>Ps-1,5-6,0</i>
$Y_{x/s}$, kg kg ⁻¹	-	0,06±0,01	0,07±0,01	0,09±0,01
$Y_{E/s}^G$, kg kg ⁻¹	-	0,39±0,01	0,36±0,01	0,25±0,01
E_{max} , kg m ⁻³	-	12,99±0,17 ⁹⁶	13,08±0,01 ¹²⁰	14,26±0,12 ¹²⁰
Q_E , kg m ⁻³ h ⁻¹	-	0,17±0,01 ⁷²	0,15±0,01 ⁷²	0,13±0,01 ⁷²

Los superíndices indican tiempo (h). Valores de $r^2 > 0,936$ en todos los ajustes.

Los experimentos realizados a pH 3 y 4, no fueron satisfactorios, *P. stipitis* no fue capaz de fermentar, hecho que está de acuerdo con la bibliografía consultada, Silva *et al.* (2010), Scordia *et al.* (2012) o Fonseca *et al.* (2013), ya que la mayoría de autores fermenta con *P. stipitis* en un rango de pH de 5,0 a 6,5, exceptuando a Du Preez *et al.* (1986), que si fermentó positivamente a pH 4,0. Los rendimientos en biomasa más elevados se obtienen a pH 6,0, aunque son muy similares en los tres experimentos realizados entre pH 5,0 y 6,0.

Respecto a los rendimientos en bioproductos, el mejor resultado es de 0,39 kg kg⁻¹, y se obtiene a pH 5,0, aunque cabe decir que sólo es 3 centésimas superior al obtenido a pH 6,0. Por otro lado, las productividades volumétricas en etanol decrecen con aumentos en el valor de pH.

A modo de resumen, se va a comentar el inconveniente que supone la utilización de *P. stipitis* en la producción de bioproductos a partir de poda de olivar. Se ha visto como la levadura es sensible a los inhibidores contenidos en el hidrolizado obtenido de esta biomasa, necesitando añadir una etapa de detoxificación para conseguir que tenga lugar la fermentación. Este hecho implica, lógicamente, un aumento de los costes económicos del proceso global, inconveniente que no sucede al emplear *C. guilliermondii*.

5.3.3. Fermentaciones en biorreactor tipo tanque agitado con *C. guilliermondii*.

Este apartado contiene los experimentos realizados en biorreactor de bancada en las dependencias del Dpto. de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén.

Para la realización de estos experimentos se ha decidido utilizar *C. guilliermondii*, levadura capaz de fermentar los hidrolizados de poda de olivar utilizados en este estudio sin necesidad de detoxificación añadida. Se ha empleado hidrolizado de poda sin hoja y con hoja, en ambos casos suplementado con los nutrientes propuestos por Lindegren *et al.* (1958) al 50 %, Cuevas (2007).

5.3.3.1. Concentración inicial de inóculo

Se ha empleado en todos los casos hidrolizado de poda sin hoja, suplementado con los nutrientes propuestos por Lindegren *et al.* (1958) al 50 %, Cuevas (2007).

a) Serie concentración inicial de inóculo con $AE = 0,0$ vvm. Esta serie de fermentaciones está compuesta por 3 ensayos en los que la única fuente de oxígeno en el medio de cultivo se consigue a través del vórtice de agitación. En estas condiciones, las concentraciones iniciales de inóculo se han modificado entre 0,1 y 2,5 kg m⁻³.

En toda esta serie de experimentos, que podrían ser considerados como anaerobios, se ha conseguido fermentar, al igual que señala Sampaio *et al.* (2008) y en contraposición a lo indicado por Shirmer-Michel *et al.* (2008), que fermentando hidrolizados de cáscara de soja, observaron que *C. guilliermondii* NRRL Y-2075 no fue capaz de asimilar D-xilosa bajo condiciones anaerobias. En este estudio la velocidad específica máxima de crecimiento de biomasa se alcanza al emplear una concentración inicial de inóculo de 0,10 kg m⁻³, al igual que su sucede con la productividad en biomasa, b, Tabla 5.21. Las velocidades específicas de consumo de sustrato, q_s , son máximas a tiempos bajos, disminuyendo a medida que transcurre el experimento, igualmente puede verse como no hay muchas diferencias entre los experimentos realizados. Los rendimientos en biomasa descienden al aumentar la concentración inicial de inóculo, hasta 0,03 kg kg⁻¹ con $x_0 = 2,50$ kg m⁻³.

Tabla 5.21: Fermentaciones en biorreactor, tipo tanque agitado con *C. guilliermondii*. Serie de concentración inicial de inóculo con AE = 0,0 vvm.

$X_0, \text{kg m}^{-3}$	0,10		0,50		2,50	
μ_m, h^{-1}	0,2622		0,1097		0,0103	
$b, \text{kg m}^{-3} \text{h}^{-1}$	0,1394		0,0968		0,0127	
$q_s, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	10 h	0,0318	10 h	0,0357	10 h	0,0227
	45 h	0,0035	45 h	0,0039	45 h	0,0044
	90 h	0,0016	90 h	0,0018	90 h	0,0019
$q_{D\text{-glu}}, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	2 h	-	2 h	0,8582	2 h	0,1007
	10 h	-	10 h	0,0680	10 h	0,0182
	20 h	-	20 h	0,0188	20 h	0,0085
$q_{D\text{-xil}}, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	20 h	0,0044	20 h	0,0023	20 h	0,0027
	45 h	0,0016	45 h	0,0009	45 h	0,0011
	165 h	0,0004	90 h	0,0004	90 h	0,0005
$Y_{x/s}, \text{kg kg}^{-1}$	-		0,0598		0,0250	
$Y_{E/s}, \text{kg kg}^{-1}$	0,4149		0,4091		0,4113	
$E_{\text{max}} \text{kg m}^{-3}$	13,59	44 h	13,35	34 h	12,85	29 h
$q_E, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	10 h	0,59	10 h	0,34	10 h	0,18
	20 h	0,07	20 h	0,05	20 h	0,05
	30 h	0,03	30 h	0,02	30 h	0,02
$Y_{Xl/s}, \text{kg kg}^{-1}$	0,6801		0,6214		0,6537	
$Xl_{\text{max}}, \text{kg m}^{-3}$	13,28	215 h	10,37	141 h	9,46	100 h
$q_{Xl}, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	20 h	0,0947	20 h	0,0908	10 h	0,0791
	35 h	0,0797	35 h	0,0802	25 h	0,0711
	50 h	0,0770	50 h	0,0775	50 h	0,0662

$r^2 > 0,945$ en todos los ajustes.

Los rendimientos en bioproductos son similares en los tres experimentos, Tabla 5.21. El rendimiento en etanol fue del 80 y 81 %, respecto al máximo teórico, en los tres casos, aunque si se observa la concentración máxima de etanol alcanzada en cada experimento, puede verse como esta se obtiene a un menor tiempo experimental, 29 h, al emplear 2,5 kg m^{-3} , de inóculo. También, cabe indicar como lo concentración puntual más alta se alcanza a las 44 h, utilizando $x_0 = 0,1 \text{ kg m}^{-3}$. El rendimiento máximo en xilitol, 75 % respecto al teórico, se alcanza al emplear la menor concentración inicial de células, aunque también se debe decir que la concentración puntual máxima se obtiene a las 215 h de experimento. Este tiempo se reduce hasta las 100 h cuando se

empleó $2,5 \text{ kg m}^{-3}$ logrando un rendimiento global en xilitol del 72 % respecto al teórico. Estos rendimientos están de acuerdo con los estudios de Villarreal *et al.* (2006), Silva y Roberto (2001a), Pereira *et al.* (2011), aunque por debajo de los obtenidos por Aguiar *et al.* (2002) y, Mussatto y Roberto (2008).

Las velocidades específicas de producción de etanol y xilitol disminuyen a lo largo del proceso, Tabla 5.21. En el caso de q_E , puede verse cómo es mayor al emplear una concentración de células baja, siguiendo una tendencia inversa al aumento de x_0 , los valores de este parámetro están de acuerdo con los obtenidos por García, 2007, fermentando con *C. tropicalis*. En el caso de la velocidad específica de producción de xilitol, se han establecido dos ajustes, uno para las primeras horas de experimento, donde la velocidad es más elevada que en el segundo ajuste, realizado para tiempo de ensayo medios y largos. En las dos etapas se aprecia cómo q_{Xi} , sigue un comportamiento inverso al aumento de x_0 , efecto observado por Sampaio *et al.* (2008) y Mateo (2011), aunque los valores obtenidos en este trabajo están por debajo de los obtenidos por el primer autor.

b) Serie concentración inicial de inóculo con $AE = 0,15 \text{ vvm}$. Esta serie de fermentaciones está compuesta por 3 ensayos en los que existe aporte extra de oxígeno. La concentración inicial de inóculo se han modificado entre $0,025$ y $2,5 \text{ kg m}^{-3}$, Tabla 5.22.

Al igual que en el anterior apartado, se ha conseguido fermentar en todos los casos, con la particularidad de que en este caso, los ensayos se han realizado en condiciones microaeróbicas, tal como señalan Shirmer-Michel *et al.* (2008), que consideran una aeración de 1 vvm dentro de este rango. Igualmente cabe destacar el estudio de Sampaio *et al.* (2008), que sostienen la necesidad de fijar condiciones microaeróbicas con una producción de biomasa controlada que proporcione rendimientos y productividades elevadas. En consonancia, en este estudio la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , se alcanzan al emplear una concentración inicial de inóculo de $0,025 \text{ kg m}^{-3}$, al igual que sucede con la productividad en biomasa, b , Tabla 5.22. Las velocidades específicas de consumo de sustrato, q_s , inclusive q_{D-glu} , y q_{D-xil} , son máximas a tiempos bajos, disminuyendo a medida que transcurre el experimento, igualmente puede verse como, a diferencia del apartado anterior, sí existen diferencias entre los experimentos realizados, disminuyendo a favor de aumentos de x_0 . Los rendimientos globales en biomasa

descienden al aumentar la concentración de inóculo, desde $0,09 \text{ kg kg}^{-1}$ con $x_0 = 0,025 \text{ kg m}^{-3}$, hasta $0,04 \text{ kg kg}^{-1}$ con $x_0 = 2,50 \text{ kg m}^{-3}$.

Los rendimientos en etanol y xilitol son crecientes a favor de un aumento de x_0 , pasando $0,34$ a $0,45 \text{ kg kg}^{-1}$ ($Y_{E/s}^G$), siendo este último de un 88 % respecto al máximo teórico alcanzable y de $0,44$ a $0,67 \text{ kg kg}^{-1}$ ($Y_{Xi/s}^G$), Tabla 5.22. En este sentido, cabe resaltar cómo Domínguez *et al.* (1997a), en estudios realizado con *D. hansenii*, sostienen que la producción de xilitol aumenta a favor de un incremento de x_0 entre $0,3$ y $3,0 \text{ kg m}^{-3}$, disminuyendo al emplear concentraciones iniciales de biomasa entre $7,5$ y 15 kg m^{-3} . Parajó *et al.* (1997), también observan una mejora del rendimiento en xilitol a favor de aumentos de x_0 . Sin embargo, Roberto *et al.* (1996), señalan cómo un aumento de la concentración inicial de células de *C. guilliermondii* no siempre conlleva a una mejora en el rendimiento en xilitol. En cuanto las velocidades específicas de producción de bioproductos siguen la tendencia esperada. Ahora bien, si comparamos q_E , entre experimentos, se observa como desciende al aumentar x_0 . Tratamiento especial merece q_{Xi} , ya que, aunque sigue una tendencia normal, la pequeña fase 'lag' que se da en el experimento a $x_0 = 0,025 \text{ kg m}^{-3}$, dificulta la comparación de los resultados. Sin embargo, puede verse cómo se alcanza mayor velocidad al emplear mayor concentración inicial de células, sobretodo en el primer tramo de ajuste de q_{Xi} .

Tabla 5.22: Fermentaciones en biorreactor, tipo tanque agitado, con *C. guilliermondii*. Serie de concentración inicial de inóculo con AE = 0,15 vvm.

X_0 , kg m ⁻³	0,025		0,50		2,50	
μ_m , h ⁻¹	0,3499		0,1515		0,0273	
b , kg m ⁻³ h ⁻¹	0,1424		0,2226		0,0309	
q_s , kg kg ⁻¹ h ⁻¹	10 h	0,5713	10 h	0,0954	10 h	0,0378
	45 h	0,0312	45 h	0,0082	45 h	0,0055
	90 h	0,0127	90 h	0,0040	90 h	0,0027
$q_{D\text{-glu}}$, kg kg ⁻¹ h ⁻¹	2 h	-	2 h	0,9419	2 h	0,1037
	10 h	-	10 h	0,0704	10 h	0,0189
	20 h	-	20 h	0,1510	20 h	0,0074
$q_{D\text{-xil}}$, kg kg ⁻¹ h ⁻¹	20 h	0,0043	20 h	0,0020	20 h	0,0016
	45 h	0,0014	45 h	0,0008	45 h	0,0006
	165 h	0,0003	90 h	0,0003	90 h	0,0003
$Y_{X/S}^G$, kg kg ⁻¹	0,0915		0,0687		0,0379	
$Y_{E/S}^G$, kg kg ⁻¹	0,3415		0,4310		0,4506	
E_{max} , kg m ⁻³	10,98	20 h	14,06	20 h	14,42	20 h
q_E , kg kg ⁻¹ h ⁻¹	10 h	0,8432	10 h	0,3798	10 h	0,1907
	20 h	0,0517	20 h	0,0344	20 h	0,0340
	30 h	0,2560	30 h	0,0152	30 h	0,0151
$Y_{X_i/S}^G$, kg kg ⁻¹	0,4439		0,6599		0,6714	
$X_{i\max}$, kg m ⁻³	4,62	48 h	13,83	61 h	14,57	100 h
q_{X_i} , kg kg ⁻¹ h ⁻¹	20 h	0,0247	10 h	0,0735	10 h	0,1225
	35 h	0,0193	25 h	0,0665	25 h	0,1047
	50 h	0,0186	40 h	0,0647	40 h	0,0949

$r^2 > 0,909$ en todos los ajustes.

c) Serie concentración inicial de inóculo con AE = 0,30 vvm. En esta tercera serie de ensayos se ha mantenido constante el nivel de aeración en 0,30 vvm, variando x_0 , entre 0,05 y 2,50 kg m⁻³, Tabla 5.23. Desde el punto de vista del suministro de aire, y al igual que en el anterior apartado, pueden considerarse experimentos realizados bajo condiciones microaeróbicas.

Puede observarse cómo los valores de μ_m , y $Y_{X/S}^G$, disminuyen con x_0 , hecho esperado según se ha venido contrastando en los apartados anteriores, mientras que b no presenta una tendencia definida, Tabla 5.23. Respecto a q_s , cabe resaltar cómo se maximiza en las

primeras horas del experimento realizado con $x_0 = 0,05 \text{ kg m}^{-3}$, siguiendo la tendencia esperada en los tres ensayos realizados.

Respecto al rendimiento global y velocidad específica de producción en bioproductos, Tabla 5.23, cabe resaltar cómo el valor más elevado $Y_{E/s}^G$, se obtiene con $x_0 = 2,50 \text{ kg m}^{-3}$, con un valor del 74 % respecto al teórico, siendo los otros dos del 68 %. Con valores de q_E , que descienden al aumentar x_0 . Los valores de $Y_{Xi/s}^G$, no siguen una tendencia lógica, aunque si se maximizan en los experimento con mayor concentración inicial de células, obteniendo el valor más elevado, de $0,57 \text{ kg kg}^{-1}$, con $x_0 = 0,50 \text{ kg m}^{-3}$, seguido por un valor de $0,54 \text{ kg kg}^{-1}$ con $x_0 = 2,50 \text{ kg m}^{-3}$. Cabe resaltar que la concentración puntual más elevada de xilitol se alcanza con $x_0 = 2,50 \text{ kg m}^{-3}$, siendo de $15,93 \text{ kg m}^{-3}$ (a las 61 h). Los valores de q_{Xi} , tienden a aumentar con x_0 , aunque con valores similares en los dos niveles de x_0 , más elevados.

Tabla 5.23: Fermentaciones en biorreactor, tipo tanque agitado, con *C. guilliermondii*. Serie de concentración inicial de inóculo con AE = 0,30 vvm.

X_0 , kg m ⁻³	0,05		0,50		2,50	
μ_m , h ⁻¹	0,2622		0,2116		0,0467	
b , kg m ⁻³ h ⁻¹	0,1394		0,2520		0,1405	
q_s , kg kg ⁻¹ h ⁻¹	10 h	1,1785	10 h	0,1083	10 h	0,0685
	45 h	0,0712	45 h	0,0126	45 h	0,0093
	90 h	0,0287	90 h	0,0911	90 h	0,0046
q_{D-glu} , kg kg ⁻¹ h ⁻¹	2 h	-	2 h	1,0308	2 h	0,2073
	10 h	-	10 h	0,0518	10 h	0,0378
	20 h	-	20 h	0,0167	20 h	0,0136
q_{D-xil} , kg kg ⁻¹ h ⁻¹	20 h	0,0029	20 h	0,0034	20 h	0,0013
	45 h	0,0009	45 h	0,0012	45 h	0,0005
	165 h	0,0002	90 h	0,0006	90 h	0,0003
$Y_{x/s}$, kg kg ⁻¹	0,0873		0,0853		0,0473	
$Y_{E/s}$, kg kg ⁻¹	0,3432		0,3451		0,3760	
E_{max} , kg m ⁻³	6,45	12,5 h	12,67	20 h	12,35	20 h
q_E , kg kg ⁻¹ h ⁻¹	10 h	0,6232	10 h	0,1575	10 h	0,1335
	20 h	0,0600	15 h	0,0568	20 h	0,0206
	30 h	0,0216	25 h	0,0148	30 h	0,0089
$Y_{X_i/s}$, kg kg ⁻¹	0,3561		0,5723		0,5406	
$X_{I_{max}}$, kg m ⁻³	4,60	48 h	15,63	70 h	15,93	61 h
q_{X_i} , kg kg ⁻¹ h ⁻¹	20 h	0,0231	10 h	0,0792	10 h	0,0778
	35 h	0,0176	25 h	0,0498	25 h	0,0617
	50 h	0,0170	40 h	0,0449	40 h	0,0541

$r^2 > 0,9255$ en todos los ajustes.

5.3.3.2. Efecto del nivel de aeración

Se ha empleado en todos los casos hidrolizado de poda sin hoja, suplementado con los nutrientes propuestos por Lindegren *et al.* (1958) al 50 %, Cuevas (2007).

a) Serie de aeración con $x_0 = 0,5 \text{ kg m}^{-3}$. Se ha modificado el nivel de aeración entre 0,00 y 0,60 vvm, manteniendo x_0 , constante. La serie está compuesta de 4 experimentos. Se pretende estudiar cómo afecta el nivel de aeración al emplear la concentración de x_0 , fijada.

Si se observan los parámetros que hacen referencia al control de la biomasa, Tabla 5.24, puede verse cómo aumentos del nivel de aeración conllevan a un aumento de μ_m , b y $Y_{x/s}^G$. Efecto observado Vandeska *et al.* (1995), Silva *et al.* (2010), que señalan que altos niveles de aire suministrado favorecerán el crecimiento celular. Concretamente, Vaz de Arruda *et al.* (2017), cuyo objetivo es la producción de xilitol, indican que es necesario limitar el aporte de aire para conseguir un balance redox (NADH/NAD⁺) intracelular adecuado, aspecto indicado igualmente por Felipe (2004). En general, los valores de las velocidades específicas de consumo de sustrato, D-glucosa y D-xilosa, tienen a aumentar con x_0 y a disminuir a medida que avanza el experimento.

Los rendimientos en bioproductos se maximizan al utilizar AE = 0,15 vvm, Tabla 5.24, aspecto que está en consonancia con lo mencionado en las últimas líneas del párrafo anterior. En este caso, $Y_{E/s}^G$, alcanza un valor del 85 % respecto al teórico, mientras que $Y_{Xi/s}^G$, sería de un 72 %. Los valores de q_E , y q_{Xi} , disminuyen con aumentos de aeración.

Tabla 5.24: Fermentaciones en biorreactor, tipo tanque agitado, con *C. guilliermondii*. Serie de aeración con $x_0 = 0,5 \text{ kg m}^{-3}$.

AE, vvm	0,00		0,15		0,30		0,60	
μ_m, h^{-1}	0,1097		0,1515		0,2116		0,2269	
$b, \text{kg m}^{-3} \text{h}^{-1}$	0,0968		0,2226		0,2520		0,4518	
$q_s, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	10 h	0,0357	10 h	0,0954	10 h	0,1083	5 h	0,2371
	45 h	0,0039	45 h	0,0082	45 h	0,0126	25 h	0,0173
	90 h	0,0018	90 h	0,0040	90 h	0,0911	50 h	0,0077
$q_{D\text{-}glu}, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	2 h	0,8582	2 h	0,9419	2 h	1,0308	-	-
	10 h	0,0680	10 h	0,0704	10 h	0,0518	-	-
	20 h	0,0188	20 h	0,1510	20 h	0,0167	-	-
$q_{D\text{-}xil}, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	20 h	0,0023	20 h	0,0020	20 h	0,0034	5 h	0,0552
	45 h	0,0009	45 h	0,0008	45 h	0,0012	25 h	0,0040
	90 h	0,0004	90 h	0,0003	90 h	0,0006	50 h	0,0018
$Y_{x/s}, \text{kg kg}^{-1}$	0,0598		0,0687		0,0853		0,1050	
$Y_{E/s}, \text{kg kg}^{-1}$	0,4091		0,4310		0,3451		0,2879	
$E_{\max}, \text{kg m}^{-3}$	13,35	34 h	14,06	20 h	12,67	20 h	8,94	15 h
	10 h	0,3430	10 h	0,3798	10 h	0,1575	10 h	0,0753
	20 h	0,0525	20 h	0,0344	15 h	0,0568	15 h	0,0317
$q_E, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	30 h	0,0237	30 h	0,0152	25 h	0,0148	25 h	0,0110
	0,6214		0,6599		0,5723		0,3946	
$X_{I\max}, \text{kg m}^{-3}$	10,37	141 h	13,83	61 h	15,63	70 h	8,76	39 h
$q_{Xi}, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	20 h	0,0908	10 h	0,0735	10 h	0,0792	10 h	0,0596
	35 h	0,0802	25 h	0,0665	25 h	0,0498	25 h	0,0506
	50 h	0,0775	40 h	0,0647	40 h	0,0449	40 h	0,0459

$r^2 > 0,9463$ en todos los ajustes.

b) Serie de aeración con $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$. Esta serie es, en cuanto a niveles de aeración, igual que la anterior.

Teniendo en cuenta la línea argumentativa realizada en el apartado anterior, puede observarse, Tabla 5.25, una tendencia de aumento con x_0 de los parámetros referentes al control de biomasa, μ_m varía entre 0,01 y 0,07, b , entre 0,01 y 0,21 $\text{kg m}^{-3} \text{h}^{-1}$, $Y_{G_{x/s}}$, entre 0,03 y 0,06 kg kg^{-1} . En general, los valores de q_s , $q_{D\text{-}glu}$ y $q_{D\text{-}xil}$, siguen la tendencia esperada, es decir, tienden a aumentar con x_0 y a disminuir a medida que avanza el experimento.

Los máximos rendimientos globales en bioproductos se alcanzan cuando se usa AE = 0,15 vvm, Tabla 5.25, aspecto que está en consonancia con lo mencionado el apartado a) anterior. En este caso, $Y_{E/s}^G$, alcanza un valor del 88 % respecto al teórico, mientras que $Y_{X_i/s}^G$, sería de un 74 %. En general, los valores de q_E , disminuyen con aumentos del nivel de aeración, mientras que q_{X_i} , presenta sus valores máximos cuando AE = 0,15 vvm.

Tabla 5.25: Fermentaciones en biorreactor, tipo tanque agitado, con *C. guilliermondii*. Serie de aeración con $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$.

AE, vvm	0,00		0,15		0,30		0,60	
μ_m, h^{-1}	0,0103		0,0273		0,0467		0,0709	
$b, \text{kg m}^{-3} \text{h}^{-1}$	0,0127		0,0309		0,1405		0,2082	
$q_s, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	10 h	0,0227	10 h	0,0378	10 h	0,0685	10 h	0,0630
	45 h	0,0044	45 h	0,0055	45 h	0,0093	45 h	0,0127
	90 h	0,0019	90 h	0,0027	90 h	0,0046	90 h	0,0054
$q_{D\text{-glu}}, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	2 h	0,1007	2 h	0,1037	2 h	0,2073	2 h	0,2165
	10 h	0,0182	10 h	0,0189	10 h	0,0378	10 h	0,0269
	20 h	0,0085	20 h	0,0074	20 h	0,0136	20 h	0,0123
$q_{D\text{-xil}}, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	20 h	0,0027	20 h	0,0016	20 h	0,0013	20 h	0,0057
	45 h	0,0011	45 h	0,0006	45 h	0,0005	45 h	0,0025
	90 h	0,0005	90 h	0,0003	90 h	0,0003	90 h	0,0011
$Y_{x/s}, \text{kg kg}^{-1}$	0,0250		0,0379		0,0473		0,0613	
$Y_{E/s}, \text{kg kg}^{-1}$	0,4113		0,4506		0,3760		0,2949	
$E_{\max}, \text{kg m}^{-3}$	12,85	29 h	14,42	20 h	12,35	20 h	9,96	15 h
$q_E, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	10 h	0,1751	10 h	0,1907	10 h	0,1335	10 h	0,0632
	20 h	0,0456	20 h	0,0340	20 h	0,0206	20 h	0,0153
	30 h	0,0215	30 h	0,0151	30 h	0,0089	30 h	0,0073
$Y_{X_i/s}, \text{kg kg}^{-1}$	0,6537		0,6714		0,5406		0,3902	
$X_{i\max}, \text{kg m}^{-3}$	9,46	100 h	14,57	100 h	15,93	61 h	8,61	34 h
$q_{X_i}, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	10 h	0,0791	10 h	0,1225	10 h	0,0778	10 h	0,0675
	25 h	0,0711	25 h	0,1047	25 h	0,0617	25 h	0,0613
	50 h	0,0662	40 h	0,0949	40 h	0,0541	40 h	0,0604

Valores de $r^2 > 0,9420$ en todos los ajustes.

5.3.3.3. Fermentación de hidrolizados con poda completa

Los dos últimos ensayos de fermentación planteados en este trabajo se han realizado sobre hidrolizado de poda completa suplementado con los nutrientes propuestos por Lindegren *et al.* (1958) al 50 %. Estos ensayos se realizan dada la facilidad de *C. guilliermondii*, para metabolizar el hidrolizado de poda sin hoja, que como se indicó, posee menor carga de compuestos con poder inhibitorio que el hidrolizado de poda con hoja y como introducción a un subsiguiente estudio.

Se han escogido dos niveles de aeración, manteniendo constante la concentración inicial de inóculo, Tabla 5.26. La velocidad específica máxima de crecimiento, productividad volumétrica y rendimiento global en biomasa aumentan al hacerlo la aeración, efecto observado por Vandeska *et al.* (1995) y Silva *et al.* (2010), que indican cómo altos niveles de aeración favorecen el crecimiento celular. Las diferencias entre rendimientos globales en bioproductos son más acusadas para el caso del xilitol, a favor del experimento en condiciones anaerobias, efecto también observado por los citados autores, aunque las concentraciones máximas de ambos bioproductos se obtienen antes al emplear un nivel mayor de aeración. Las velocidades específicas de producción de bioproductos siguen la tendencia esperada, disminuyendo a favor del tiempo de ensayo; se observan valores ligeramente superiores al emplear una mayor aeración, aunque también debe tenerse en cuenta la duración de uno y otro experimento, en cuanto al agotamiento del sustrato, ya que con $AE = 0,3$ vvm D-xilosa se consume en 90 h, y con $AE = 0,00$ vvm no se consume en todo el experimento, el cual se decidió cortar a las 310 h.

Cabe resaltar cómo los parámetros μ_m y b , en comparación con los ensayos realizados en las mismas condiciones experimentales contenidos en la Tabla 5.25, son superiores, sobre todo en el experimento realizado en condiciones anaerobias, algo que llama la atención dada la concentración superior en compuestos inhibitorios del hidrolizado empleado en este apartado. Los rendimientos globales en biomasa son similares entre los dos hidrolizados, aunque ligeramente superior en el caso del experimento llevado a cabo con 0,30 vvm y material con hoja. Las velocidades específicas de consumo de sustrato, q_s , son bastante más elevada, incluso para q_{D-g} y q_{D-x} , efecto igualmente llamativo por los motivos indicados. Los rendimientos globales en etanol son similares en el caso de emplear hidrolizado con hoja y fermentar en condiciones anaerobias, mientras que son

ligeramente superiores al emplear a los dos niveles de aeración. En cuanto a los rendimientos globales en xilitol son superiores al emplear hidrolizado sin hoja en condiciones anaerobias, mientras que son similares al utilizar una AE = 0,3 vvm.

Tabla 5.26: Fermentaciones en biorreactor, tipo tanque agitado, con *C. guilliermondii*. Serie de aeración con $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$.

AE, vvm	0,0		0,30	
μ_m, h^{-1}	0,0348		0,0500	
$b, \text{kg m}^{-3} \text{h}^{-1}$	0,0738		0,1057	
$q_s, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	10 h	0,3243	2 h	0,4092
	45 h	0,0612	10 h	0,0583
	90 h	0,0280	20 h	0,0260
$q_{D\text{-glu}}, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	2 h	0,1338	2 h	0,4604
	10 h	0,0230	10 h	0,0656
	20 h	0,0105	15 h	0,0404
$q_{D\text{-xil}}, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	20 h	0,0166	2 h	0,0241
	45 h	0,0069	5 h	0,0083
	165 h	0,0018	20 h	0,0015
$Y_{x/s}, \text{kg kg}^{-1}$	0,0251		0,0507	
$Y_{E/s}, \text{kg kg}^{-1}$	0,4243		0,4371	
$E_{\max}, \text{kg m}^{-3}$	15,06	20 h	14,87	15 h
	10 h	0,1124	10 h	0,1276
$q_E, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	20 h	0,0259	20 h	0,0312
	30 h	0,0123	30 h	0,0146
$Y_{Xi/s}, \text{kg kg}^{-1}$	0,5711		0,5309	
$Xi_{\max}, \text{kg m}^{-3}$	11,24	168 h	8,43	34 h
	20 h	0,0872	10 h	0,1122
$q_{Xi}, \text{kg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	35 h	0,0817	15 h	0,1036
	50 h	0,0799	20 h	0,1001

Valores de $r^2 > 0,9117$ en todos los ajustes.

Finalmente, se puede afirmar que la lavadura *C. guilliermondii* posee una alta capacidad para la fermentación de hidrolizados de poda de olivar independientemente a la aplicación de un tratamiento preliminar de acondicionamiento por deshojado, lo que conlleva a un gran aporte en dos líneas, la primera en lo que se refiere a economía del

proceso y, la segunda, al haber encontrado un microorganismo capaz de fermentar este tipo de biomasa lignocelulósica, reportada en varios estudios como un material difícil para su aprovechamiento por vía bioquímica, por su carga en compuestos capaces de inhibir el crecimiento microbiano. En cualquier caso se debe mejorar el proceso de cara a maximizar los rendimientos en bioproductos.

CAPÍTULO



Conclusiones

6

Tras la discusión de los resultados experimentales obtenidos durante la investigación realizada, se exponen las siguientes conclusiones:

1. Respecto a la composición del material de partida, biomasa de carácter lignocelulósico, la poda de olivar es apta para su aprovechamiento por vía hidrolítica y fermentativa, utilizando microorganismos capaces de metabolizar los monosacáridos generados. La caracterización físico-química realizada ha determinado que es un material heterogéneo rico en heteropolímeros y homopolímeros estructurales (celulosa, hemicelulosa y lignina), cuyas moléculas principales son D-glucosa y D-xilosa. Existen diferencias apreciables entre la composición del material de partida, según sea o no deshojado. En este sentido, se ha comprobado que el deshojado del material provoca aumentos en los contenidos de celulosa y hemicelulosa, lo que repercute en la composición del hidrolizado generado.
2. En los tratamientos hidrotérmicos sobre material de poda completo, en el rango de variables ensayado, con severidad ($\text{Log } R_0$) entre 2,88 y 3,46, la hidrólisis de las fracciones hemicelulósica y celulósica fue parcial, siendo mayor la conversión de la hemicelulosa (X_H entre 10 y 12 %) y aproximadamente constante la de celulosa ($X_C \approx 5$ %). En estas condiciones, los rendimientos totales en monosacáridos (Y_{Tot}) son bajos, si se comparan con los obtenidos por hidrólisis ácida, observándose que algunos monosacáridos no se solubilizan (L-arabinosa, D-galactosa, D-xilosa o D-manosa), con Y_{Tot} ligeramente por encima del 3 % en el experimento de mayor severidad.
3. Tras las hidrólisis con H_2SO_4 , realizadas sobre material de poda completo y sin hoja, se deduce:
 - 3.1. En el material de poda completa, se deben alcanzar valores del factor de severidad combinado superiores a 2,8 para la total degradación de la hemicelulosa, no obteniéndose valores de X_C superiores al 30 %. Por otro lado, los rendimientos en monosacáridos aumentan con la severidad del tratamiento, siendo D-glucosa el monómero principal, seguido de D-xilosa.
 - 3.2. En el material de poda sin hoja, hay que indicar que se han usado condiciones más severas, logrando en la mayoría de los casos la degradación total de la hemicelulosa ($\text{Log } R_0'$ entre 2,94 y 3,52), encontrando aumentos en la degradación de la celulosa, aunque no superando en ningún caso el 40 %. Los rendimientos en

monosacáridos muestran aumentos para valores bajos del Log R_0' que tienden a estabilizarse, pudiendo indicar degradación, en los ensayos más severos. En esta serie de experimentos es D-xilosa el monómero más abundante, seguido de D-glucosa.

3.3. La principal diferencia entre los dos materiales de partida es su composición química, lo que se ha traducido en distinto perfil porcentual entre monosacáridos. Sin embargo, no se han detectado grandes diferencias entre los valores máximos del rendimiento en azúcares totales.

4. En relación a los experimentos de hidrólisis con HCl cabe diferenciar entre los resultados obtenidos sobre material de poda completo y sin hoja.

4.1. En el material de poda completo, la hemicelulosa se logra solubilizar completamente en los ensayos con Log $R_0' > 3,21$, mientras que la conversión de la celulosa no es mayor del 30 %. Los monómeros principales y sus rendimientos más altos son D-glucosa (15,92 %), y de D-xilosa (10,46 %); el mayor rendimiento en azúcares totales fue 33,75 %. Se ha apreciado un aumento de los rendimientos en azúcares totales y monoméricos con la severidad del tratamiento.

4.2 En el material de poda sin hoja, la fracción hemicelulósica fue hidrolizada totalmente a partir de valores de Log $R_0' > 2,99$. D-xilosa ha sido el monosacárido principal (16,03 %), seguido de D-glucosa (11,09 %) y el mayor valor del rendimiento en azúcares totales fue 32,27 %. En general, se aprecia un aumento logarítmico de los rendimientos en azúcares totales y monoméricos en función de la severidad del tratamiento, aunque con degradación a valores máximo de Log R_0' .

5. Los dos ácidos empleados en este trabajo son potencialmente utilizables para la hidrólisis de material lignocelulósico.

5.1. En el material de poda completo, la conversión de la hemicelulosa en las series realizadas a baja y media temperatura es más efectiva cuando se emplea HCl, aunque a medida que se van alcanzando condiciones más extremas, se consiguen conversiones totales de hemicelulosa empleando indistintamente uno u otro ácido. En cuanto a los rendimientos en monosacáridos y azúcares totales, cabe afirmar que bajo las mismas condiciones de operación, los tratamientos con HCl son de una severidad superior a los realizados con H_2SO_4 , lo que no conlleva obtener rendimientos superiores. Es más, si se refiere a D-glucosa, se ha observado como se obtienen rendimientos ligeramente

superiores al emplear ácido sulfúrico frente a clorhídrico, sin la necesidad de tener que alcanzar altos valores de $\text{Log } R_0'$ (entre 2,88 y 3,30).

5.2. En el material de poda sin hoja, el efecto sobre la biomasa de partida es el mismo que para poda completo. En lo que se refiere a Y_{Tot} y $Y_{\text{D-Xil}}$ (monosacárido principal en este tipo de material), para valores a partir de $\text{Log } R_0' = 2,97$, los rendimientos más altos se obtienen con ácido sulfúrico. A partir de valores de $\text{Log } R_0' \geq 3,50$, puede notarse que la mayor severidad de los tratamientos con HCl no conduce a un aumento de los rendimientos en carbohidratos.

6. Son varios los compuestos inhibidores que aparecen al hidrolizar poda de olivar y que afectan negativamente al crecimiento de *C. guilliermondii* y *P. stipitis*.

6.1. Los compuestos fenólicos totales se generan de manera creciente con el $\text{Log } R_0'$. Las concentraciones obtenidas están entre 1,45 y 2,77 (H_2SO_4), y 1,72 a 3,21 kg m^{-3} (HCl), en el material de poda completo; y en los rangos 1,32-2,69 y 1,51-3,51 kg m^{-3} , respectivamente al utilizar material sin hoja.

6.2. La generación de ácido acético sigue dos tendencias diferenciadas en función del material de partida empleado. Aumenta linealmente con la concentración de $\text{Log } R_0'$, cuando se utiliza poda de olivar completa, alcanzando máximos en las condiciones de máxima severidad: 4,74 (HCl) y 4,07 kg m^{-3} (H_2SO_4). Por otro lado, el material de poda sin hoja sigue una tendencia logarítmica, con una primera etapa de crecimiento que coincide con valores de $\text{Log } R_0'$ bajos, que precede a una segunda de estabilización. Las concentraciones máximas son de: 3,95 (HCl) y 3,73 kg m^{-3} (H_2SO_4).

6.3. Las concentraciones de furfural y HMF respecto al hidrolizado de poda completo, siguen un comportamiento exponencial conforme aumento el $\text{Log } R_0'$. Las concentraciones máximas de furfural fueron de 81,34 (H_2SO_4) y 141,23 g m^{-3} (HCl) y las de HMF, 337,43 (H_2SO_4) y 421,33 (HCl) g m^{-3} . Respecto al material de poda sin hoja, el furfural sigue un comportamiento exponencial, mientras que en el caso del HMF es lineal. Los valores máximos de furfural son de 1,26 (HCl) y 0,32 kg m^{-3} (H_2SO_4) y de HMF, de 83,2 (HCl) y 63,0 g m^{-3} (H_2SO_4).

7. Tras la etapa de hidrólisis ácida, se han seleccionado los hidrolizados más idóneos para realizar la fermentación con levaduras bajo la premisa de alcanzar un compromiso entre altos rendimientos en monosacáridos y bajos en inhibidores.

7.1. En el hidrolizado de poda completa, en las condiciones empleadas en el ensayo HC-S20, ($\text{Log } R_0' = 2,88$), fijando un tiempo de 240 min, una concentración de H_2SO_4 de 1,0 N y 95 °C, se consigue solubilizar la hemicelulosa al 100 %, con $Y_{\text{Tot}} = 33,58$ %, $Y_{\text{D-glu}} = 15,88$ % y $Y_{\text{D-xil}} = 9,87$ %, resultando concentraciones de ácido acético de 3,90 kg m^{-3} , 81,34 g m^{-3} de furfural, 337,43 g m^{-3} de HMF y 2,62 kg m^{-3} de CFT.

7.2. En hidrolizado de poda sin hoja, en las condiciones empleadas en el ensayo HSh-S13, ($\text{Log } R_0' = 311$), fijando un tiempo de 180 min, una concentración de H_2SO_4 de 0,5 N y 95 °C, se solubilizó la hemicelulosa al 100 %, con $Y_{\text{Tot}} = 33,87$ %, $Y_{\text{D-glu}} = 11,29$ % y $Y_{\text{D-xil}} = 16,03$ %, resultando a los 240 min concentraciones de ácido acético de 3,58 kg m^{-3} , 35,80 g m^{-3} de furfural, 36,00 g m^{-3} de HMF y 2,39 kg m^{-3} de CFT.

8. De las fermentaciones con *C. guilliermondii* se ha podido concluir lo siguiente:

8.1. En los procesos preliminares, tras las diferentes condiciones y suplementaciones nutricionales aplicadas al hidrolizado concentrado procedente de poda sin hoja y medios sintéticos, se puede afirmar que las mejores condiciones fueron: concentración inicial de inóculo de 2,5 kg m^{-3} , temperatura 30 °C, relación volumen del medio/volumen del matraz Erlenmeyer (ω) de 0,4 y pH 5,5, suplementando el hidrolizado con los nutrientes reportados por Lindegren *et al.* (1958) al 50 %. Para justificar los ensayos preliminares se realizó una fermentación en biorreactor discontinuo, tipo tanque agitado, en las condiciones: $x_0 = 2,5$ kg m^{-3} , $T = 30$ °C, pH = 5,5, AE = 0,4 vvm, A = 350 rpm, $K_{La} = 17$ h^{-1} , suplementando el hidrolizado concentrado procedente de material sin hoja con los nutrientes reportados por Lindegren *et al.* (1958) al 50 %. En este ensayo no existe fase 'lag', observándose un crecimiento exponencial rápido y un consumo de sustrato secuencial, con valores de $b = 0,06$ $\text{kg m}^{-3} \text{h}^{-1}$, $Y_{x/s} = 0,06$ kg kg^{-1} , $Y_{E/s}^G = 0,28$ kg kg^{-1} y $Y_{xi/s}^G = 0,37$ kg kg^{-1} .

8.2. Las fermentaciones en condiciones controladas indican que los resultados más favorables se han obtenido al emplear condiciones microaeróbicas. En la serie de concentración inicial de inóculo sobre hidrolizado de poda sin hoja concentrado y suplementado, los mejores resultados se obtienen con AE = 0,15 vvm y $x_0 = 2,5$ kg m^{-3} . En este caso, se acortan los tiempos experimentales respecto a la serie AE = 0,00 vvm y se maximizan los rendimientos en bioproductos. La condición ensayada más favorable fue: $x_0 = 2,5$ kg m^{-3} , $T = 30$ °C, pH = 5,5, AE = 0,15 vvm y A = 250 rpm, obteniéndose valores de $Y_{x/s}^G = 0,038$ kg kg^{-1} , $Y_{E/s}^G = 0,45$ kg kg^{-1} y $Y_{xi/s}^G = 0,67$ kg kg^{-1} . Se

ha comprobado igualmente que en la serie concentración inicial de inóculo, μ_m y b se maximizan, en general, al disminuir x_0 . Las velocidades de consumo de sustrato y producción de bioproductos descienden según avanza el ensayo. Los valores de $Y_{x/s}^G$, descienden al aumentar x_0 , mientras que los rendimientos en bioproductos no siguen una tendencia clara. Sin embargo, en la serie de aeración, aumentos de ésta conllevan incrementos de μ_m , b y $Y_{x/s}^G$. Los valores de q_s tienden a aumentar con x_0 y a disminuir con el tiempo de proceso. Los valores de q_E , disminuyen con aumentos del nivel de aeración, mientras que q_{Xi} , no sigue una tendencia clara. Los rendimientos en bioproductos muestran un valor máximo con $AE = 0,15$ vvm, que disminuye al aumentar la aeración y al usar condiciones anaerobias.

8.3. Los procesos de fermentación sobre hidrolizado concentrado procedente de material de poda completo fueron más favorables, ya que la levadura fue capaz de fermentar adecuadamente un medio con una carga de inhibidores superior al hidrolizado procedente de material sin hoja, lo que conllevaría un ahorro de costes del proceso. Los rendimientos globales en xilitol son superiores al utilizar hidrolizado sin hoja en condiciones anaerobias, mientras que son similares al usar una $AE = 0,3$ vvm. Los valores más altos en bioproductos fueron $Y_{E/s}^G = 0,44$ kg kg⁻¹ y $Y_{Xi/s}^G = 0,57$ kg kg⁻¹.

9. Tras las fermentaciones con *P. stitipis* cabe destacar:

9.1. La utilización de esta levadura acarrea el inconveniente que supone tener que aplicar una etapa intermedia, de detoxificación. Al usar hidrolizado de poda concentrado y suplementado con diferentes medios, se ha observado, como la levadura es sensible a los inhibidores del hidrolizado, necesitando detoxificar éste para conseguir que tenga lugar la fermentación. Este hecho implica, lógicamente, un aumento de los costes económicos del proceso global, inconveniente que no sucede al emplear *C. guilliermondii*.

9.2. La detoxificación con carbón activo y ajuste de pH resultó efectiva. En el ensayo más favorable se alcanzó un $Y_{x/s}^G = 0,06$ kg kg⁻¹ y un $Y_{E/s}^G = 0,40$ kg kg⁻¹, bajo las condiciones de $x_0 = 2,5$ kg m⁻³, $T = 30$ °C, $pH = 5,5$, $\omega = 0,4$ y $A = 250$ rpm.

10. Finalmente, en consideración a los objetivos planteados se ha determinado que la levadura *C. guilliermondii* posee una alta capacidad para la fermentación de hidrolizados de poda de olivar, en las condiciones ensayadas, independientemente de la aplicación de un tratamiento preliminar de deshojado, lo que conlleva a un gran

aporte en dos líneas, la primera en lo que se refiere a economía del proceso y, la segunda, al haber encontrado un microorganismo capaz de fermentar este tipo de biomasa lignocelulósica, señalada en varios estudios como un material difícil para su aprovechamiento por vía bioquímica, por su carga en compuestos capaces de inhibir el crecimiento microbiano. En cualquier caso se debe mejorar el proceso de cara a maximizar los rendimientos en bioproductos.

CHAPTER



Conclusions

6

After discussion of the experimental results obtained during the investigation, the following conclusions are presented:

1. Regarding the raw material composition, lignocellulosic biomass, olive tree pruning is suitable for use by hydrolytic and fermentation processes, using microorganisms capable of metabolizing the generated monosaccharides. The physical-chemical characterization has determined that it is a heterogeneous material rich in structural heteropolymers and homopolymers (cellulose, hemicellulose and lignin), where D-glucose and D-xylose are the main molecules. There are appreciable differences between the composition of the raw material, whether with or without leaves. In this sense, it has been demonstrated that the biomass without leaves have higher cellulose and hemicellulose contents, which affects the composition of the generated hydrolyzate.
2. Hydrothermal treatments, in the range of variables tested, with severity ($\text{Log } R_0$) between 2.88 to 3.46, have demonstrated that the hemicellulose and cellulose hydrolysis was partial and the conversion of hemicellulose was greater (X_H between 10 and 12 %) than cellulose one ($X_C \approx 5\%$). Under these conditions, the total sugar yields (Y_{Tot}) are low, if they are compared with acid hydrolysis yields, noting that some monosaccharides are not solubilized (L-arabinose, D-galactose, D-xylose or D-mannose), with Y_{Tot} slightly above 3 % in the most severe conditions.
3. After H_2SO_4 hydrolysis of olive tree biomass (complete and without leaves), it is deduced that:
 - 3.1. Regarding complete biomass, to achieve the total hemicellulose degradation is necessary to fix a combined severity factor above 2.8, obtaining X_C values not greater than 30%. On the other hand, yields in monosaccharides increase with the severity of the treatment. The main monomer was D-glucose, followed by D-xylose.
 - 3.2. In reference to biomass without leaves, it should be noted that more severe conditions have been used, than those referred to full material, achieving in most cases the total degradation of hemicellulose ($\text{Log } R_0'$ between 2.94 and 3.52). The increases of cellulose degradation were not higher than 40 % in any case. The monosaccharides yields show increases for low $\text{Log } R_0'$ with a tendency to stabilization and, finally, with

sligh degradation in the most severe tests. In this series of experiments, D-xylose represents the main monomer, followed by D-glucose.

3.3. The main difference between both raw materials is their chemical composition, finding a different monosaccharides profile. Nevertheless, there are not high differences between the maximum values of total sugar yields.

4. In HCl hydrolysis assays, differences have been noted depending of raw bioamass (complete or without leaves) used.

4.1. On complete material, total hemicellulose solubilization has been obtained from $\text{Log } R_0' > 3.21$, while the cellulose conversion it is not greater than 30 %. The main monomers and their highest yields were D-glucose (15.92 %) and D-xylose (10.46 %); the major total sugar yield was 33.75 %. It has been observed an increase of these yields with the treatments severity.

4.2. When biomass without leaves is used, hemicellulose is completely solubilized from $\text{Log } R_0' > 2.99$. D-xylose has been the main monosaccharide (16.03 %), followed by D-glucose (11.09 %) and the highest yield value in total sugars was 32.27 %. In general, there is a logarithmic increase of yields (total and monomeric sugars) with the treatment serverity, although observing degradation at maximum $\text{Log } R_0'$ values.

5. Two acids used in this work are potentially usable for lignocellulosic material hydrolysis.

5.1. On complete 248áter248g material, the hemicellulose conversion in low and medium temperature series is most effective with HCl than with H_2SO_4 , although when extreme conditions are reached, total conversion of hemicellulose are achieved by using either acid. In reference to monosaccharides and total sugars yields, it should be stated that under the same operating conditions, HCl treatments have greater severity than those performed with H_2SO_4 , which does not entail higher yields. Moreover, if it refers to D-glucose, slightly higher yields have been observed with sulfuric than with hydrochloric acid, even at no high values of $\text{Log } R_0'$ (between 2.88 and 3.30).

5.2. Regarding pruning material without leaves, the effect on raw biomass is the same than on full material. From $\text{Log } R_0' = 2.97$, Y_{Tot} and $Y_{\text{D-Xyl}}$ (main monosaccharide in this material), the highest yields are obtained with sulfuric acid. From $\text{Log } R_0' \geq 3.50$ it can be noted that greater severity of HCl treatments does not lead to increase the carbohydrate yields.

6. There are several inhibitory compounds that appear when hydrolyzing olive pruning and that affect negatively to the growth of *C. guilliermondii* and *P. stipitis*.
- 6.1. Total phenolic compounds are increasingly generated with Log R_0' . The concentrations obtained are between 1.45 to 2.77 (H_2SO_4), and 1.72 to 3.21 $kg\ m^{-3}$ (HCl), with complete pruning material; and in the ranges 1.32 to 2.69 and 1.51 to 3.51 $kg\ m^{-3}$, respectively when using material without leaves.
- 6.2. Acetic acid generation have different trends depending on the raw material. It increases linearly with Log R_0' if complete pruning is used, reaching maximums under high severity conditions: 4.74 (HCl) and 4.07 $kg\ m^{-3}$ (H_2SO_4). On the other hand, pruning without leaves follows a logarithmic trend, with a first stage of growth at low Log R_0' values, followed by a stabilization period. The maximum concentrations were: 3.95 (HCl) and 3.73 $kg\ m^{-3}$ (H_2SO_4).
- 6.3. Furfural and HMF concentrations in hydrolyzates from complete material follow an exponential behavior with Log R_0' increases. The maximum furfural and HMF concentrations were 81.34 (H_2SO_4) and 141.23 $g\ m^{-3}$ (HCl) and 337.43 (H_2SO_4) and 421.33 (HCl) $g\ m^{-3}$, respectively. When biomass without leaves was employed, furfural follows an exponential behavior, while HMF was linear. The maximum furfural values are 1.26 (HCl) and 0.32 $kg\ m^{-3}$ (H_2SO_4) and for HMF, 83.2 (HCl) and 63.0 $g\ m^{-3}$ (H_2SO_4).
7. After acid hydrolysis experiments, the most suitable hydrolyzates have been selected for fermentation with yeasts under the premise of reaching a compromise between high monosaccharides yields and low inhibitors ones.
- 7.1. With the complete pruning hydrolyzate, at conditions used in HC-S20 assay (Log R_0' = 2.88), 240 min, H_2SO_4 concentration of 1.0 N and 95 °C, hemicellulose was 100 % solubilized, Y_{Tot} = 33.58 %, Y_{D-glu} = 15.88 % and Y_{D-xyf} = 9.87 %. Concentration of acetic acid was 3.90 $kg\ m^{-3}$, 81.34 $g\ m^{-3}$ of furfural, 337.43 $g\ m^{-3}$ of HMF and 2.62 $kg\ m^{-3}$ of CFT.
- 7.2. Pruning biomass without leaves hydrolyzates, under conditions used in HSh-S13 experiment, (Log R_0' = 3.11), 180 min, H_2SO_4 concentration 0.5 N and 95 °C, the 100 % hemicellulose was hydrolyzed, Y_{Tot} = 33.87%, Y_{D-glu} = 11.29 % and Y_{D-xyf} = 16.03 %; resulting (240 min) acetic acid concentrations of 3.58 $kg\ m^{-3}$, 35.80 $g\ m^{-3}$ of furfural, 36.00 $g\ m^{-3}$ of HMF and 2.39 $kg\ m^{-3}$ of CFT.

8. After fermentations with *C. guilliermondii* it has been concluded:

8.1. In the preliminary assays, after different conditions and nutritional supplements applied to the concentrated hydrolyzate from without leaves pruning biomass and synthetic media, it can be affirmed that the best conditions were: initial inoculum concentration of 2.5 kg m^{-3} , temperature $30 \text{ }^\circ\text{C}$, volume ratio of the medium/volume of the Erlenmeyer flask (ω) of 0.4 and pH 5.5; the hydrolyzate was supplemented with the medium of Lindegren *et al.* (1958) at 50% nutrients. To justify the preliminary experiments, a fermentation was carried out in a batch stirred tank bioreactor, being: $x_0 = 2.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5.5$, $\text{AE} = 0.4 \text{ vvm}$, $A = 350 \text{ rpm}$, $K_{\text{La}} = 17 \text{ h}^{-1}$; with concentrated hydrolyzate, from without leaves biomass, supplemented with nutrients related by Lindegren *et al.* (1958) at 50 %. In this assay there was no lag phase, with fast exponential growth and sequential substrate consumption, obtaining that $b = 0.06 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, $Y_{x/s} = 0.06 \text{ kg kg}^{-1}$, $Y_{E/s}^G = 0.28 \text{ kg kg}^{-1}$ and $Y_{xy/s}^G = 0.37 \text{ kg kg}^{-1}$.

8.2. Fermentations under controlled conditions indicate that the most favorable results had been obtained using microaerobic conditions. In the initial inoculum concentration series on concentrated (from pruning without leaves) and supplemented hydrolyzate, the best results are obtained with $\text{AE} = 0.15 \text{ vvm}$ and $x_0 = 2.5 \text{ kg m}^{-3}$. In this case, the experimental times are shorter than $\text{AE} = 0.00 \text{ vvm}$ series and the yields in bioproducts are maximized. Under the most favorable tested condition: $x_0 = 2.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5.5$, $\text{AE} = 0.15 \text{ vvm}$ and $A = 250 \text{ rpm}$, $Y_{x/s}^G = 0.038 \text{ kg kg}^{-1}$, $Y_{E/s}^G = 0.45 \text{ kg kg}^{-1}$ and $Y_{xy/s}^G = 0.67 \text{ kg kg}^{-1}$, were obtained. In this initial inoculum concentration series it has also been shown that μ_m and b are maximized, in general, by decreasing x_0 . The rates of substrate consumption and bioproduct production decrease as the assay progresses. $Y_{x/s}^G$ values decrease when increasing x_0 , while yields in bioproducts do not follow a clear trend. However, in the aeration series, increases in this parameter result in μ_m , b and $Y_{x/s}^G$ increases. Q_s values tend to increase with x_0 and decrease with the process time. The values of q_E decrease with aeration level, while q_{xi} does not follow a clear trend. Bioproducts yields show a maximum value with $\text{AE} = 0.15 \text{ vvm}$, which decreases with aeration and when anaerobic conditions were used.

8.3. Fermentation processes on concentrated hydrolyzate from complete pruning material were more favorable, because the yeast was able to properly ferment a

medium with a load of inhibitors higher than the hydrolyzate from material without leaves, which would save process cost. The overall yields in xylitol are higher when hydrolysate without leaves were used under anaerobic conditions, while they were similar when an $AE = 0.3$ vvm was fixed. The highest bioproducts values were $Y_{E/s}^G = 0.44$ kg kg⁻¹ and $Y_{xy/s}^G = 0.57$ kg kg⁻¹.

9. After *P. stipitis* fermentations it can be stand out that:

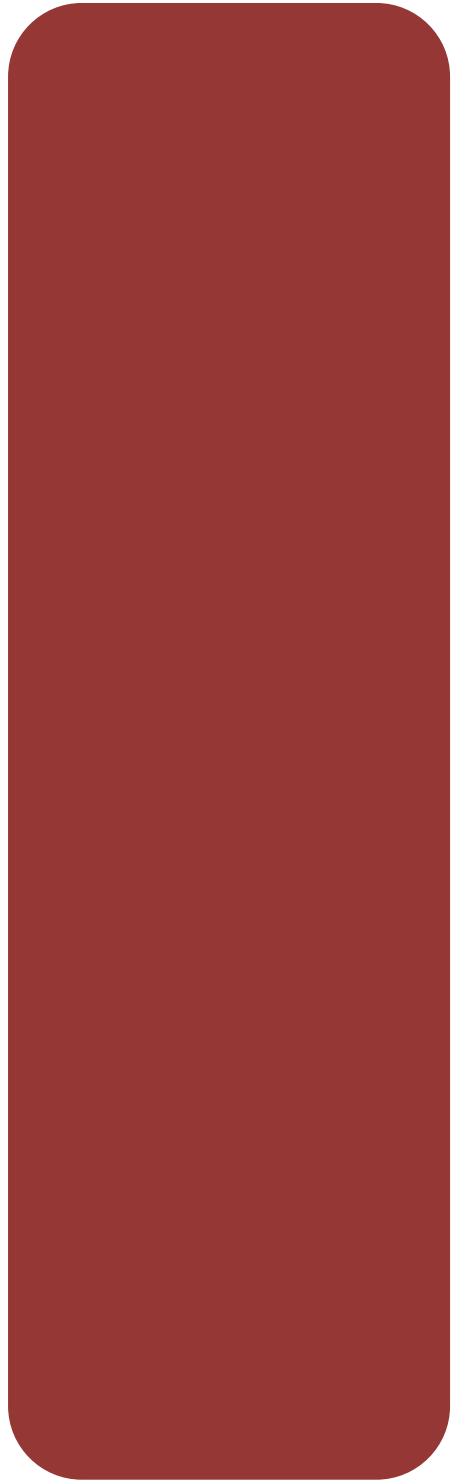
9.1. The use of this yeast entails the inconvenience to apply an intermediate step of detoxification. When concentrated and supplemented, with different media, hydrolyzate is used, and it has been observed that this yeast is sensitive to hydrolysate inhibitors and so, a detoxification process becomes necessary. This fact logically increases the economic global process costs, an inconvenience that does not happen when *C. guilliermondii* was used.

9.2. Activated charcoal use and pH adjust were effective as detoxification processes. In the most favorable experiment it was achieved $Y_{x/s}^G = 0.06$ kg kg⁻¹ and $Y_{E/s}^G = 0.40$ kg kg⁻¹, under assay conditions of $x_0 = 2.5$ kg m⁻³, $T = 30$ °C, $pH = 5.5$, $\omega = 0.4$ and $A = 250$ rpm.

10. Finally, according to to the proposed objectives, it has been determined that *C. guilliermondii* has a high capacity for olive tree biomass hydrolyzates fermentation, under the conditions tested, regardless of the application of a preliminary defoliating treatment, which entails to a great contribution in two lines, the first one refers to process economy and secondly, having found a microorganism able to ferment this type of lignocellulosic material, indicated in several studies as difficult for its biochemical use, due to its charge in compounds capable of inhibiting microbial growth. In any case, the process must be improved to maximize bioproducts yields.



Nomenclatura



A	Agitación, rpm.
A	Parámetro de la ecuación 5.11.
A ₀	Absorbancia inicial, antes de comenzar la reacción, en la determinación de ácido acético. $\lambda = 340$ nm.
A ₁	Absorbancia en la disolución tras añadir las enzimas MDH y CS en la determinación de ácido acético. $\lambda = 340$ nm.
A ₂	Absorbancia final, una vez transcurrida la reacción, en la determinación de ácido acético. $\lambda = 340$ nm.
A ₆₂₀	Absorbancia a 620 nm, en la determinación de la concentración de biomasa.
A ₇₆₀	Absorbancia a 760 nm, en la determinación de CFT.
ACDH	Acetaldehído deshidrogenasa.
AcH	Concentración de ácido acético, kg m ⁻³ .
ACS	Acetil coenzima A sintetasa (acetato tioquinasa).
ADH	Alcohol deshidrogenasa.
ADP	Adenosín difosfato.
AFEX	Explosión con fibra de amoníaco (siglas en inglés).
AL	Aldolasa.
A _{Lig280}	Absorbancia de la solución a 280 nm x FD.
AMP	Adenosín monofosfato.
ASTM	<i>American Society for Testing Materials.</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection.</i>
ATP	Adenosín trifosfato.
B	Productividad volumétrica en biomasa, kg m ⁻³ h ⁻¹ .
B	Parámetro de la ecuación 5.21 y 5.22.
BWX	<i>Beechwood xylan.</i>
C _{HCl}	Concentración de HCl, N.
C _{H2SO4}	Concentración de H ₂ SO ₄ , N.
C	Ensayo realizado con material de poda completa.
C	Parámetro de la ecuación 5.12.
Cl	Ensayo realizado con HCl.
CBH1	Enzima celobiohidrolasa 1.
CBH2	Enzima celobiohidrolasa 2.
CBP	Consolidated Bioprocessing.
CBS	Colección del <i>Westerdijk Fungal Biodiversity Institute</i> (Holanda).
CCR	<i>Carbon catabolite repression.</i>

CECT	Colección Española de Cultivos Tipo (España).
Cel	Célula/s.
CEL	Celulosa, %.
C _F	Concentración de furfural, kg m ⁻³ .
CFT	Compuestos fenólicos totales, kg m ⁻³ .
<i>Cg</i>	<i>Candida guilliermondii</i> .
C _{HMF}	Concentración de HMF, kg m ⁻³ .
CM-Case	<i>Carboxymethyl cellulase</i> .
CEN	Cenizas, %.
C _{LIGs}	Concentración de lignina soluble en medio básico, kg m ⁻³ .
CoA	Coenzima A.
CS	Citrato sintetasa.
C-C	Enlace carbono-carbono.
D	Paso de luz, cm (en la determinación de ácido acético).
dE/dt	Velocidad de producción de etanol por unidad de volumen, kg (etanol) m ⁻³ h ⁻¹ .
D-gal	D-galactosa o concentración de D-galactosa, kg m ⁻³ .
D-glu	D-glucosa o concentración de D-glucosa, kg m ⁻³ .
D-fru	D-fructosa o concentración de D-fructosa, kg m ⁻³ .
D-man	D-manosa o concentración de D-manosa, kg m ⁻³ .
D(so-s)/dt	Tasa volumétrica de consumo de sustrato, kg sustrato m ⁻³ h ⁻¹ .
DSM	<i>German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH</i> (Alemania).
D-xil	D-xilosa o concentración de D-xilosa, kg m ⁻³ .
D-xyl	<i>D-xylose or D-xylose concentration</i> , kg m ⁻³ .
dXi/dt	Velocidad de producción de xilitol por unidad de volumen, kg (xilitol) m ⁻³ h ⁻¹ .
E	Etanol o concentración de etanol, kg m ⁻³ .
E _T	Concentración teórica máxima alcanzable de etanol, kg m ⁻³ .
EC	<i>European Commission</i> .
EIA	Agencia para la Información Energética de los Estados Unidos de América.
EG	Enzima endo-glucanasa.
EL	Enolasa.
EX	Enzima endo-xilanasa.
E967	Xilitol (Directiva Europea 94/35/EC).
FAD	Fibra ácido detergente.

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
FAOSTAT	Base de datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
FD	Factor de dilución.
F _c	Factor de conversión: celulosa (0,9), hemicelulosa (0,88) y grupos acetilo (0,72).
FC	Fermentación en continuo.
FFQ	Fosfofructosa quinasa.
FGI	Fosfoglucosa isomerasa.
FGM	Fosfoglicerolmutasa.
FGQ	Fosfogliceraldehído quinasa.
FND	Fibra neutro detergente.
F _{ph}	Factor de pérdida de hidrólisis: celulosa (1,055) y hemicelulosa (1,155)
FTI	Colección de cultivos del grupo de Microbiología Aplicada de Bioprocesos DEBIQ/FAENQUIL (Brasil).
G	Parámetro en la ecuación 5.25.
GAC	Grupos acetilo, %.
Glu	Glucosa.
GQ	Glicerolquinasa.
G3FD	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.
H	Hidrolizado.
H	Hora/s.
HBA	4-hydroxibenzaldehído.
HD	Hidrolizado con adición de nutrientes propuestos por Debus <i>et al.</i> (1983),
HEM	Hemicelulosa, %.
HF	Nutrientes propuestos por Fonseca <i>et al.</i> (2011).
HL	Hidrolizado sin hoja con adición de nutrientes propuestos por Lindegren <i>et al.</i> (1958).
HMF	5-(hidroximetil)furfural.
HMV	Humedad y materia volátil, %.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
HPLIC	Cromatografía líquida iónica de alta resolución.
HQ	Hexoquinasa.
HR	Hidrolizado de poda sin hoja con adición de nutrientes propuestos por Roberto <i>et al.</i> (1994).
IDEA	Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (España).
IM	Instituto de Microbiología de la Universidad Federal de Río de Janeiro (Brasil).

Ind	Industria.
FPU	<i>Filter Paper Units</i> .
KGB	Tampón: glutamato potásico 100 mM, Tris-acetato 25 mM, acetato de magnesio 10 mM, albúmina de suero bovino 50 $\mu\text{g cm}^{-3}$ β -merepatoetanol 0,5 mM.
K_{La}	Coefficiente de transferencia de oxígeno, h^{-1} .
L-ara	L-arabinosa o concentración de L-arabinosa, kg m^{-3} .
LHW	Pretratamiento con agua líquida caliente (<i>liquid hot 258áter</i>).
LIG	Lignina, %.
LIGi	Lignina insoluble, %.
LIGs	Lignina soluble, %.
Log R_0	Factor de severidad.
Log R_0'	Factor de severidad combinado.
L-MDH	Malato deshidrogenasa.
M	Molaridad.
M_A	Concentración de arabinosa (kg dm^{-3}) x 0,5 L.
m_c	Peso de las cenizas, g.
M_c	Peso de cenizas tras la calcinación, g
m_{fi}	Peso de la fracción insoluble, g.
M_G	Concentración de glucosa (kg m^{-3}) x 0,5 L
M_{HAc}	Concentración de ácido acético (kg m^{-3}) x 0,5 L
m_i	Peso inicial de la muestra, g.
min	Minutos.
M_{PA}	Peso seca del residuo de poda <i>in natura</i> , g.
M_{RS}	Peso seca de residuo sólido – masa de cenizas, g.
m_s	Peso de la muestra seca, g.
M_x	Concentración de xilosa (kg m^{-3}) x 0,5 L.
M_{AcH}	Peso molecular del ácido acético, kg kmol^{-1} (en la determinación de ácido acético).
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida.
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida.
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma oxidada.
NBRC	<i>National Institute of Technology and Evaluation. Biological Resource Center, Tokio (Japón)</i> .
NRRL	<i>Nothern Regional Research Center, Peoria (EEUU)</i> .
NCIM	<i>National Collection of Industrial Microorganisms (India)</i> .

NFCCC	<i>United Nations Framework Convention on Climate Change.</i>
NREL	<i>National Renewable Energy Laboratory, USA.</i>
NSSF	<i>Non-isothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation.</i>
MTCC	<i>Microbial Type Culture Collection and Gene Bank (India).</i>
OSX	<i>Oat Spelt Xylan.</i>
O _{2s}	Presión de oxígeno disuelto en el seno de la fase gaseosa (cálculo del K _{La}).
PC	Poda de olivar completa.
PiD	Piruvato deshidrogenasa.
pK _a	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida K _a .
P _m	Peso molecular, g mol ⁻¹ .
pO ₂	Presión de oxígeno y de oxígeno disuelto en el seno del líquido (cálculo del K _{La}).
Ps	<i>Pichia stipitis.</i>
PSH	Poda de olivar sin hoja.
p/v	Relación peso/volumen.
Q	Caudal volumétrico de aire, dm ³ min ⁻¹ o cm ³ seg ⁻¹ .
Q _E	Productividad volumétrica en etanol, kg (etanol) m ⁻³ h ⁻¹ .
q _{D-glu}	Velocidad específica de consumo de D-glucosa, kg (D-glu) Kg ⁻¹ (biomasa) h ⁻¹ .
q _{D-xil}	Velocidad específica de consumo de D-xilosa, kg (D-xil) Kg ⁻¹ (biomasa) h ⁻¹ .
q _E	Velocidad específica de producción de etanol, kg (etanol) Kg ⁻¹ (biomasa) h ⁻¹ .
q _{Xi}	Velocidad específica de producción de xilitol, kg (xilitol) Kg ⁻¹ (biomasa) h ⁻¹ .
q _s	Velocidad específica de consumo de sustrato, kg (sustrato) Kg ⁻¹ (biomasa) h ⁻¹ .
Q _p	Productividad volumétrica en bioproducto, kg m ⁻³ h ⁻¹ .
Q _{Xi}	Productividad volumétrica en xilitol, kg (xilitol) m ⁻³ h ⁻¹ .
R	Parámetro en la ecuación 5.25.
s	Concentración de sustrato, kg m ⁻³ .
s ₀	Concentración inicial de sustrato, kg m ⁻³ .
S	Ensayo realizado con H ₂ SO ₄ .
SD	Medio sintético con adición de nutrientes propuestos por Debus <i>et al.</i> (1983).
SF	Medio sintético con adición de nutrientes propuestos por Fonseca (2014).
SL	Medio sintético con adición de nutrientes según Lindegren <i>et al.</i> (1958).
S/L	Relación sólido/líquido.
Sh	Ensayo realizado con material de poda sin hoja.
SHF	<i>Separate Hydrolysis and Fermentation.</i>
SR	Medio sintético con adición nutrientes propuestos por Roberto <i>et al.</i> (1994).

SSCF	<i>Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation.</i>
SSF	<i>Simultaneous Saccharification and Fermentation.</i>
T	Temperatura, °C.
T _{ref}	Temperatura de referencia, °C (en la determinación de la severidad de los tratamientos).
T _s	Temperatura del sistema, °C (determinación de la severidad de los tratamientos).
t	Tiempo, h o min.
TAPPI	Technical Association of the Pulp and Paper Industry.
UFMG	Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil.
V _{AcH}	Volumen de muestra, cm ³ (determinación de ácido acético).
V _{AcF}	Volumen final, cm ³ (determinación de ácido acético).
vvm	Volumen de aire por volumen de medio por minuto.
w	Parámetro empírico relacionado con la energía de activación (determinación de la severidad de los tratamientos).
x	Concentración de biomasa, kg m ⁻³ .
x ₀	Concentración inicial de biomasa, kg m ⁻³ .
x ₁	Concentración del biomasa al inicio de la fase de crecimiento exponencial, kg m ⁻³ .
X _C	Conversión fraccional de celulosa, %.
X _H	Conversión fraccional de hemicelulosa, %.
X _i	Xilitol o concentración de xilitol, kg m ⁻³ .
XI	Xilosa isomerasa.
XiH	Xilitol deshidrogenasa.
Xil	Xilosa.
XQ	Xiluloquinasa.
XR	Xilosa reductasa.
Y	Rendimiento en azúcares, %.
Y _{D-gal}	Rendimiento en D-galactosa, %.
Y _{D-fru}	Rendimiento en D-fructosa, %.
Y _{D-glu}	Rendimiento en D-glucosa, %.
Y _{D-xil}	Rendimiento en D-xilosa, %.
Y _{D-xyI}	<i>D-xylose yield</i> , %.
Y _{E/s}	Rendimiento instantáneo en etanol, kg kg ⁻¹ .
Y _{Xi/s}	Rendimiento instantáneo en xilitol, kg kg ⁻¹ .
Y _{E/s} ^G	Rendimiento global en etanol, kg kg ⁻¹ .
Y _{Xi/s} ^G	Rendimiento global en xilitol, kg kg ⁻¹ .

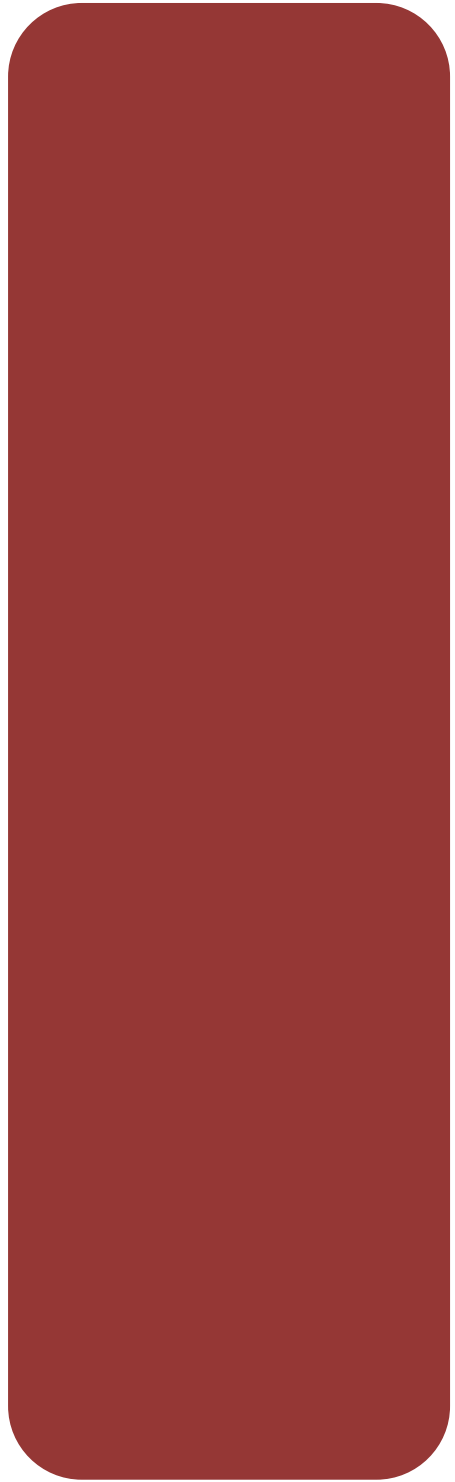
$Y_{xy/s}^G$	Overall yield in xylitol, kg kg ⁻¹ .
$Y_{x/s}^G$	Rendimiento global en biomasa celular, kg kg ⁻¹ .
$Y_{x/s+Ac}^G$	Rendimiento global en biomasa celular, teniendo en cuenta el ácido acético kg kg ⁻¹ .
Y_{L-ara}	Rendimiento en L-arabinosa, %.
$Y_{p/s}$	Rendimiento en bioproducto, kg kg ⁻¹ .
Y_{Tot}	Rendimiento en azúcares totales, %.
$Y_{x/s}$	Rendimiento instantáneo en biomasa celular, kg kg ⁻¹ .
Z	Parámetro de la ecuación 5.19, 5.21 y 5.22.

LETRAS GRIEGAS

α	Parámetro de la ecuación 5.14.
β	Parámetro de la ecuación 5.14.
βG	Enzima beta-glucanasa.
βX	Enzima beta-xilosidasa.
ΔA_{AcH}	Diferencia de las expresiones de absorbancia de la muestra problema y la de referencia (en la determinación de ácido acético).
ΔE	Diferencia entre la concentración inicial y final de etanol, kg m ⁻³ .
Δh	Diferencia de altura manométrica, mm.
Δt	Diferencia entre tiempo inicial y final de considerado, horas.
Δx_i	Diferencia entre la concentración inicial y final de xilitol, kg m ⁻³ .
ϵ	Coeficiente de extinción del NADH a 340 nm, igual a 6,3 dm ³ mmol ⁻¹ cm ⁻¹ (en la determinación de ácido acético).
ϵ_F	Coeficiente de extinción del furfural (146,85 m ³ kg ⁻¹ m ⁻¹).
ϵ_{HMF}	Coeficiente de extinción del 5-hidroximetilfurfural (114,00 m ³ kg ⁻¹ m ⁻¹).
μ_m	Velocidad específica máxima de crecimiento, h ⁻¹
λ	Longitud de onda, nm.
τ	Parámetro de la ecuación 5.20.
ω	Factor aeración en matraz Erlenmeyer. Relación volumen del matraz/volumen del cultivo.



Referencias



Abatzoglou N., Chornet E., Belkacemi K., Overend R.P., "Phenomenological kinetics of complex systems the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation". *Chemical Engineering Science*, 47, 1109-1122 (1992).

Acosta E., Giulietti M., de Almeida e Silva J.B., Derenzo S., "Kinetics of the xylitol crystalization in hydro-alcoholic solution". *Chemical Engineering and Processing*, 47, 2157-2162 (2008).

Agbogbo F.K., Coward-Kelly G., "Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*". *Biotechnology Letters*, 30, 1515-1524 (2008).

Agbogbo F.K., Coward-Kelly G., Torry-Smith M., Wenger K., Jeffries T.W., "The Effect of Initial Cell Concentration on Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136-140, 653-663 (2007).

Agbogbo F.K., Coward-Kelly G., Torry-Smith M., Wenger K.S., "Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*". *Process Biochemistry*, 41, 2333-2336 (2006).

Aguiar W.B., Faria L.F.F., Couto M.A.P.G., Araujo O.Q.F., Pereira N., "Growth model and prediction of oxygen transfer rate for xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*". *Biochemical Engineering Journal*, 12, 49-59 (2002).

Aguilar R., Ramírez J.A., Garrote G., Vázquez M., "Kinetic study of acid hydrolysis of sugarcane bagasse". *Journal of Food Engineering*, 55, 309-318 (2002).

Aguilera J.M., San-Martin R., "Steam hydrolysis of pine *Pinus radiata* sawdust". *Biomass*, 8, 301-313 (1985).

Akpınar O., Erdogan K., Bostancı S., "Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials". *Carbohydrate Research*, 344, 660-666 (2009).

Alfani A., Gallifuoco F., Saporosi A., Spera A., Cantarella M., "Comparison of SHF and SSF process for the bioconversion of steam-exploded wheat straw". *Journal of Industry Microbiology and Biotechnology*, 25, 184-192 (2000).

Almeida J.R.M., Modig T., Petersson A., Hahn-Hägerdal B., Liden G., Gorwa-Grauslund M.F., "Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82, 340-349, 2007.

Alriksson B., Cavka A., Jönsson L.F., "Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocellulose through chemical in-situ detoxification with reducing agent". *Bioresource Technology*, 102, 1254-1254 (2011).

Aouidia F., Dupuy N., Artaud J., Roussos S., Msallem M., Gaime I.P., Hamdia M., "Rapid quantitative determination of oleuropein in olive leaves *Olea europaea* using mid-infrared spectroscopy combined with chemometric analyses". *Industrial Crops and Products*, 37, 292-297 (2012).

Arruda P.V., Felipe M.G., "Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*". *Current Microbiology*, 58 (3), 274-278 (2009).

Arslan Y., Eken-Saraçoğlu N., "Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia Stipitis* to ethanol". *Bioresource Technology*, 101, 8664-8670 (2010).

Arvaniti E., Bjerre A.B., Schmidt J.E., "Wet oxidation pretreatment of rape straw for ethanol production". *Biomass and Bioenergy*, 39, 94-105 (2012).

Avcı A., Saha B.C., Dien B.S., Kennedy G.J., Cotta M.A., "Response surface optimization of corn stover pretreatment using dilute phosphoric acid for enzymatic hydrolysis and ethanol production". *Bioresource Technology*, 130, 603-612 (2013).

Bak J.S., Ko J.K., Han Y.H., Lee B.C., Choi I., Kim K.H., "Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment". *Bioresource Technology*, 100, 1285-1290 (2009a).

Bak J.S., Ko J.K., Choi I.G., Park Y.C., Seo J.H., Kim K.H., "Fungal pretreatment of lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ethanol from rice straw". *Biotechnology and Bioenergy*, 104, 471-482 (2009b).

Balat M. "Mechanisms of thermochemical biomass conversion processes. Part 1: reactions of pyrolysis". *Energy Sources Part A*, 30, 620–35 (2008).

Balat M., Balat H., "Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel". *Applied Energy*, 86, 2273-2282 (2009).

Bals B., Murnen H., Allen M., Dale B., "Ammonia fiber expansion (AFEX) treatment of eleven different forages: Improvements to fiber digestibility in vitro", *Animal Feed Science and Technology*, 155, 147–155 (2010).

Banerjee G., Car S., Scott-Craig J.S., Borrusch M.S., Bongers M., Walton J.D., "Synthetic multi-component enzyme mixtures for deconstruction of lignocellulosic biomass". *Bioresource Technology*, 101(90), 97–105 (2010).

Barbosa M.F.S., de Medeiros M.B., de Mancilha I.M., Schneider H., Lee H., "Screening of yeast for production of xylitol from D-xylitol and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*". *Journal of Industrial Microbiology*. 3, 241–251 (1988).

Bellido C., Bolado S., Coca M., Lucas S., González-Benito G., García-Cubero M.T., "Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*". *Bioresource Technology*, 102, 10868-10874 (2011).

Browning, B.L., "Determination of lignin. In: *Methods of Wood Chemistry*". Interscience Publishers, New York, 785–823. (1967)

Camacho F., González P., Jurado E., Paez M.P., "Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos (II)". *Ingeniería Química*, 18(203), 117-123 (1986).

Canettieri E.V., Moraes G.J.R., Carvalho J.A., Almeida e Silva J.B., "Optimization of acid hydrolysis from the hemicelulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology". *Bioresource Technology*, 98, 422-428 (2007).

Canilha L., Carvalho W., Felipe M.G.A., Almeida e Silva J.B., "Xylitol production from wheat straw hemicelulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation". *Brazilian Journal of Microbiology*, 39 (2), 333-336 (2008).

Canilha L., “Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo”, Tesis Doctoral, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Brasil (2006).

Canilha L., Carvalho W., Almeida-Silva J.B., 2005. “Influence of medium composition on xylitol bioproduction from wheat straw hemicellulosic hydrolysate”. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21, 1087–1093 (2005).

Canilha L., Almeida e Silva J.B., Solenzal A.I.N., “Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchange resins for xylitol production”. *Process Biochemistry*, 39, 1909-1912 (2004).

Carvalho F., Duarte L.C., Lopes S., Parajó J.C., Pereira H., Gírio F.M., “Evaluation of the detoxification of brewery’s spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941”. *Process Biochemistry*, 40, 1215-1223 (2005).

Carvalho D.M., de Queiroz J.H., Colodette J.L., “Hydrothermal and acid pretreatments improve ethanol production from lignocellulosic biomasses”. *Bioresources*, 12(2), 3088-3107 (2017).

Castro J.F., Parra C., Yáñez M.S., Rojas J., Teixeira-Mendoza R., Baeza J., Freer J., “Optimal pretreatment of *Eucalyptus globulus* by hydrothermolysis and alkaline extraction for microbial production of ethanol and xylitol”. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 52 (16), 5713–5720 (2013).

Cavka A., Alriksson B., Ahnlund M., Jönsson L.J., “Effect of sulfur oxyanions on lignocellulose-derived fermentation inhibitors”. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 2592-2599 (2011).

Cavka A., Jönsson L.J., “Detoxification of lignocellulosic hydrolysates using sodium borohydride”. *Bioresource Technology*, 136, 368-376 (2013).

Chahak D.S., McGuire S., Pikor H., Moble G., “Production of cellulase complex by *Trichoderma reesei*, Rut C-30 on lignocellulose and its hydrolytic potential”. *Biomass*, 2, 127-37 (1982).

Chandel A.K., Kapoor R.K., Singh A., Kuhad R.C., "Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501". *Bioresource Technology*, 98, 1947–1950 (2007).

Chang K.L., Thitikorn-amornJ., Hsieh J.F., Ou B.M., Chen S.H., Ratanakhanokchai K., Huang P.J., Chen S.T., "Enhanced enzymatic conversion with freeze pretreatment of rice straw". *Biomass and Bioenergy*, 35, 90–95 (2011).

Chaudhary G., Singh L.K., Ghosh S., "Alkaline pretreatment methods followed by acid hydrolysis of '*Saccharum spontaneum*' for bioethanol production". *Bioresource Technology*, 124, 111-118 (2012).

Cheng K.K., Cai B.Y., Zhang J.A., Ling H.Z., Zhou Y.J., Ge J.P., Xu J.M., "Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process". *Biochemical Engineering Journal*, 38, 105-109 (2008).

Cherubini F., Ulgiati S., "Crop residues as raw materials for biorefinery systems – A LCA case study". *Applied Energy*, 87, 47–57 (2010).

Chisti Y. "Biodiesel from microalgae beats bioethanol". *Trends in Biotechnology*, 26, 126-131 (2008).

Chum H.L., Johnson D.K., Black S.K., Overend R.P., "Organosolv pretreatment for enzymic hydrolysis of poplars. 2. Catalyst effects and the combined 'severity parameter'". *Applied Biochemistry Biotechnology*, 24-25, 1–14 (1990a).

Chum H.L., Johnson D.K., Black S.K., Overend R.P., "Pretreatment-catalyst effects and the combined severity parameter". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24 (25), 1–14 (1990b).

Chundawat S.P., Venkatesh B., Dale B.E., "Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility". *Biotechnology and Bioengineering*, 96(2), 219–231 (2007).

Chung B.Y., Lee J.T., Bai H.W., Kim U.J., Bae H.J., Wi S.G., Cho J.Y., "Enhanced enzymatic hydrolysis of poplar bark by combined use of gamma ray and dilute acid for bioethanol production". *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 1003-1007 (2012).

Clark T.A., Mackie K.L., "Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*". *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*, 24/25, 1-14 (1984).

Claassen P.A.M., Van Lier J.B., López-Contreras A.M., van Niel E.W.J., Sijtsma L., Stams A.J.M., de Vries S.S., Weusthuis R.A., "Utilization of biomass for the supply of energy carriers". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 741-755 (1999).

Converti A., Perego P., Domínguez J.M., Silva S.S., "Effect of temperatura on the microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus*". *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 339-345 (2001).

Converti A., Perego P., Domínguez J.M., "Xylitol production from hardwood hemicellulose hydrolysates by *Pachisolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii*, and *Candida guilliermondii*". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 82, 141-151 (1999).

Cortez D.V., Roberto I.C., "Individual and interaction effects of vanillin and syringaldehyde on the xylitol formation by *Candida guilliermondii*". *Bioresource Technology*, 101, 1858-1865 (2010).

Covas M.I., "Olive oil and cardiovascular system". *Pharmacological Research*, 55, 175-186, (2007).

Cruz J.M., Domínguez J.M., Domínguez H., Parajó J.C., "Solvent extraction of hemicellulose wood hydrolysate: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity". *Food and Chemistry*, 67, 147-153 (1999).

Cuevas M., "Hidrólisis enzimática del hueso de aceituna. Fermentación de hidrolizados con levaduras". Tesis Doctoral, Universidad de Jaén, Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales (2007).

Cuevas M., Sánchez S., Bravo V., Cruz N., García J.F., "Fermentation of enzymatic hydrolysates from olive stones by *Pachysolen tannophilus*". Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 84, 461-467 (2009).

Cuzens J.C., Miller J.R., "Acid hydrolysis of bagasse for ethanol production". Renewable Energy, 10, 285-290 (1997).

Da Costa C.J.A., Marques J.E.J., Luciana Rocha B.G.L., Ponte M.V.R., "Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters". Bioresource Technology, 139, 249-256 (2013).

De Faveri D., Perego P., Converti A., Del Borghi M., "Xylitol recovery by crystallization from synthetic solutions and fermented hemicellulosic hydrolyzates". Chemical Engineering Journal, 90, 291-298 (2002).

Debus D., Methner H., Shulze D., Dellweg H., "Fermentation of xylose with the yeast *Pachysolen tannophilus*". European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 17 (5), 287-291 (1983).

Dehkhoda A., Brandberg T., Taherzadeh M.J., "Comparison of vacuum and high pressure evaporated wood hydrolyzate for ethanol production by repeated fed-batch using flocculating *Saccharomyces cerevisiae*". Bioresources, 4 (1), 309-320 (2009).

Demirbas A., "Combustion systems for biomass fuel". Energy Source Part A, 29, 303-12 (2007).

Demirbas A., "Competitive liquid biofuels from biomass". Applied Energy, 88, 17-28 (2011).

Deng X.X., Ho N.W.Y., "Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the cloned xylulokinase gen". Applied Biochemistry and Biotechnology, 24-25, 193-199 (1990).

Delgenes J.P., Moletta R., Navarro J.M., "Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas*

mobilis, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*". *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 220-225 (1996).

Delgenes J.P., Moletta R., Navarro J.M., "Continuous production of ethanol from a glucose, xylose and arabinose mixture by a flocculent strain of *Pichia stipitis*". *Biotechnology Letters*, 10 (10), 725-730 (1988).

Dien B.S., Ximenes E.A., O'Bryan P.J., Moniruzzaman M., Li X.L., Balan V., Dale B., Cotta M.A., "Enzyme characterization for hydrolysis of AFEX and liquid hot-water pretreated distillers' grains and their conversion to ethanol". *Bioresource Technology*, 99, 5216-5225 (2008).

Directiva 94/35/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de junio de 1994, relativa a los edulcorantes utilizados en los productos alimenticios (DO n° L 237 de 10. 9. 1994, p. 3).

Diz J., Cruz J.M., Domínguez H., Parajó J.C., "Xylitol production from *Eucalyptus* wood hydrolysates in low-cost fermentation media". *Food Technology and Biotechnology*, 40(3), 191-197 (2002).

Domínguez J.M., Gong C.S., Tsao G.T., "Production of xylitol from D-xylose by *Debaryomyces hansenii*". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 63-65, 117-127 (1997a).

Domínguez J.M., Ningjun C., Gong C.S., Tsao G.T., "Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corn cobs for xylitol production by yeast". *Bioresource Technology*, 64, 85-90 (1997b).

Du Preez J.C., "Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts". *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 944-965 (1994).

Du Preez J.C., Bosch M., Prior B.A., "Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration". *Enzyme and Microbial Technology*, 8, 360-364 (1986).

Eggeman T., Elander R.T., "Process and economic analysis of pretreatment technologies". *Bioresource Technology*, 96, 2019–2025 (2005).

Eken-Saraçoğlu N., Arslan Y., "Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*". *Biotechnology Letters*, 22, 855–858 (2000).

Elkins J.G., Raman B., Keller M., "Engineered microbial systems for enhanced conversion of lignocellulosic biomass". *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 657-662 (2010).

Felipe M.G.A. en: Saha B.C., Hayashi K., "Lignocellulose Biodegradation". American Chemical Society (ACS Symposium Series), Washington D.C., 2004 p. 300.

Felipe M.G.A., Vitolo M., Mancilha I.M., Silva S.S., "Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (1997) 18, 251–254 (1997).

Felipe M.G.A., Alves L.A., Silva S.S., Roberto I.C., Mancilha I.M., Almeida e Silva J.B., "Fermentation of *Eucalyptus* hemicellulosic hydrolysate to xylitol by *Candida guilliermondii*". *Bioresource Technology*, 56, 281-283 (1996).

Felipe M.G.A., Mancilha I.M., Vitolo M., Roberto I.C., Silva S.S., Rosa S.A.M., "Preparation of xylitol by fermentation of hydrolysate of hemicellulose obtained from sugarcane bagasse". *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 36 (1), 103-114 (1993).

Fernández A., Puerta C., "La poda del Olivo". Simposium Científico-Técnico Expoliva 1995. Expoliva 95.Agricultura, 384-387 (1995).

Fernández-Bolaños J., Felizón B., Heredia A., Rodríguez R., Guillén R., Jiménez A., "Steam-explosion of olive stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose". *Bioresource Technology*, 68(2), 121-132 (2001).

Fischer E., Stahel R., "Zur kenntniss der Xylose", *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 24 (1), 528-539 (1891).

Fonseca G.B., “Avaliação das condições do tratamento biológico de hidrolisados hemicelulósicos visando melhorar a produção de etanol por *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*”. Tesis Doctoral, Universidad de São Paulo, Escuela de Ingeniería de Lorena, Departamento de Biotecnología, Brasil (2014).

Fonseca G.B., Puentes J.G., Mateo S., Sánchez S., Moya A.J., Roberto I.C., “Detoxification of rice straw and olive tree pruning hemicellulosic hydrolysates employing *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on the ethanol production by *Pichia stipitis*”. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61 (40), 9658-9665 (2013).

Fonseca G.B., “Avaliação da biotransformação de compostos fenólicos por *Saccharomyces cerevisiae* visando reduzir a toxicidade de hidrolisados hemicelulósicos em processos fermentativos”. Exame de qualificação de doutorado, Universidade de São Paulo (E.E.L.), Lorena (2011).

Foyle, T., Jennings L., P. Mulcahy P., “Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw”. Bioresource Technology, 98, 3026-3036 (2007).

Freitas J.V., Routolo L.A.M., Farinas C.S., “Adsorption of inhibitors using a CO₂-activated sugarcane bagasse fly ash for improving enzymatic hydrolysis and alcoholic fermentation in biorefineries”. Fuel, 1-9 (2019).

Galbe M., Zacchi, G., “Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production”. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, 108, 45-68 (2007).

Galbe M, Zacchi G. “A review of the production of ethanol from softwood”. Applied Microbiology and Biotechnology, 59, 618-28 (2002).

Gao D., Chundawat S.P., Krishnan C., Balan V., Dale B.E., “Mixture optimization of six core glycosyl hydrolases for maximizing saccharification of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreated corn stover”. Bioresource Technology, 101, 2770-2781 (2010).

García-Aparicio M.P., Ballesteros M., Manzanares P., Ballesteros I., González A., Negro, M.J., “Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw”. Applied Biochemistry and Biotechnology, 136-140 (1-12), 353-365. (2007).

García-Cubero M.T., González-Benito G., Indacochea I., Coca M., Bolado S., "Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw". *Bioresource Technology*, 100, 1608-1613 (2009).

García J.F., Cuevas M., Bravo V., Sánchez S., "Ethanol production from olive prunings by autohydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*". *Renewable Energy*, 35, 1602-1608 (2010).

García J.F., "Aprovechamiento del residuo de poda de olivo. Hidrólisis ácida y fermentación con *Candida tropicalis*". Tesis Doctoral, Universidad de Jaén, Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales (2007).

Garrote G., Kabel M.A., Schols H.K., Falqué E., Domínguez H., Parajó J.C., "Effects of *Eucalyptus globulus* Autohydrolysis Conditions on the Reaction Products". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 9006-9013 (2007).

Garrote G., Domínguez H., Parajó J.C., "Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production". *Journal of Food Engineering*, 52, 211-8 (2002a).

Garrote G., Domínguez H., Parajó J.C., "Interpretation of deacetylation and hemicellulose hydrolysis during hydrothermal treatments on the basis of the severity factor", *Process Biochemistry*, 37, 1067-1073 (2002b).

Gonçalves D.B., Batista A.F., Rodrigues M.Q.R.B., Nogueira K.M.V., Santos V.L., "Ethanol production from macaúba (*Acrocomia aculeata*) press cake hemicellulosic hydrolysate by *Candida boidinii* UFMG14". *Bioresource Technology* 146, 261-266 (2013).

Gorsich S.W., Dien B.S., Nichols N.N., Slininger P.J., Liu Z.L., Skory C.D., "Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(3), 339-349 (2006).

Grethlein H. E., Converse A. O., "Flow reactor for acid hydrolysis on pretreatment of cellulosic biomass". *Liquid Fuel Developments*, 97-128. (1983).

Hajney G. J., "Biological utilization of wood for production of chemicals and Foodstuffs". Research Paper FPL 385, Forest Products Laboratory, Madison, WI (1981).

Hamelinck C.N., van Hooijdonk G., Faaij A.P.C., "Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long-term". *Biomass and Bioenergy*, 28(4), 384-410 (2005).

Hamelinck C.N., van Hooijdonk G., Faaij A.P.C., "Prospects for ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance as development progresses". Informe NWS-E-2003-55. Utrecht University Utrecht, Holanda (2003).

Hahn-Hägerdal B., Karhumaa K., Fonseca C., Spencer-Martins I., Gorwa-Grauslund M.F., "Towards industrial pentose-fermenting yeast strains". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 937-953 (2007).

Hahn-Hägerdal B., Pamment N., "Microbial pentose metabolism". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113-116, 1207-1209 (2004).

Herrera A., Téllez S.J.L., González J.J.C., Ramírez J.A., Vázquez M., "Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum Straw at atmospheric pressure". *Journal of Food and Engineering*, 63, 103-109 (2004).

Henriksson G., Lennholm H., "4. Cellulose and Carbohydrate Chemistry". En: *Pulp and paper chemistry and technology. Vol 1, Wood Chemistry and Wood Biotechnology*. Ek M. (Ed.), Gellerstedt G. (Ed.), Henriksson G. (Ed.). De Gruyter, pp. 71-100, Berlín (2009).

Hernández-Salas J.M., Villa-Ramírez M.S., Veloz-Rendón J.S., Rivera-Hernández K.N., González-César R.A., Plascencia-Espinosa M.A., Trejo-Estrada S.R., "Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse". *Bioresource Technology*, 100, 1238-1245 (2009).

Hickert L.R., Cunha-Pereira F., Souza-Cruz P.B., Rosa C.A., Ayub M.A.Z., "Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate". *Bioresource Technology*, 131, 508-514 (2013).

Hong E., Kim J., Rhie S., Ha S.J., Kim J., Ryu Y., "Optimization of Dilute Sulfuric Acid Pretreatment of Corn Stover for Enhanced Xylose Recovery and Xylitol Production". *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21, 612-619 (2016).

Howard R. L., Abotsi E., Jansen-van-Rensburg E. L., Howard S., "Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production". *African Journal of Biotechnology*, 2, 602-619 (2003).

Hsu T.C., Guo G.L., Chen W.H., Hwang W.S., "Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis". *Bioresource Technology*, 101, 4907-4913 (2010).

Hu Z., Wen Z., "Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment". *Biochemical Engineering Journal*, 38, 369-78 (2008).

Humanes G.J., "Poda y recolección en olivar". En: *Olivicultura*, Fundación La Caixa, pp. 77-82, Barcelona (1994).

Ikeuchi T., Azuma M., Kato J., Ooshima H., "Screening of microorganisms for xylitol production and fermentation behavior in high concentration of xylose". *Biomass and Bioenergy*, 16, 333-339 (1999).

Inalbon M.C., Mocchiutti P., Zanuttini M., "The deacetylation reaction in *Eucalyptus* wood: Kinetics and effects on the effective diffusion". *Bioresource Technology*, 100, 2254-2258 (2009).

Ingram T., Kai-Wörmeyer K., Ixcaraguá J.C.L., Bockemühl V., Antranikian G., Brunner G., Irina-Smirnova I., "Comparison of different pretreatment methods for lignocellulosic materials. Part I: Conversion of rye straw to valuable products". *Bioresource Technology*, 102, 5221-5228 (2011).

Inui M., Vertès A.A., Yukawa H., "Advances in Fermentation technologies". En: *Biomass to biofuels: Strategies for global industries*. Vertès A.A. (Ed.), Qureshi N. (Ed.), Blaschek H.P. (Ed.), Yukawa H. (Ed.). John Wiley & Sons, Ltd, pp. 311-330, Hoboken (2010).

Jensen J.R., Morinelly J.E., Gossen K.R., Brodeur-Campbell M.J., Shonnard D.R., "Effects of dilute acid pretreatment conditions on enzymatic hydrolysis monomer and oligomer sugar yields for aspen, balsam, and switchgrass". *Bioresource Technology*, 101, 2317-2325 (2010).

Jeya M., Zhang Y.W., Kim I.W., Lee J.K., "Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM". *Bioresource Technology*, 100, 5155-5161 (2009).

Jiménez A.L., López B.F., Sánchez P.I., "Caracterización de residuos de la tala de olivo para la obtención de pastas celulósicas". *El Papel*, Julio-Agosto, 57 (1990).

Jurado M., Prieto A., Martínez-Alcalá A., Martínez A.T., Martínez M.J., "Laccase detoxification of steam-explosion wheat straw for second generation bioethanol". *Bioresource Technology*, 100, 6378-6384 (2009).

Kamal S.M.M., Mahamad N.L., Abdullah A.G.L., Abdullah N., "Detoxification of sago trunk hydrolysate using activated charcoal for xylitol production". *Procedia Food Science*, 1, 908-913 (2011).

Keller F.A., Bates D., Ruiz R., Nguyen Q., "Yeast adaptation on softwood prehydrolysate". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70-72, 137-148 (1998).

Kim K., Hong J., "Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis". *Bioresource Technology*, 77, 139-144 (2001).

Kim J.H., Han K.C., Koh Y.H., "Optimization of fed-batch fermentation for xylitol production by *Candida tropicalis*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29 (1), 16-19 (2002).

Kim T., Lee Y., Kim P., Kim C.S., OH D., "Increased xylitol production rate during long term cell recycle fermentation of *Candida tropicalis*". *Biotechnology Letters*, 26, 623-627 (2004).

Kumar A., Singh L.K., Ghosh S., "Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulosic acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*". *Bioresource Technology*, 100, 3293-3297 (2009).

Kumar R., Wyman C.E., "Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies". *Biotechnology Progress*, 25, 302-14 (2009).

Kurtzman C.P., Suzuki M., "Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*". *Mycoscience*, 51-1, 2-14 (2010).

Kurtzman C.P., "42 *Pichia* E.C. Hansen emend. Kurtzman". En: *The Yeasts - A Taxonomic Study*. Kurtzman C.P. (ed.), Fell J.W. (ed.). Elsevier Science B.V. (IV ed.), Amsterdam, pp. 273-352 (1998).

Laadan B., Almeida J.R., Rådström P., Hahn-Hägerdal B., Gorwa-Grauslund M., "Identification of an NADH-dependent 5-hydroxymethylfurfural-reducing alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast*, 25, 191-198 (2008).

Laplace J.M., Delgenes J.P., Moletta R., Navarro J.M., "Combined alcoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selected microbial strains: process consideration in relation to ethanol tolerance". *Biotechnology Letters*, 13 (6), 445-450 (1991).

Lavarack B.P., Griffin G.J., Rodman D., "The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products". *Biomass and Bioenergy*, 23 (5), 367-380 (2002).

Lee Y.Y., Iyer P., Torget R.W., "Dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass". *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 65, 93-115 (1999).

Lee J.W., Houtman C.J., Kim H.Y., Choi I.G., Jeffries T.W., "Scale-up study of oxalic acid pretreatment of agricultural lignocellulosic biomass for the production of bioethanol". *Bioresource Technology*, 102, 7451-7456 (2011).

Lee J.W., Jeffries T.W., "Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors". *Bioresource Technology*. 102, 5884-5890 (2011).

Lee J.W., Rodrigues R.C.L.B., Jeffries T.W., "Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of oxalic acid pretreated corncob assessed with response surface methodology". *Bioresource Technology*, 100, 6307-6311 (2009).

Lee J.W., Gwak K.S., Park J.Y., Park M.J., Choi D.H., Kwon M., "Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi". *Journal of Microbiology*, 45, 485-491 (2007).

Li B.Z., Balan V., Yuan Y.J., Dale B.E., "Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment". *Bioresource Technology*, 101, 1285-1292 (2010).

Liang J., Chen X., Wang L., Wei X., Wang H., Lu S., Li Y., "Subcritical carbon dioxide-water hydrolysis of sugarcane bagasse pith for reducing sugars production". *Bioresource Technology*, 228, 147-155 (2017).

Lihong C., Xiaobing L., Wanyu W., Jingdun J., Guoqing L., Fei D., "The status, predicament and countermeasures of biomass secondary energy production in China". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 6212-6219 (2012).

Lin Z.X., Zhang H.M., Ji X.J., Chen J.W., Huang H., "Hydrolytic enzyme of cellulose for complex formulation applied research". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164, 23-33 (2011).

Lin Y., Tanaka S., "Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospect". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 627-642 (2006).

Linde M., Jakobsson E.L., Galbe M., Zacchi G., "Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production". *Biomass and Bioenergy*, 32, 326-332 (2008).

Lindgren C.C., Nagai S., Nagai H., "Induction of respiratory deficiency in yeast by manganese, copper, cobalt and nickel". *Nature*, 182 (1958) 446-448.

Lis M.J., Carrillo F., Colom X., Martínez D., Nogués F., 2000. "Hidrólisis ácida de paja de avena previa a su tratamiento enzimático". Determinación de un modelo cinético. *Ingeniería Química*, 369, 181-186 (2000).

Liu Z.H., Qina L., Pang F., Jinc M.J., Li B.Z., Kang Y., Dale B.E., Yuan Y.J., "Effects of biomass particle size on steam explosion pretreatment performance for improving the enzyme digestibility of corn stover". *Industrial Crops and Products*, 44, 176-184 (2013).

Liu Z.L., Blaschek H.P., "Biomass conversion inhibitors and in situ detoxification". En: *Biomass to biofuels: Strategies for global industries*. Vertès A.A., Qureshi N., Blaschek H.P., Yukawa H. (Eds.) John Wiley & Sons, Ltd, pp. 233-259, Hoboken (2010).

Liu Z.L., Moon J., Andersh B.J., Slininger P.J., Weber S., "Multiple genemediated NAD(P)H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Saccharomyces cerevisiae*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 743-753 (2008).

Liu Z.L., Slininger P.J., Gorsich S.W., "Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124, 451-460 (2005).

Lloyd T.A., Wyman C.E., "Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids". *Bioresource Technology*, 96, 1967-1977 (2005).

Lohmeier-Vogel E.M., Sopher C.R., Lee H., "Intracellular acidification as a mechanism for inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeast". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 75-81 (1998).

Luo C., Brink D., Blanch H., "Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolysate to ethanol". *Biomass and Bioenergy*, 22, 125-138 (2002).

Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S., "Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 3, 506-577 (2002).

Ma H., Liu W.W., Chen X., Wu Y.J., Yu Z.L., "Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment". *Bioresource Technology*, 100, 1279–1284 (2009).

Maiorella B.L. "Ethanol". En: *Comprehensive biotechnology* vol. 3. Moo-Young M. (ed.), Pergamon Press, pp. 861–914, Oxford (1985).

Malherbe S., Cloete T.E., "Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications". *Re/Views. Environmental Science and Biotechnology*, 1, 105–14 (2002).

Marchal R., Rebeller M., Vandecasteele J.P. "Direct bioconversion of alkali-pretreated straw using simultaneous enzymatic hydrolysis and acetone-butanol fermentation". *Biotechnology Letters*, 6, 523-528. (1984).

Martín C., Klinke H.B., Thomsen A.B., "Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse". *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 426–432 (2007).

Martín C., Galbe M., Wahlbom C.F., Hahn-Hägerdal B., Jönsson L.J., "Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*". *Enzyme Microbiology and Technology*, 31, 274–282 (2002).

Martin R.S., Aguilera J.M., "Steam pretreatment and enzymatic production of D-glucose from *Eucalyptus globulus*". *Biomass*, 15, 281–289 (1988).

Martínez E.A., Silva S.S., Almeida e Silva J.B., Solenzal A.I.N., Felipe M.G.A., "The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. guilliermondii*". *Process Biochemistry*, 38, 1677-1683 (2003).

Martínez M.L., Sánchez S., Bravo V., "Production of xylitol and etanol by *Hansenula polymorpha* from hydrolysates of sunflower stalks with phosphoric acid". *Industrial Crops and Products*, 40, 160-166 (2012).

Mateo S., Puentes J.G., Moya A.J., Sánchez S., "Ethanol and xylitol production by fermentation of acid hydrolysate from olive pruning with *Candida tropicalis* NBRC 0618". *Bioresource Technology*, 190, 1-6 (2015).

Mateo S., Roberto I.C., Sánchez S., Moya A.J., "Detoxification of hemicellulosic hydrolysate from olive tree pruning residue". *Industrial Crops and Products*, 49, 196-203 (2013a).

Mateo S., Puentes J.G., Sánchez S., Moya A., "Oligosaccharides and monomeric carbohydrates production from olive tree pruning biomass". *Carbohydrate Polymers*, 93, 416-423 (2013b).

Mateo S., "Producción de xilitol con *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7426 y *Candida tropicalis* NBRC 0618. Aplicación al residuo de poda de olivo". Tesis Doctoral, Universidad de Jaén, Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales (2011).

Mateo S., Moya A.J., Puentes J.G., Bravo V., Sánchez S., "Autohydrolysis and acid hydrolysis of olive-tree pruning debris. Fermentation by *Debaryomyces hansenii* to obtain ethanol and xylitol". 18th European Biomass Conference and Exhibition, ETA-Florence Renewable Energies, 1994-1997 (2010).

Mayerhoff D.V.L.Z., Roberto I.C., Silva S.S., "Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains". *Biotechnology letters*, 19 (5), 407-409 (1997).

McMillan J.D., "Pretreatment of lignocellulosic biomass". En: *Enzymatic conversion of biomass for fuel production*. Himmel M.E. (ed.), Baker J.O. (ed.), Overend R.P. (ed.). American Chemical Society, pp. 292-324, Washington, D.C. (1994).

McParland J., Grethlein E., Converse A.O., "Kinetics of acid hydrolysis of corn stover". *Solar Energy*, 28, 55-63 (1982).

Misra S., Raghuvanshi S., Saxena R.K., "Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*". *Carbohydrate Polymers*, 92, 1596-1601 (2013).

Molina-Alcaide E., Yáñez-Ruiz D.R., "Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review". *Animal Feed Science and Technology*, 147, 247-264 (2008).

Montané D., Salvadó J., Farriol X., Jollez P., Chornet E., “Phenomenological kinetics of woods delignification: application of a time-dependent rate constant and a generalized severity parameter to pulping and correlation of pulp properties”. *Wood Science Technology*, 28, 387–402 (1994).

Montané D., Overend R.P., Chornet E., “Kinetic models for nonhomogeneous complex systems with a time-dependent rate constant”. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 76(1), 56-68 (1998).

Moreno, A.D., Ibarra, D., Ballesteros, I., Fernández, J.L., Ballesteros, M., “Ethanol from laccase-detoxified lignocellulose by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*—Effects of steam pretreatment conditions, process configurations and substrate loadings”. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 94-103 (2013).

Morita T.A., Silva S.S., “Inhibition of microbial xylitol production by acetic acid and its relation with fermentative parameters”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86, 801-808 (2000).

Moshkelani M., Marinova M., Perrier M., Paris J., “The forest biorefinery and its implementation in the pulp and paper industry: Energy overview”. *Applied Thermal Engineering* 50, 1427-1436 (2013).

Mosier N.S., Hendrickson R., Brewer M., Ho N., Sedlak M., Dreshel R., Welch G., Dien B.S., Aden A., Ladisch M.R., “Industrial scale-up of pH-controlled liquid hot water pretreatment of corn fiber for fuel ethanol production”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 125(2), 77-97 (2005).

Moya A.J., Peinado S., Mateo S., Fonseca B.G., Sánchez S., “Improving bioethanol production from olive pruning biomass by deacetylation step prior acid hydrolysis and fermentation processes”. *Bioresource Technology*, 220, 239-245 (2016).

Moya A.J. “Hidrólisis y fermentación de residuo de poda de olivo”. Tesis Doctoral, Universidad de Jaén, Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales (1997).

Muktham R., Ball A.S., Bhargava S.K., Bankupalli S., "Bioethanol production from non-edible de-oiled *Pongamia pinnata* seed residue-optimization of acid hydrolysis followed by fermentation". *Industrial Crops and Products*, 94, 490-497 (2016).

Mussatto S.I., "Biomass pretreatment with acids". En: *Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery*, Mussatto S.I. (ed), El Sevier, pp. 169-185, Nueva York (2016).

Mussatto S.I., Moncada J., Roberto I.C., Cardona C.A., "Techno-economic analysis for brewer's spent grains use on a biorefinery concept: The Brazilian case". *Bioresource Technology*, 148, 302-310 (2013).

Mussatto S.I., Dragone G., Guimarães P.M.R., Silva J.P.A., Carneiro L.M., Roberto I.C., Vicente A., Domingues L., Teixeira J.A., "Technological trends, global market, and challenges of bioethanol production". *Biotechnology Advances*, 28, 817-830 (2010).

Mussatto S.I., Roberto I.C., "Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*". *Process Biochemistry*, 43, 540-546 (2008).

Mussatto S.I., Dragone G., Roberto I.C., "Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*". *Process Biochemistry*, 40, 3801-3806 (2005).

Mussatto S.I., Roberto I.C., "Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol". *Science of Food and Agriculture*, 85 (14), 2453-2460 (2005).

Mussatto S.I., Santos J.C., Roberto I.C., "Effect of pH and activated charcoal adsorption on hemicellulosic hydrolysate detoxification for xylitol production". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 590-596 (2004).

Mussatto S.I., Roberto I.C., "Kinetic behavior of *Candida guilliermondii* yeast during xylitol production from highly concentrated hydrolysate". *Process Biochemistry*, 39, 1433-1439 (2004).

Mussatto S.I., Roberto I.C., "Xylitol production from high xylose concentration: evaluation of the fermentation in bioreactor under different stirring rates". *Journal of Applied Microbiology*, 95, 331-337 (2003).

Naik S.N., Vaibhav V.G., Prasant K.R., Ajay K.D., "Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 578-597 (2010).

Narayanaswamy N., Faik A. Goetz J.D., Gu T., "Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production". *Bioresource Technology*, 102, (13), 6995-7000 (2011).

Nelson D.L., Cox M.M., "Glycolysis, Gluconeogenesis, and the Pentose Phosphate Pathway". En: *Principles of Biochemistry*, Lehninger A.L. (ed.), W.H. Freeman And Company (IV ed.), pp. 521-559, Nueva York (2004).

Nguyen Q.A., Tucker M.P., Keller F.A., Beaty D.A., Konner K.M., Eddy F.P., "Dilute acid hydrolysis of softwoods". *Applied Biochemical Biotechnology*, 77-79, 133-142 (1999).

Nichols N.N., Dien B.S., Cotta M.A., "Fermentation of bioenergy crops into ethanol using biological abatement for removal of inhibitors". *Bioresource Technology*, 101, 19, 7545-7550 (2010).

Nigam J.N., "Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*". *Journal of Biotechnology*, 87, 17-27 (2001a).

Nigam J.N., "Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 145-150 (2001b).

Nigam J.N., "Bioconversion of water-hyacinth *Eichhornia crassipes* hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast". *Journal of Biotechnology*, 97, 107-116 (2002).

Öhgren K., Bengtsson O., Gorwa-Grauslund M.F., Galbe M., Hahn-Hägerdal B., Zacchi G., "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 (2006).

Olsson L., Hahn-Hägerdal B., "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production". *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 312-331 (1996).

Ordóñez R., Rodríguez A., Giráldez J.V., Espejo A. J. "Manejo de suelo en olivar. Implicaciones sobre la intensidad de pérdida de suelo y agua por escorrentía, contaminación de aguas superficiales". *Agricultura*, 74, 384-392 (2005).

Ortega N.J.M. "La poda del Olivo". Ministerio de Agricultura, Dirección General de Agricultura. Madrid (1969).

Overend R.P., Chornet E., "Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments". *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, A321, 523-536 (1987).

Paiva-Martins F., Barbosa S. Pinheiro V., Mourão J.L., Outor-Monteiro D., "The effect of olive leaves supplementation on the feed digestibility, growth performances of pigs and quality of pork meat". *Meat Science*, 82, 438-443 (2009).

Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition". *Bioresource Technology*, 74, 25-33 (2000).

Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Szengyel Z., Zacchi G., Reczey K., "Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment". *Enzyme Microbiology and Technology*, 20, 286-293 (1997).

Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M., "Biotechnological production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates". *Bioresource Technology*, 66, 25-40 (1998a).

Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M., "Biotechnological production of xylitol. Part 1: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis". *Bioresource Technology*, 65, 191-201 (1998b).

Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M., "Xylitol production from *Eucalyptus* wood hydrolysates extracted with organic solvents". *Process Biochemistry*, 32 (7), 599-604 (1997a).

Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M., "Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates". *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 18-24 (1997b).

Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M., "Xylitol from wood: study of some operational strategies". *Food Chemistry*, 57 (4), 531-535 (1996).

Parajó J.C., Santos V., Del Río F., "Hidrólisis de la fracción hemicelulósica de la madera de pino. I. Cinética y distribución de productos en operación a presión atmosférica". *Afinidad*, 457, 161-170 (1995).

Park N., Kim H.Y., Koo B.W., Yeo H., Choi I.G., "Organosolv pretreatment with various catalysts for enhancing enzymatic hydrolysis of pitch pine (*Pinus rigida*)". *Bioresource Technology*, 101, 7046-7053 (2010).

Pasquini D., Borges P.M.T., Ferreira L.E., Curvelo S.A., "Extraction of lignin from sugar cane bagasse and *Pinus taeda* wood chips using ethanol-water mixtures and carbon dioxide at high pressures". *Journal of Supercritical Fluids*, 36, 31-39 (2005).

Pereira R.S., Mussatto S.I., Roberto I.C., "Inhibitory action of toxic compounds present in lignocellulosic hydrolysates on xylose to xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 91-98 (2011).

Pérez J., Muñoz-Dorado J., De-la-Rubia T., Martínez J., "Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview". *International Microbiology*, 5, 53-63 (2002).

Pessani N.K., Atiyeh H.K., Wilkins M.R., Bellmer D.D., Banat I.M., "Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3: The effect of enzyme loading, temperature and higher solid loadings". *Bioresource Technology*, 102, 10618-10624 (2011).

Petersson A., Almeida J.R., Modig T., Karhumaa K., Hahn-Hägerdal B., Gorwa-Grauslund M.F., Lidén G., "A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance". *Yeast*, 23, 455–464 (2006).

Ping Y., Ling H.Z., Song G., Ge J.P., "Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*". *Biochemical Engineering Journal*, 75, 86-91 (2013).

Prakash G., Varma A.J., Prabhune A., Shouche Y., Rao M., "Microbial production of xylitol from D-xylose and sugarcane bagasse hemicellulose using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*". *Bioresource Technology*, 102, 3304-3308 (2011).

Prakasham R.S., Rao R.S., Hobbs P.J., "Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects". *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 3 (1), 8-36 (2009).

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. "Microbiología". McGraw-Hill, New York. 114-136 (1999).

Prior B.A., Day D.F., "Hydrolysis of ammonia-pretreated sugar cane bagasse with cellulase, β -glucosidase, and hemicellulase preparations". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 146,151–164 (2008).

Pryor S.W., Nahar N., "Deficiency of cellulase activity measurements for enzyme evaluation". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 1737–1750 (2010).

Quintero R.R., "Crecimiento microbiano" En: *Ingeniería Bioquímica. Teoría y aplicaciones*, Quintero R.R. (ed), Alhambra Mexicana, S.A., pp. 27-38, México 13, D.F. (1981).

Rahman S.H.A., Choudhury J.P., Ahmad A.L., "Production of xylose from oil palm empty fruit bunch fiber using sulfuric acid". *Biochemical Engineering Journal*, 30, 97-103 (2006).

Rao R.S., Jyothi C.P., Prakasham R.S., Sarma P.N., Rao L.V., "Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*". *Bioresource Technology*, 97, 1974-1978 (2006).

Ray M.J., Leak D.J., Spanu P.D., Murphy R.J., "Brown rot fungal early stage decay mechanism as a biological pretreatment for softwood biomass in biofuel production". *Biomass and Bioenergy*, 34, 1257-1262 (2010).

Reese E., Siu R., Levinson H., "The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis". *Journal of Applied Bacteriology*, 59, 485-497 (1950).

Ribeiro L., Pinheiro V., Outor-Monteiro D., Mourão J., Bezerra R.M.F., Dias A.A., Bennett R.N., Marques G., Rodrigues M.A.M., "Effects of the dietary incorporation of untreated and white-rot fungi (*Ganoderma resinaceum* Boud) pre-treated olive leaves on growing rabbits". *Animal Feed Science and Technology*, 173, 244-251 (2012).

Rivas B., Domínguez J.M., Domínguez H., Parajó J.C., "Bioconversion of posthydrolysed autohydrolysis liquors: an alternative for xylitol production from corn cobs". *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 431-438 (2002).

Roberto I.C., Mussatto S.I., Rodrigues C.L.B.R., "Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor". *Industrial Crops and Products*, 17, 171-176 (2003).

Roberto I.C., de Mancilha I.M., Sato, S., "Influence of K_La on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol". *Bioprocess Engineering*, 21, 505-508 (1999).

Roberto I.C., Sato S., Mancilha I.M., "Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*". *Journal of Industrial Microbiology*, 16, 348-350 (1996).

Roberto I.C., Felipe M.G.A., Mancilha I.M., Vitolo M., Sato S., Silva S.S., "Xylitol production by *Candida guilliermondii* as an approach for the utilization of agroindustrial residues". *Bioresource Technology*, 51, 255-257 (1995).

Roberto I.C., Mancilha I.M., De Souza C.A., Felipe M.G.A., Sato S., De Castro H.F., "Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*". *Biotechnology Letters*, 16, 1211-1216 (1994).

Roberto I.C., Laci L.S., Barbosa M.F.S., Mancilha I.M., "Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol". Process Biochemistry, 26, 15-21 (1991).

Rocha, G.J.M., 2000. Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio. IQSC, USP, São Carlos, Brazil, Ph.D. (doutorado em química).

Rodrigues D.C.G.A., Silva S.S., Felipe M.G.A., "Using response-surface methodology to evaluate xylitol production by *Candida guilliermondii* by fed-batch process with exponential feeding rate". Journal of Biotechnology, 62, 73-77 (1998).

Rodrigues R.C.L.B., Felipe M.G.A., Almeida e Silva J.B., Vitolo M., "Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables". Process Biochemistry, 38, 1231-1237 (2003).

Rodrigues R.C.L.B., Felipe M.G.A., Almeida e Silva J.B., Vitolo M., Gómez P.V., "The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activate charcoal before or after vacuum evaporation". Brazilian Journal of Chemical Engineering, 18, 299-311 (2001).

Rogalinski T., Ingram T., Brunner G., "Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures". Journal of Supercritical Fluids, 47, 54-63 (2008).

Romaní A., Garrote G., Alonso J.L., Parajó J.C., "Bioethanol production from hydrothermally pretreated *Eucalyptus globules* wood". Bioresource Technology, 101, 8706-8712 (2010).

Rosillo-Calle F., Groot P., Hemstock S.L., Woods J., "The Biomass Assessment Handbook", Rosillo-Calle F. (ed.), Groot P. (ed.), Hemstock S.L. (ed.), Woods J. (ed.), Earthscan from Routledge, Oxford (2007).

Rowell M.R., "Opportunities for lignocellulosic materials and composites" En: Emerging technologies for material and chemicals from biomass. Rowell R.M. (ed.), Schultz T.P. (ed), Narayan R.R. (ed.). American Chemical Society, pp. 12-27, Washington D.C. (1992).

Saidur R., Abdelaziz E.A., Demirbas A., Hossain M.S., Mekhilef S., "A reiview on biomass as a fuel boilers". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15, 2262-2289 (2011).

Saha B.C., "Hemicellulose bioconversion". *Journal of Industry Microbiology and Biotechnology*, 30, 279-291 (2003).

Salido S., Pérez-Bonilla M., Adams R., Altarejos J., Phenolic Components and Antioxidant Activity of Wood Extracts from 10 Main Spanish Olive Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 6493-6500 (2015).

Samayan I.P., Schall C.A., "Saccharification of ionic liquid pretreated biomass with commercial enzyme mixtures". *Bioresource Technology*, 101, 3561-3566 (2010).

Sampaio F.C., Chaves-Alves V.M., Converti A., Lopes F.M., Cavalcante J.L. "Influence of cultivation conditions on xylose-to-xylitol bioconversion by a new isolate of *Debaryomyces hansenii*". *Bioresource Technology*, 99, 502-508 (2008).

Sampaio F.C., Moraes C.A., de Faveri D., Perego P., Converti A., Passos F.M.L., "Influence of temperature and pH on xylitol production from xylose by *Debaryomyces hansenii* UFV-170". *Process Biochemistry*, 41, 675-681 (2006).

Sanchez B., Bautista J., "Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*". *Enzyme Microbial Technology*, 10, 315-318 (1988).

Sánchez C., "Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi". *Biotechnology Advances*, 27, 185-194 (2009).

Sanchez P. "Procédé de production de sirop de xylose par hydrolyse acide de sorgho". Tesis Doctoral. INPT, Toulouse (1990).

Sánchez S., Bravo V., Moya A.J., Castro E., Camacho F., "Influence of temperature on the fermentation of D-xylose by *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol and xylitol". *Process Biochemistry*, 39, 673-679 (2004).

Sánchez S., Bravo V., Castro E., Moya A.J., Camacho F., "The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 77, 641-648 (2002a).

Sánchez S., Bravo V., Moya A.J., Moya M., Romero I., Torrero R., San Miguel M.P. "Aprovechamiento del residuo de poda de olivar". *Ingeniería Química*. 391, 194-202 (2002b).

Sannigrahi P., Miller S.J., Ragauskas A.J., "Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine". *Carbohydrate Research*, 345, 965-970 (2010).

Sathesh-Prabu C., Murugesan A.G., "Potential utilization of sorghum field waste for fuel ethanol production employing *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*". *Bioresource Technology*, 102, 2788-2792 (2011).

Schirmer-Michel A.C., Flôres S.H., Hertz P.F., Ayub M.A., "Effect of oxygen transfer rates on alcohols production by *Candida guilliermondii* cultivated on soybean hull hydrolysate". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82 (2), 223-228 (2009).

Schirmer-Michel A.C., Flôres S.H., Hertz P.F., Matos G.S., Ayub M.A., "Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075". *Bioresource Technology*, 99, 2898-2904 (2008).

Scordia D., Cosentino S.L., Lee J.W., Jeffries T.W., "Effectiveness of dilute oxalic acid pretreatment of *Miscanthus x giganteus* biomass for ethanol production". *Biomass and Bioenergy*, 59, 540 -548 (2013).

Scordia D., Cosentino S.L., Lee J.W., Jeffries T.W., "Bioconversion of giant reed (*Arundodonax* L.) hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Scheffersomyces stipitis* CBS6054". *Biomass and Bioenergy*, 39, 296-305 (2012).

Scordia D., Cosentino S.L., Jeffries T.W., "Second generation bioethanol production from *Saccharum spontaneum* L. ssp. *aegyptiacum* (Willd.) Hack." *Bioresource Technology*, 101(14), 5358-5365 (2010).

Seillière G., "Sur un cas d'hydrolyse diastasique de la cellulose du coton, après dissolution dans la liqueur de Schweitzer". C.R. Société de Biologie, 61, 205-206 (1906).

Senturk-Ozer S., Gevgilili H., Dilhan M. Kalyon D.M., "Biomass pretreatment strategies via control of rheological behavior of biomass suspensions and reactive twin screw extrusion processing". Bioresource Technology, 102, 9068-9075 (2011).

Shatalov A.A., Pereira E., "Xylose production from giant reed (*Arundodonax* L.): Modeling optimization of dilute acid hydrolysis". Carbohydrate Polymers, 87, 210-217 (2012).

Shen F., Saddler F.S., Liu R., Lin L., Deng S., Zhang Y., Yang G., Xiao H., Li Y., "Evaluation of steam pretreatment on sweet sorghum bagasse for enzymatic hydrolysis and bioethanol production". Carbohydrate Polymers, 86, 1542-1548 (2011).

Shi N., Liu Q.Y., Wang T.J., Zhang Q., Ma L.L., Cai C.L., "Production of 5-hydroxymethylfurfural and furfural from lignocellulosic biomass in water-tetrahydrofuran media with sodium bisulfate". Chinese Journal of Chemical and Physics, 28, 650-656 (2015).

Sierra-Álvarez R., Lettinga G., "The methanogenesis toxicity of wastewater lignins and lignin related compounds". Journal of Chemistry Technology and Biotechnology, 50, 443-455 (1991).

Sills D.L., Gossett J.M., "Assessment of commercial hemicellulases for saccharification of alkaline pretreated perennial biomass". Bioresource Technology, 102, 1389-1398 (2011).

Silva C.J.S.M., Mussatto S.I., Roberto I.C., "Study of xylitol production by *Candida guilliermondii* on a bench bioreactor". Journal of Food Engineering, 75, 115-119 (2006).

Silva C.J.S.M., Roberto I.C., "Improvement of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 previously adapted to rice straw hemicellulosic hydrolysate". Letters in Applied Microbiology, 32, 248-252 (2001a).

Silva C.J.S.M., Roberto I.C., "Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using a response surface methodology". Process Biochemistry, 36, 1119-1124 (2001b).

Silva C.J.S.M., Roberto I.C., "Statistical screening method for selection of important variables on xylitol biosynthesis from rice straw hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037". *Biotechnology and Technology*, 13, 743-747 (1999).

Silva D.D.V., Felipe M.G.A., Manchilha I.M., Luchese R.H., Silva S.S., "Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate". *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 248-254 (2004).

Silva J.P.A. Carneiro L.M., Roberto I.C., "Treatment of rice straw hemicellulosic hydrolysates with advanced oxidative processes: a new and promising detoxification method to improve the bioconversion process". *Biotechnology for Biofuels*, 6:23 (2013).

Silva J.P.A., Mussatto S.I., Roberto I.C., Teixeira J.A., "Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*". *Renewable Energy*, 37, 259-265 (2012).

Silva J.P.A., Mussatto S.I., Roberto I.C., Teixeira J.A., "Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor". *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28, 151-156 (2011).

Silva J.P., Mussatto S.I., Roberto I.C., "The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate". *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 162(5), 1306-1315 (2010).

Silva S.S., Roberto I.C., Felipe M.G.A., Mancilha I.M. "Batch fermentation of xylose for xylitol production in stirred tank bioreactor". *Process Biochemistry*. 31, 549-553 (1996),

Singh A., Bajar S., Bishnoi N.R., "Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture". *Fuel*, 116, 699-702 (2014).

Singh I., Mok M., Christensen A.M., Turner A.M., Hawley J.A., "The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function". *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 18, 127-132 (2008).

Slininger P.J., Dien B.S., Gorsich S.W., Liu Z.L., "Nitrogen source and mineral optimization enhance D-xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 1285-1296 (2006).

Soleimani M., Tabil L., Panigrahi S., "Bio-production of polyalcohol (xylitol) from lignocellulosic resources a review". *The Canadian Society for Bioengineering*, 6, 1-18, (2006).

Sorensen H.R., Pedersen S., Meyer A.S., "Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble arabinoxylan". *Enzymes Microbiology Technology*, 40, 908-918 (2007).

Sorensen H.R., Meyer A.S., Pedersen S., "Enzymatic hydrolysis of water-soluble wheat arabinoxylan. 1. Synergy between α -L-arabinofuranosidases, endo-1,4- β -xylanases, and β -xylosidases". *Biotechnology and Bioengineering*, 81(6), 726-731 (2003).

Stoutenburg R.M., Perrotta J.A., Nakas J.P., "Overcoming inhibitors in a hemicellulosic hydrolysate: improving fermentability by feedstock detoxification and adaptation of *Pichia stipitis*". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 1939-1945 (2011).

Sun Y., Cheng J., 2002. "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review". *Bioresource Technology*. 83, 1-11 (2002).

Taherzadeh M.J., Karimi K., "Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review". *Bioresources*, 2(3), 472-499 (2007a).

Taherzadeh M.J., Karimi K., "Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review". *Bioresources*, 2(4), 707-738 (2007b).

Talhaoui N., Gómez A.M., León L., De la Rosa R., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., Determination of phenolic compounds of 'Sikitita' olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents 'Arbequina' and 'Picual' olive leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 58, 28-34 (2014).

Taniguchi M., Suzuki H., Watanabe D., Sakai K., Hoshino K., Tanaka T., "Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw". Journal of Bioscience and Bioenergy, 100, 637-643 (2005).

Teixeira L.C., Linden J.C., Schroeder H.A., "Simultaneous saccharification and cofermentation of peracetic acid-pretreated biomass". Applied Biochemistry and Biotechnology, 84-86, 111-127 (2000).

Teixeira L.C., Linden J.C., Schroeder H.A., "Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel". Renewable Energy, 16, 1070-1073 (1999).

Teleman A., "Hemicellulose and Pectins". En: Pulp and Paper Chemistry and Technology. Vol 1: Wood Chemistry and Wood Biotechnology. Ek M., Gellerstedt G., Henriksson G. (Eds.) De Gruyter, Chapter 4, pp 101-120 (2009).

Téllez S.J.L., Ramírez J.A., Vázquez M., "Mathematical modelling of hemicellulosic sugar production from sorghum Straw". Journal of Food Engineering, 52, 285-291 (2002a).

Téllez S.J.L., Ramírez J.A., Vázquez M., "Modelling of the hydrolysis of sorghum Straw at atmospheric pressure". Journal of the Science of Food and Agriculture, 82, 505-512 (2002b).

Thompson D., Grethlein E., "Design and evaluation of a plug flow reactor for acid hydrolysis of cellulose". Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development, 18(3), 371-378 (1979).

Tian S., Zhou G., Yan F., Yu Y., Yang X., "Yeast strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification". Biotechnology Advances, 27, 656-660 (2009).

Travaini R., Otero M.D.M., Coca M., Roberto Da-Silva R., Bolado S., "Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation". BioresourceTechnology, 133, 332-339 (2013).

United Nations, Framework Convention on Climate Change, NCCCC, "Clarifications of definition of biomass and consideration of changes in carbon pools due to a CDM project activity", EB-20, Appendix 8 (2005).

Unrean P., Nguyen N.H.A., "Metabolic pathway analysis of *Sheffersomyces (Pichia) stipitis*: effect of oxygen availability on ethanol synthesis and flux distributions". *Bioenergy and Biofuels*, 94, 1387-1398 (2012).

Van Dyk J.S., Pletschke B.I., "A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - Factors affecting enzymes, conversion and synergy". *Biotechnology Advances*, 30, 1458-1480 (2012).

Van Walsum G.P., Shi H., "Carbonic acid enhancement of hydrolysis in aqueous pretreatment of corn stover". *Bioresource Technology*, 93, 217-226 (2004).

Van Soest P.J., Wine R.H., "Use of detergents in the analysis of fibrous feed. IV. The determination of plant cell wall constituents". *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 50, 50-55 (1967).

Vandeska E., Amarley S., Kuzmanova S., Jeffries T. "Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*", *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11, 213-218 (1995).

Varnai A., Siika-aho M., Viikari L., "Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose". *Enzyme Microbial Technology*, 46, 185-193 (2010).

Vaz de Arruda P., dos Santos J.C., de Cássia R.L.B.R., da Silva D.D.V., Yamakawa C.K., Rocha G.J.M., Nolasco J.J., Pradella J.G.C., Vaz Rossell C.E., Felipe, M.G.A., "Scale up of xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037". *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 47, 297-302 (2017).

Vilar J., Cárdenas J.R., "El sector internacional de la elaboración de aceite de oliva: un estudio descriptivo de los 56 países productores". *GEA - Centro Internacional de Excelencia para Aceite de Oliva* (ed.), Úbeda (2012).

Villarreal M.L.M., Prata A.M.R., Felipe M.G.A., Almeida e Silva J.B., "Detoxificación procedures of *Eucalyptus* hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*". Enzyme and Microbial Technology, 40, 17-24 (2006).

Viñals V.M., Mancilha M.I.; Almeida e Silva, J.B., Solenzal, A.I.N., "Métodos de purificación de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar para la obtención de xilitol". Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 5(2), 129-134 (2006).

Wang W., Yang S., Hunsinger G.B., Pienkos P.T., Johnson D.K., "Connecting lignin-degradation pathway with pre-treatment inhibitor sensitivity of *Cupriavidus necator*". Frontiers in microbiology, 5, 27 (doi: 10.3389/fmicb.2014.00247) (2014).

Wang W., Yuan T., Wang K., Cui B., Dai Y., "Statistical optimization of cellulase production by the brown rotfungi, *Fomitopsis palustris*, and its application in the enzymatic hydrolysis of LHW-pretreated woody biomass". Process Biochemistry, 47, 2552-2556 (2012).

Wang Z., Keshwani D.R., Redding A.P., Cheng J.J., "Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass". Bioresource Technology, 101, (10) 3583-3585 (2010).

Winkelhausen E., Kuzmanova S., "Microbial conversion of D-xylose to xylitol". Journal of Fermentation and Bioengineering", 86 (1), 1-14 (1998).

Wyman C.E., "What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol". Trends in Biotechnology, 25(4), 153-157 (2007).

Xu C., Ma F., Zhang X., Chen S., "Biological pretreatment of corn stover by *Irpex lacteus* for enzymatic hydrolysis". Journal of Agriculture Food and Chemistry, 58, 10893-10898 (2010).

Yachmenev V., Condon B., Klasson T., Lambert A., "Acceleration of the enzymatic hydrolysis of corn stover and sugar cane bagasse celluloses by low intensity uniform ultrasound". Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 3, 25-31 (2009).

Yahashi Y., Horitsu H., Kawai K., Suzuki T., Takamizawa K., "Production of xylitol from D-Xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-glucose feeding". Journal of Fermentation and Bioengineering, 81 (2), 148-152 (1996).

Yang M., Kuitinen S., Zhang J., Keinänen M., Pappinen A., "Effect of dilute acid pretreatment on the conversion of barley straw with grains to fermentable sugars", Bioresource Technology, 146, 444-450 (2013).

Zhang S., Keshwani D.R., Xu X., Hanna M.A., "Alkali combined extrusion pretreatment of corn stover to enhance enzyme saccharification". Industrial Crops and Products, 37, 352-357 (2012).

Zhang X., Xu C., Wang H., "Pretreatment of bamboo residues with *Coriolus versicolor* for enzymatic hydrolysis". Journal of Bioscience and Bioenergy, 104, 149-151 (2007).

Zhang Y.H.P., Lynd L.R., "Toward and aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Non complexed cellulose systems". Biotechnology and Bioenergy, 8, 797-882 (2004).

Zhu S., Wu Y., Yu Z., Liao J., Zhang Y., "Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis". Process Biochemistry, 40, 3082-3086 (2005).

Direcciones de internet

Activa Jaén, Galería de imágenes. [En línea], [consulta: 20 de septiembre de 2011]. Disponible en: <http://activa.jaen.es/area-prensa/noticias/detalles.html?uid=64be481f-bdca-11e0-b25c-79fb06ed8546>

Agencia para la Información Energética de los Estados Unidos de América (EIA). [En línea], [consulta: 15 de Febrero de 2018]. Disponible en: <https://search.usa.gov>

Cabeza E., Bejarano J., "Influencia de las cubiertas vegetales sobre la epidemiología y control de la verticilosis del olivo". En: Simposium Científico-Técnico Expoliva. Jaén (2005). [en línea], [consulta: 20 de septiembre de 2011]. Disponible en: <http://www.expoliva.com/expoliva2005/simposium/comunicaciones/OLI-59.pdf>

Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. “Avance de superficies y producciones”. [En línea], [consulta: 15 de abril de 2018] Disponible en: <http://www.juntadeandalucia.es>

Diario El País, Fotografías de archivo [en línea], [consulta: 20 de septiembre de 2011] Disponible en: <http://www.elpais.com/fotografia/empresas/sectores/Olivar/elpdiaeco/20070708elpnegemp4/Ies/>

Di Pardo, J. “Outlook for biomass ethanol production and demand”. [En línea], [consulta: 10 de octubre de 2009] Disponible en: <http://www.eia.doe.gov/oiaf/analysispaper/pdf/biomass.pdf>

Dodson D., “Wood pulp extract stronger than carbon fiber or Kevlar”. New Atlas (2012). [En línea], [consulta: 10 de diciembre de 2012]. Disponible en: <http://www.gizmag.com/cellulose-nanocrystals-stronger-carbon-fiber-kevlar/23959/>

Domínguez J.M., Salgado J.M., Rodríguez N., Cortés S., “Biotechnological production of xylitol from agro-industrial wastes”. Food Additive, Prof. El-Samragy Y. (ed.), IntechOpen, 139-156 (2012). Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/food-additive/biotechnological-production-of-xylitol-from-agro-industrial-wastes>

FAOSTAT, [en línea], [consulta: 10 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

Global Petrol Prices, [en línea], [consulta: 15 de septiembre de 2019]. Disponible en: https://es.globalpetrolprices.com/USA/ethanol_prices/

Hamelinck C., “Biofuels and Food Security: Risks and opportunities”. Ecofys Netherlands B.V., (2013). [En línea], [consulta: 20 de marzo de 2018]. Disponible: <https://www.ecofys.com/files/files/ecofys-2013-biofuels-and-food-security.pdf>

Industry Experts, [en línea], [consulta: 15 de septiembre de 2019]. Disponible en: <http://industry-experts.com/verticals/food-and-beverage/xylitol-a-global-market-overview>

Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDAE). Capacidad de producción de biocarburantes en 2016. [En línea], [consulta: 15 de Abril de 2018]. Disponible en: <http://informeestadistico.idae.es/t8.htm>

Lenihan P., Orozco A., O'Neill E., Ahmad M.N.M., Rooney D.W., Mangwandi C., Walker G.M., "Kinetic Modelling of Dilute Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass". Biofuel Production-Recent Developments and Prospects, Dos Santos M.A.B. (ed.), IntechOpen, 293-309 (2011). Disponible online en: <http://www.intechopen.com/books/biofuel-production-recent-developments-andprospects/kinetic-modelling-of-dilute-acid-hydrolysis-of-lignocellulosic-biomass>

Ministerio de Medio Ambiente Medio Rural y Marino. "Anuario de Estadística 2010". Catálogo General de Publicaciones Oficiales. NIPO: 770-09-265-1, Madrid (2010). [En línea] Disponible en: <http://www.marm.es/es/estadistica/temas/anuario-de-estadistica/>

National Renewable Energy Laboratory (NREL). "*Biomass Characterization Capabilities*" [en línea], [consulta: 20 de enero de 2013]. Disponible en: http://www.nrel.gov/learning/re_biomass.html.

Provedo - Variedades de olivo, "Recopilación de variedades de olivo", [en línea] [consulta: 19 de enero de 2017], Disponible en: <http://www.variedadesdeolivo.com/index.php>

Universidad Nacional Autónoma de México, "Ficha de seguridad XII, etanol". [en línea], [consulta: 20 de enero de 2018], Disponible en: <http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/12etanol.pdf> (2018).



Apéndice

Leyendas de las Tablas 2.25 y 2.26

1

AP1.1 Leyenda de la Tabla 2.25. Estudios de fermentación con diferentes cepas de *C. guilliermondii*

Medios de cultivo:

(1) Hidrolizado hemicelulósico de cáscara de soja concentrado y detoxificado con carbón activo con (kg m⁻³): 7,78 de D-xilosa, 6,46 de L-arabinosa, 3,88 de D-manosa y 0,38 de D-glucosa (previamente a la detoxificación).

(2) Hidrolizado hemicelulósico de cáscara de soja concentrado con la composición de (1).

(3) Hidrolizado hemicelulósico de paja de trigo concentrado detoxificado con carbón activo y con (kg m⁻³): 50 de D-xilosa, 24 de D-glucosa, 10 de L-arabinosa, 1,0 de (NH₄)₂SO₄ y 5,0 de salvado de arroz.

(4) Medio sintético con (kg m⁻³): 50 de D-xilosa, 0,5 de extracto de levadura, 1,25 de urea, 1,1 de KH₂PO₄, 0,5 de MgSO₄ 7H₂O, 0,5 de CaCl₂ 2H₂O, 0,5 de ácido cítrico, 1,44 de FeSO₄ 7H₂O, 0,01 de MnSO₄ 4H₂O, 0,012 de ZnSO₄ 7H₂O, 0,001 de CuSO₄ 5H₂O, 0,002 de CaCl₄ 6H₂O, 0,0014 de NaMoO₄ 2H₂O, 0,003 de H₃BO₃, 0,00036 de KI, 0,0005 de Al₂(SO₄)₃.

(5) Medio sintético con (kg m⁻³): 80,0 de D-xilosa, 15,0 de D-glucosa, 3,0 de (NH₄)₂SO₄, 0,1 de CaCl₂ 2H₂O y 20% (v/v) de extracto de salvado de arroz en un medio tamponado con 68,9 de KH₂PO₄ y 22,1 K₂HPO₄.

(6) Medio sintético con (kg m⁻³): 80,0 de D-xilosa, 15,0 de D-glucosa, 3,0 de (NH₄)₂SO₄, 0,1 de CaCl₂ 2H₂O y 20% (v/v) de extracto de salvado de arroz, 1,3 de ácido acético, 0,3 de ácido ferúlico, 0,4 de siringaldehído en un medio tamponado con 68,9 de KH₂PO₄ y 22,1 K₂HPO₄.

(7) Medio sintético con (kg m⁻³): 80,0 de D-xilosa, 15,0 de D-glucosa, 3,0 de (NH₄)₂SO₄, 0,1 de CaCl₂ 2H₂O y 20% (v/v) de extracto de salvado de arroz, 0,8 de siringaldehído.

(8) Hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar concentrado, detoxificado con carbón activo y con (kg m⁻³): 51 de D-xilosa, 4,3 de L-arabinosa, 3 de D-glucosa, 4,4 de ácido acético, 3 de (NH₄)₂SO₄, 0,1 de CaCl₂ 2H₂O y 20 de salvado de arroz.

(9) Hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar concentrado, detoxificado mediante 'liming' y con (kg m⁻³): 40 de D-xilosa, 8,8 de D-glucosa, 7,7 de L-arabinosa, 4,3 de ácido acético, 2 de (NH₄)₂SO₄, 0,1 de CaCl₂ 2H₂O y 20 de salvado de arroz.

(10) Hidrolizado hemicelulósico de eucalipto concentrado, detoxificado mediante 'liming' y con (kg m^{-3}): 52,92 de D-xilosa, 19,51 de D-glucosa, 24,27 de ácido acético, 0,25 de furfural, 0,42 de HMF, 2 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 20 de salvado de arroz.

(11) Hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar, concentrado, detoxificado mediante 'liming' y suplementado con (kg m^{-3}): 5 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 10 de salvado de arroz.

(12) Hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar, concentrado, detoxificado mediante 'overliming' y con (kg m^{-3}): 54,5 de D-xilosa, 10,7 de D-glucosa, 7,7 de L-arabinosa, 4,7 de ácido acético, 5 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 10 de salvado de arroz.

(13) Hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz, concentrado, detoxificado mediante 'overliming' y con (kg m^{-3}): 61,0 de D-xilosa, 18,9 de D-glucosa, 11,0 de L-arabinosa, 1,5 de ácido acético 5 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 10 de salvado de arroz.

(14) Medio sintético compuesto por (kg m^{-3}): 55,0 de D-xilosa, 20,0 de extracto de salvado de arroz, 2,0 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

(15) Medio sintético compuesto por (kg m^{-3}): 55,0 de D-xilosa, 20,0 de extracto de salvado de arroz, 2,0 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,7 de glicerol y 0,1 de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

(16) Medio sintético compuesto por (kg m^{-3}): 55,0 de D-xilosa, 20,0 de extracto de salvado de arroz, 6,5 de glicerol, 2,0 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0,1 de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

(17) Hidrolizado hemicelulósico de *Eucalyptus grandis*, concentrado, detoxificado por membranas de intercambio iónico a pH 5,5 y suplementado con (kg m^{-3}): 20,0 de extracto de salvado de arroz, 2,0 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

(18) Hidrolizado hemicelulósico de *Eucalyptus grandis*, concentrado, detoxificado por membranas de intercambio iónico a pH 1,8 y suplementado con (kg m^{-3}): 20,0 de extracto de salvado de arroz, 2,0 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

(19) Hidrolizado hemicelulósico de malta de cebada compuesto por (kg m^{-3}): 22,97 de D-xilosa, 10,24 de L-arabinosa, 1,51 de D-glucosa, 4,01 de compuestos fenólicos totales, 1,25 de ácido acético, 0,66 de furfural y 0,10 de HMF.

(20) Hidrolizado hemicelulósico de malta de cebada suplementado a partir de '19' y compuesto por (kg m^{-3}): 84,21 de D-xilosa, 38,75 de L-arabinosa, 6,00 de D-glucosa, 3,93 de compuestos fenólicos totales, 1,22 de ácido acético, 0,61 de furfural y 0,08 de HMF.

(21) Hidrolizado hemicelulósico de malta de cebada concentrado compuesto por (kg m^{-3}): 88,62 de D-xilosa, 40,70 de L-arabinosa, 6,08 de D-glucosa, 10,38 de compuestos fenólicos totales, 3,83 de ácido acético y 0,10 de HMF.

(22) Hidrolizado hemicelulósico de malta de cebada concentrado y detoxificado con carbón activo, compuesto por (kg m^{-3}): 86,94 de D-xilosa, 39,96 de L-arabinosa, 6,02 de D-glucosa, 5,38 de compuestos fenólicos totales, 1,53 de ácido acético y 0,01 de HMF.

(23) Hidrolizado hemicelulósico de malta de cebada concentrado, diluido hasta obtener una concentración de azúcares similar a '19' y suplementado de nuevo con (kg m^{-3}): 86,52 de D-xilosa, 39,77 de L-arabinosa, 5,93 de D-glucosa, 3,34 de compuestos fenólicos totales, 1,05 de ácido acético.

(24) Hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz concentrado, detoxificado y diluido hasta obtener una composición de (kg m^{-3}): 91,01 de D-xilosa, 18,8 de L-arabinosa, 15,09 de D-glucosa, 1,26 de ácido acético, 0,075 de HMF y 0,007 de furfural.

(25) Hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz concentrado, detoxificado y diluido hasta obtener una composición de $90,33 \text{ kg m}^{-3}$ de D-xilosa, y el resto de componentes no se indica.

(26) Hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz, concentrado, detoxificado por 'liming' y con una composición de 60 kg m^{-3} de D-xilosa y no se indica el resto de componentes.

(27) Hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz, concentrado, detoxificado por 'liming' y con una composición de 90 kg m^{-3} de D-xilosa, y no se indica el resto de componentes.

(28) Hidrolizado hemicelulósico de malta de cebada concentrado, neutralizado y con una concentración inicial de D-xilosa de 75 kg m^{-3} .

(29) Medio sintético elaborado con la misma concentración de azúcares que '30'.

(30) Hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz, concentrado, detoxificado por 'liming' y con una concentración de D-xilosa de $81,4 \text{ kg m}^{-3}$.

(31) Hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz, concentrado, detoxificado por 'liming' y con una concentración de D-xilosa próxima a 78 kg m^{-3} .

(32) Hidrolizado hemicelulósico de *Eucalyptus globulus*, concentrado, neutralizado y con una composición (kg m^{-3}) de: 55,5 de D-xilosa, 1,1 de D-glucosa, 1,1 de L-arabinosa, 8,1 de ácido acético, 0,25 de HMF, 0,12 de furfural, 1,25 de urea, 1,1 de KH_2PO_4 y 0,5 de extracto de levadura.

(33) Hidrolizado hemicelulósico de cáscara de soja, concentrado, detoxificado con carbón activo y con una composición (kg m^{-3}) de: 13,3 de D-xilosa, 11,1 de L-arabinosa, 6,7 de D-manosa, 1,3 de D-glucosa, 0,4 de ácido acético y 0,2 de compuestos fenólicos.

(34) Hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar, concentrado, detoxificado con óxido cálcico y retroalimentado por 40 kg m^{-3} de D-xilosa y otros azúcares en el momento inicial, y también suplementado con 20 kg m^{-3} de extracto de salvado de arroz, 5 kg m^{-3} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0,1 \text{ kg m}^{-3}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, retroalimentado con hidrolizado compuesto por 73 de D-xilosa y otros azúcares a las 13 h del inicio del proceso.

(35) Hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz, concentrado, detoxificado con carbón activo y seguido de una neutralización para obtener un hidrolizado compuesto por (kg m^{-3}): 91,01 de D-xilosa, 18,80 de L-arabinosa, 15,09 de D-glucosa, 1,21 de ácido acético, 0,08 de HMF y 0,01 de furfural.

AP1.2. Leyenda de la Tabla 2.26. Estudios de fermentación con diferentes cepas de *P. stipitis*.

Medios de cultivo:

(1) hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz detoxificado con carbón activo, neutralizado y con una concentración inicial de D-xilosa de 40,7 kg m⁻³.

(2) hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz detoxificado con carbón activo, concentrado, detoxificado, neutralizado y con (kg m⁻³): D-xilosa (49,5), L-arabinosa (8,5), D-glucosa (7,5), extracto de levadura (3), 3 g m⁻³ de HMF y 7,7 g m⁻³ de furfural.

(3) medio sintético compuesto por (kg m⁻³): D-glucosa (60), peptona (6,5), urea (2,27) y extracto de levadura (1,7).

(4) medio sintético compuesto por (kg m⁻³): D-glucosa (60), D-xilosa (60) (con una relación 3:1), peptona (6,5), urea (2,27) y extracto de levadura (1,7).

(5) medio sintético compuesto por (kg m⁻³): D-glucosa (60), D-xilosa (60) (con una relación 1:1), peptona (6,5), urea (2,27) y extracto de levadura (1,7).

(6) medio sintético compuesto por (kg m⁻³): D-glucosa (60), D-xilosa (60) (con una relación 1:3), peptona (6,5), urea (2,27) y extracto de levadura (1,7).

(7) medio sintético compuesto por (kg m⁻³): D-xilosa (60), peptona (6,5), urea (2,27) y extracto de levadura (1,7).

(8) hidrolizado hemicelulósico de cáscara de avellana deslignificada, detoxificada por 'overliming' y carbón activo, y con (kg m⁻³) azúcares totales procedentes del hidrolizado (13,45) suplementado con D-xilosa (36,55).

(9) hidrolizado hemicelulósico de cáscara de avellana deslignificada, detoxificada por 'overliming' y carbón activo, y con (kg m⁻³) azúcares totales procedentes del hidrolizado (13,61) suplementado con D-xilosa (36,39).

(10) hidrolizado hemicelulósico de cáscara de avellana deslignificada, detoxificada por 'overliming' y carbón activo, y con (kg m⁻³) azúcares totales procedentes del hidrolizado (17,10) suplementado con D-xilosa (31,90).

(11) medio sintético compuesto por (kg m⁻³): D-xilosa (90), D-glucosa (15), L-arabinosa (15), urea (2,3), MgSO₄ 7H₂O (1) y extracto de levadura (3).

(12) hidrolizado hemicelulósico de caña común neutralizado y con (kg m⁻³): D-xilosa (20,28), D-glucosa (4,60), ácido acético (3,98), urea (5), MgSO₄ 7H₂O (0,5) y KH₂PO₄ (1).

(13) hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz concentrado, detoxificado con tratamientos con Fe²⁺, H₂O₂ y O₃, y con (kg m⁻³) una azúcares totales (90) en una relación D-xilosa/D-glucosa/L-arabinosa (6:1:1) y extracto de levadura (3).

(14) hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz concentrado, detoxificado con tratamientos con Fe²⁺, UV y O₃, y con (kg m⁻³) una azúcares totales (90) en una relación D-xilosa/D-glucosa/L-arabinosa (6:1:1) y extracto de levadura (3).

(15) hidrolizado hemicelulósico de *Miscanthus gigantescus* pretratado con ácido oxálico detoxificado por 'liming', con (kg m⁻³) azúcares totales (31,5), ácido acético (4,9), furfural (0,6), HMF (0,1) y fenoles totales (5,3).

(16) hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz concentrado, detoxificado con *Saccharomyces cerevisiae* y con (kg m⁻³): D-xilosa (87,2), D-glucosa (1,73), L-arabinosa (15,9), ácido acético (2,16), furanos (0,44), fenoles totales (10,5) y extracto de levadura (3).

(17) hidrolizado hemicelulósico de poda de olivo concentrado, detoxificado con *Saccharomyces cerevisiae* y con (kg m⁻³): D-xilosa (28,8), D-glucosa (27,04), L-arabinosa (15,9), ácido acético (4,11), furanos (0,54), fenoles totales (8,84) y extracto de levadura (4,0), MgSO₄ 7H₂O (1,0) y KH₂PO₄ (2,0), (NH₄)₂SO₄ y peptona (3,6).

(18) medio sintético compuesto por (kg m⁻³): D-xilosa (120), extracto de levadura (1,7), urea (2,27) y peptona (6,56).

(19) hidrolizado ácido del pretratamiento de *Saccharum spontaneum* con (kg m⁻³) D-xilosa (30,7), D-glucosa (2,6), L-arabinosa (1,4), ácido acético (3,6), furfural (0,68), HMF (0,1), fenoles totales (6,58), urea (5), MgSO₄ 7H₂O (0,5) y KH₂PO₄ (1,0).

(20) hidrolizado hemicelulósico de mazorca de maíz detoxificado por neutralización con (kg m⁻³): azucares reductores totales obtenidos tras los tratamientos (35,2), urea (6,4), KH₂PO₄ (1,2), Na₂HPO₄ (0,18), extracto de levadura (10) y metales traza (CaO, ZnO, FeCl₃ 6H₂O, MgO, CuSO₄ 5H₂O, CoCl₂ 6H₂O, H₃BO₃).

(21) Idem a 21, salvo que la detoxificación incluye un tratamiento con zeolitas y que el medio posee una concentración de azucares reductores totales obtenidos tras los tratamientos de 30 kg m⁻³.

(22) Idem a 21, salvo que la detoxificación se realizó por 'overliming' y que el medio posee una concentración de azúcares reductores totales obtenidos tras los tratamientos de 35,9 kg m⁻³.

(23) Idem a 21, salvo que la detoxificación se realizó por 'overliming' junto a un subsecuente tratamiento con zeolitas y que el medio posee una concentración de azúcares reductores totales obtenidos tras los tratamientos de 23,4 kg m⁻³.

(24) Medio sintético con (kg m⁻³): D-xilosa (50), casaminoácidos, NH₄Cl, sales minerales y vitaminas.

(25) Medio sintético con (kg m⁻³): D-xilosa (90,0), D-glucosa (15,0), L-arabinosa (15,0), urea (2,3), MgSO₄ 7H₂O (1,0) y extracto de levadura (3,0).

(26) Hidrolizado hemicelulósico de caña de azúcar concentrado, neutralizado y con (kg m⁻³): D-xilosa (36), KH₂PO₄ (18,8), (NH₄)₂HPO₄ (3,0), MgSO₄ 7H₂O (1,1) y extracto de levadura (3,0).

(27) Hidrolizado hemicelulósico de *Eichhorniacrassipes*, llevado a ebullición, detoxificado por tratamientos consistentes en ebullición, 'overliming', concentrado y con (kg m⁻³): D-xilosa (54), D-glucosa (3,5), L-arabinosa (4,5), D-galactosa (2,2), D-manosa (3,3), CuSO₄ H₂O (2,5), FeCl₃ 6H₂O (2,7) MnSO₄ H₂O (1,7), Na₂Mo₂O₄ 2H₂O (2,42), ZnSO₄ 7H₂O (2,87), CaCl₂ 6H₂O (2,4).

(28) Hidrolizado hemicelulósico de paja de trigo detoxificado por tratamientos consistentes en ebullición, 'overliming', concentrado y con (kg m⁻³): D-xilosa (45), D-glucosa (6,4), L-arabinosa (9,0), furfural (0,27), ácido acético (6,9), extracto de levadura (1), CuSO₄ H₂O (2,5), FeCl₃ 6H₂O (2,7) MnSO₄ H₂O (1,69), Na₂Mo₂O₄ 2H₂O (2,42), ZnSO₄ 7H₂O (2,87), CoCl₂ 6H₂O (2,38) y 0,2 ml de ácido sulfúrico concentrado.

(29) Medio sintético tratado por ebullición y 'overliming', y con (g dm⁻³): D-xilosa (45), D-glucosa (6,4), L-arabinosa (9,0), sales minerales y elementos traza en las mismas concentraciones que el hidrolizado, biotina (0,1 g m⁻³), tiamina hidrocloreto (4 g m⁻³) y CaCl₂ 2H₂O (0,05).

(30) Hidrolizado proveniente del licor sulfito de madera dura proveniente de una industria papelería tratado por ebullición, 'overliming' y concentración; y con (kg m⁻³): D-xilosa (40,2), D-glucosa (5,4), D-manosa (9,0), L-arabinosa (21,0), ácido acético (4,2), furfural (0,06), extracto de levadura (2,5), (NH₄)₂HPO₄ (2), (NH₄)₂SO₄ (1), KH₂PO₄ (2), MgSO₄ 7H₂O (0,5), 1 dm³ m⁻³ de elementos traza en una concentración (kg m⁻³): CuSO₄ 5H₂O (2,5), FeCl₃ 6H₂O (2,7), MnSO₄ H₂O (1,69), Na₂Mo₂O₄ 2H₂O (2,42), ZnSO₄ 7H₂O (2,87), CoCl₂ 6H₂O (2,38).



Apéndice

Datos primarios de hidrólisis
y caracterización de biomasa

2

Este apéndice recoge los resultados de los ensayos realizados durante la fase experimental: hidrólisis ácida de poda de olivar y de poda de olivar sin hoja, fermentación de hidrolizados obtenidos con las levaduras *Candida guilliermondii* y *Pichia stipitis*.

AP2.1. Caracterización de la biomasa

Todos los ensayos de hidrólisis se han realizado con material vegetal procedente de la misma finca de olivar, situada en Arjona (Jaén). El procedimiento de muestreo y acondicionamiento se refleja en el apartado 4.5.1.

El material vegetal empleado ha sido poda de olivar y poda de olivar exenta de hoja. En ambos casos, tal y como se muestra en la Tabla AP2.1.a, la fracción seleccionada del material (fracción con diámetro comprendido entre 0,425 y 0,600 mm) se ha caracterizado en sus contenidos de: humedad y material volátil, cenizas, celulosa, hemicelulosa y lignina; tal como propone Van Soest y Wine (1967) y las normas TAPPI correspondientes. Por otro lado, en los laboratorios del Departamento de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil), se ha empleado la metodología propuesta por Browning (1967) y Rocha (2000), cuyos resultados se incluyen, igualmente, en la Tabla AP2.1.b., donde aparecen los contenidos de: humedad y material volátil, cenizas, celulosa, hemicelulosa, lignina insoluble y soluble, cenizas y grupos acetilo.

Tabla AP2.1.a:
Caracterización de los dos tipos material de poda empleado.
Metodología TAPPI y Van Soest y Wine (1967).

Material	HMV, %	HEM, %	CEL, %	LIG, %	CEN, %
PC	6,91±0,42	15,41±1,03	25,19±1,12	18,55±0,87	3,09±0,04
PSH	7,41±0,84	27,87±0,43	41,87±1,44	16,43±0,66	1,39±0,11

Poda de olivar completa (PC), Poda de olivar sin hoja (PSH).

Tabla AP2.1.b:
Caracterización de los dos tipos material de poda empleado.
Metodología Browning (1967) y Rocha (2000).

Material	HMV, %	HEM, %	CEL, %	LIGi, %	LIGs, %	CEN, %	GAC, %
PC	7,84±0,32	14,76±1,01	27,41±0,86	23,01±0,73	4,97±0,14	5,04±0,23	1,84±0,11
PSH	7,55±0,64	18,64±1,07	33,83±1,07	18,93±0,09	4,20±0,11	3,79±0,07	2,08±0,09

Poda de olivar completa (PC), Poda de olivar sin hoja (PSH).

Del mismo modo, fueron analizados los residuos sólidos resultantes de los experimentos de hidrólisis, cuyos resultados se presentan a lo largo de este capítulo.

Los experimentos de hidrólisis se han agrupado en dos grandes apartados. Por un lado, el correspondiente a la poda de olivar y, por otro, a la poda de olivar exenta de hoja. Para el mejor manejo de los datos se ha procedido a una codificación de los ensayos, por tanto, se han identificado todos los experimentos con la letra H (hidrolizado), seguida de la letra C (ensayos realizados con poda de olivo completa) o Sh (ensayos realizados con poda de olivar sin hoja). Tras estas iniciales aparece un guión, al que le sigue una letra que indica el tipo de tratamiento: térmico (T), con ácido sulfúrico (S) o con ácido clorhídrico (C). Por último un número, que indica el orden en que se realizaron los experimentos.

AP2.2. Hidrólisis de poda de olivar completa

AP2.2.1. Tratamientos térmicos

a) Residuos sólidos

Tabla AP2.2:
Caracterización de la poda de olivar tras los tratamientos térmicos

Ensayo	T, °C	C, N	CEL, %	HEM, %	LIG, %	CEN, %
HC-T1	75	0,0	34,12	19,32	26,28	3,89
HC-T2	80	0,0	31,25	17,86	24,10	3,73
HC-T3	85	0,0	27,69	15,77	21,25	3,41
HC-T4	90	0,0	27,61	15,62	21,28	3,65
HC-T5	95	0,0	28,49	16,27	22,02	3,78

b) Hidrolizados

Tabla AP2.3:
Experimento HC-T1. T = 75 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	n.d.	0,07	0,49	n.d.	0,01	0,58	1,22
15	n.d.	0,07	0,74	n.d.	0,01	0,67	1,58
30	n.d.	0,07	0,87	n.d.	0,01	0,67	1,71
45	n.d.	0,07	1,02	n.d.	0,01	0,71	1,90
60	n.d.	0,06	1,13	n.d.	0,01	0,73	2,02
75	n.d.	0,07	1,19	n.d.	0,01	0,79	2,16
90	n.d.	0,07	1,24	n.d.	0,01	0,79	2,21
120	n.d.	0,07	1,25	n.d.	0,01	0,81	2,23
150	n.d.	0,08	1,28	n.d.	0,01	0,81	2,26
180	n.d.	0,08	1,27	n.d.	0,01	0,83	2,28
210	n.d.	0,08	1,30	n.d.	0,01	0,84	2,31
240	n.d.	0,08	1,31	n.d.	0,01	0,86	2,35

n.d.: no detectado.

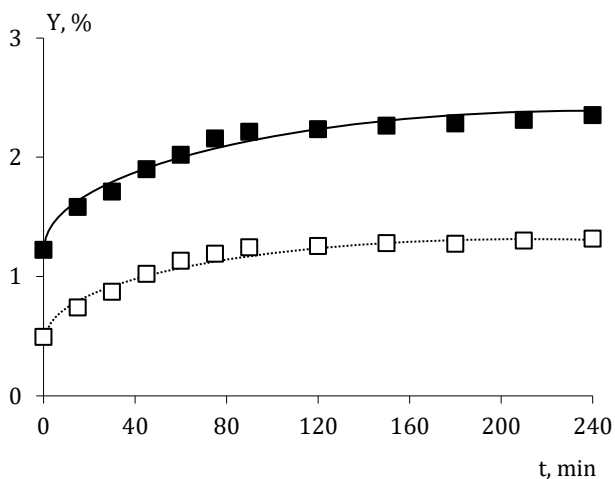


Figura AP2.1: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■) y D-glucosa (□) con el tiempo en el experimento HC-T1.

Tabla AP2.4:
Experimento HC-T2. T = 80 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	n.d.	0,06	0,52	n.d.	0,02	0,62	1,29
15	n.d.	0,06	0,73	n.d.	0,02	0,69	1,57
30	n.d.	0,06	0,92	n.d.	0,02	0,77	1,84
45	n.d.	0,07	1,00	n.d.	0,02	0,79	1,96
60	n.d.	0,07	1,10	n.d.	0,02	0,83	2,09
75	n.d.	0,08	1,12	n.d.	0,02	0,87	2,16
90	n.d.	0,08	1,17	n.d.	0,02	0,88	2,23
120	n.d.	0,08	1,23	n.d.	0,02	0,87	2,27
150	n.d.	0,08	1,30	n.d.	0,02	0,88	2,36
180	n.d.	0,08	1,31	n.d.	0,02	0,90	2,39
210	n.d.	0,08	1,37	n.d.	0,02	0,88	2,43
240	n.d.	0,08	1,38	n.d.	0,02	0,89	2,44

n.d.: no detectado.

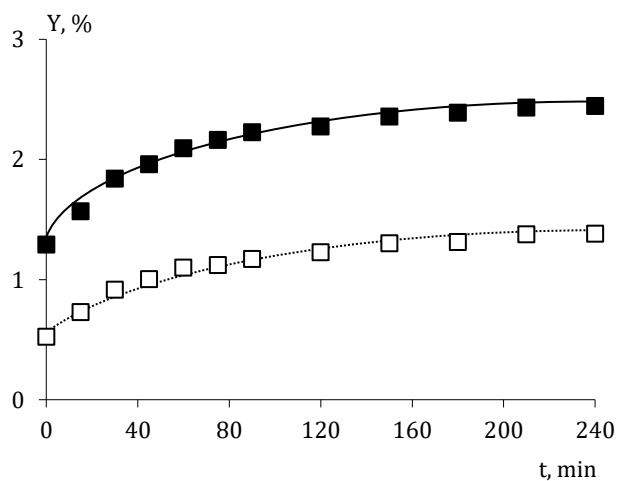


Figura AP2.2: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■) y D-glucosa (□) con el tiempo en el experimento HC-T2.

Tabla AP2.5:
Experimento HC-T3. T = 85°C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	n.d.	0,06	0,46	n.d.	0,01	0,67	1,20
15	n.d.	0,07	0,68	n.d.	0,01	0,68	1,44
30	n.d.	0,08	0,87	n.d.	0,01	0,76	1,72
45	n.d.	0,08	1,03	n.d.	0,01	0,77	1,89
60	n.d.	0,08	1,13	n.d.	0,01	0,81	2,03
75	n.d.	0,08	1,19	n.d.	0,01	0,89	2,17
90	n.d.	0,07	1,26	n.d.	0,01	0,88	2,22
120	n.d.	0,08	1,31	n.d.	0,01	0,88	2,28
150	n.d.	0,08	1,37	n.d.	0,01	0,89	2,35
180	n.d.	0,08	1,39	n.d.	0,01	0,90	2,38
210	n.d.	0,08	1,44	n.d.	0,01	0,92	2,45
240	n.d.	0,08	1,46	n.d.	0,01	0,90	2,45

n.d.: no detectado.

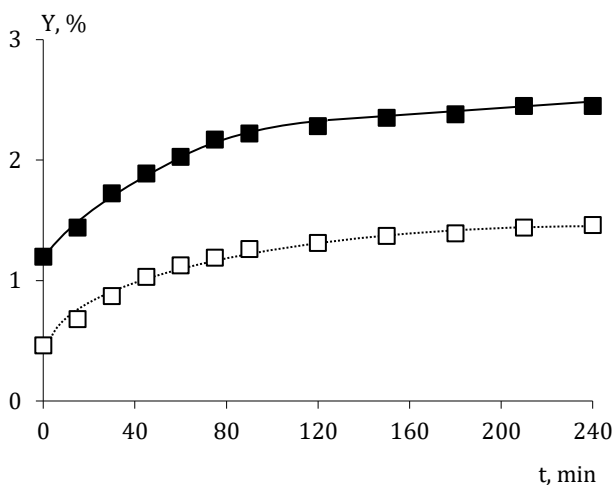


Figura AP2.3: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■) y D-glucosa (□) con el tiempo en el experimento HC-T3.

Tabla AP2.6:
Experimento HC-T4. T = 90 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	n.d.	0,07	0,47	n.d.	n.d.	0,66	1,20
15	n.d.	0,08	0,81	n.d.	0,01	0,71	1,61
30	n.d.	0,09	0,99	n.d.	0,01	0,78	1,87
45	n.d.	0,08	1,12	n.d.	0,01	0,77	1,98
60	n.d.	0,08	1,24	n.d.	0,01	0,81	2,14
75	n.d.	0,08	1,32	n.d.	0,01	0,88	2,29
90	n.d.	0,09	1,36	n.d.	0,01	0,89	2,35
120	n.d.	0,08	1,43	n.d.	0,01	0,90	2,42
150	n.d.	0,09	1,49	n.d.	0,01	0,88	2,47
180	n.d.	0,08	1,55	n.d.	0,01	0,89	2,53
210	n.d.	0,08	1,56	n.d.	0,01	0,89	2,54
240	n.d.	0,08	1,57	n.d.	0,02	0,91	2,57

n.d.: no detectado.

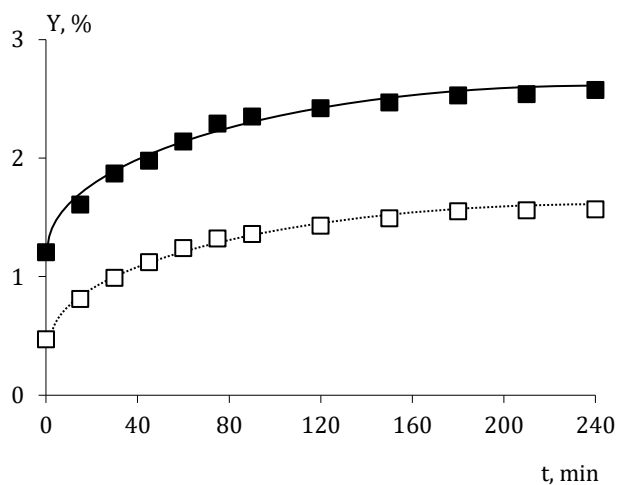


Figura AP2.4: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■) y D-glucosa (□) con el tiempo en el experimento HC-T4.

Tabla AP2.7:
Experimento HC-T5. T = 95 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	n.d.	0,08	0,63	n.d.	0,01	0,74	1,46
15	n.d.	0,09	0,98	n.d.	0,02	0,78	1,87
30	n.d.	0,09	1,32	n.d.	0,02	0,78	2,21
45	n.d.	0,08	1,55	n.d.	0,02	0,78	2,43
60	n.d.	0,08	1,68	n.d.	0,02	0,79	2,57
75	n.d.	0,09	1,78	n.d.	0,02	0,86	2,75
90	n.d.	0,09	1,84	n.d.	0,02	0,88	2,83
120	n.d.	0,09	1,86	n.d.	0,02	0,89	2,86
150	n.d.	0,08	1,90	n.d.	0,02	0,92	2,92
180	n.d.	0,08	1,95	n.d.	0,02	0,93	2,98
210	n.d.	0,09	2,02	n.d.	0,02	0,92	3,05
240	n.d.	0,08	2,04	n.d.	0,02	0,92	3,06

n.d.: no detectado.

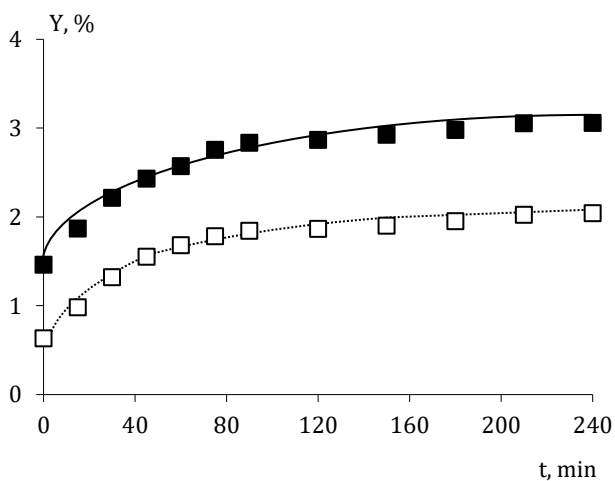


Figura AP2.5: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■) y D-glucosa (□) con el tiempo en el experimento HC-T5.

c) Inhibidores

En la Tabla AP2.8 se recogen los inhibidores correspondientes a los hidrolizados obtenidos en cada uno de los experimentos realizados con poda de olivar y en los que se empleó agua caliente como agente hidrolítico. Los resultados corresponden a tiempo experimental 240 minutos.

Tabla AP2.8:
Caracterización en inhibidores de los hidrolizados
obtenidos tras los ensayos hidrotérmicos.

Ensayo	T, °C	C, N	F, kg m ⁻³	HMF, g m ⁻³	AcH, kg m ⁻³	CFT, kg m ⁻³
HC-T1	75	0,0	-	n.d.	0,12	1,17
HC-T2	80	0,0	-	n.d.	0,11	1,29
HC-T3	85	0,0	-	n.d.	0,14	1,40
HC-T4	90	0,0	-	10	0,18	1,36
HC-T5	95	0,0	-	20	0,19	1,43

n.d.: no detectado.

AP2.2.2. Experimentos realizados con HCl

a) Residuos sólidos

Tabla AP2.9:
Caracterización de la poda de olivar resultante
de las hidrólisis realizadas con HCl.

Ensayo	T, °C	C _{HCl} , N	CEL, %	HEM, %	LIG, %	CEN, %
HC-Cl1	75	0,1	31,53	18,96	27,66	1,92
HC-Cl2	75	0,5	35,14	16,41	32,19	1,14
HC-Cl3	75	0,7	35,06	12,57	33,15	0,94
HC-Cl4	75	1,0	35,11	10,36	34,49	0,83
HC-Cl5	80	0,1	32,99	19,78	29,09	1,94
HC-Cl6	80	0,5	37,04	12,28	34,27	0,43
HC-Cl7	80	0,7	37,68	8,53	36,14	0,37
HC-Cl8	80	1,0	36,08	6,44	35,72	0,59
HC-Cl9	85	0,1	35,87	19,54	32,12	1,84
HC-Cl10	85	0,5	33,78	8,26	31,96	0,28
HC-Cl11	85	0,7	33,87	4,31	33,27	0,46
HC-Cl12	85	1,0	34,07	0,98	34,52	0,34
HC-Cl13	90	0,1	32,26	17,03	29,76	1,78
HC-Cl14	90	0,5	33,04	3,14	32,54	0,09
HC-Cl15	90	0,7	35,66	1,01	36,12	0,11
HC-Cl16	90	1,0	34,21	0,00	35,60	0,14
HC-Cl17	95	0,1	32,87	15,32	31,33	1,33
HC-Cl18	95	0,5	34,28	0,78	35,28	0,08
HC-Cl19	95	0,7	38,51	0,00	40,56	0,11
HC-Cl20	95	1,0	38,23	0,00	40,56	0,07

b) Hidrolizados

Tabla AP2.10:
Experimento HC-Cl1. 0,1 N HCl. T = 75 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	0,01	0,03	1,78	n.d.	0,01	0,72	2,55
15	0,08	0,04	2,65	n.d.	0,01	0,90	3,68
30	0,11	0,04	2,66	n.d.	0,01	1,17	3,99
45	0,14	0,04	2,65	n.d.	0,01	1,23	4,07
60	0,25	0,05	2,65	n.d.	0,01	1,24	4,19
75	0,38	0,05	2,73	n.d.	0,02	1,28	4,45
90	0,35	0,05	2,75	n.d.	0,02	1,25	4,41
120	0,48	0,05	2,79	n.d.	0,02	1,25	4,58
150	0,52	0,05	2,85	n.d.	0,02	1,25	4,68
180	0,70	0,06	2,94	n.d.	0,02	1,31	5,02
210	0,78	0,06	2,99	n.d.	0,02	1,33	5,18
240	0,99	0,07	3,12	n.d.	0,02	1,32	5,52

n.d.: no detectado.

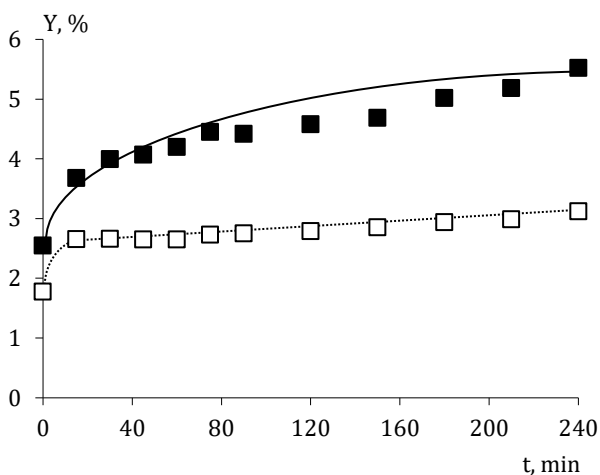


Figura AP2.6: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■) y D-glucosa (□) con el tiempo en el experimento HC-Cl1.

Tabla AP2.11:
Experimento HC-Cl2. 0,5 N HCl.T = 75 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	0,96	0,10	2,15	n.d.	0,01	0,80	4,03
15	1,73	0,12	3,21	n.d.	0,01	1,26	6,33
30	2,23	0,12	3,81	n.d.	0,01	1,35	7,51
45	2,31	0,15	4,07	n.d.	0,02	1,38	7,93
60	2,35	0,16	4,21	0,02	0,02	1,36	8,12
75	2,37	0,22	4,30	0,06	0,02	1,35	8,32
90	2,38	0,22	4,41	0,14	0,02	1,37	8,54
120	2,38	0,26	4,51	0,34	0,02	1,40	8,91
150	2,64	0,31	4,94	0,52	0,03	1,36	9,80
180	2,65	0,38	5,12	0,94	0,04	1,35	10,49
210	2,70	0,42	5,14	1,46	0,04	1,37	11,12
240	2,76	0,45	5,17	2,34	0,04	1,37	12,13

n.d.: no detectado.

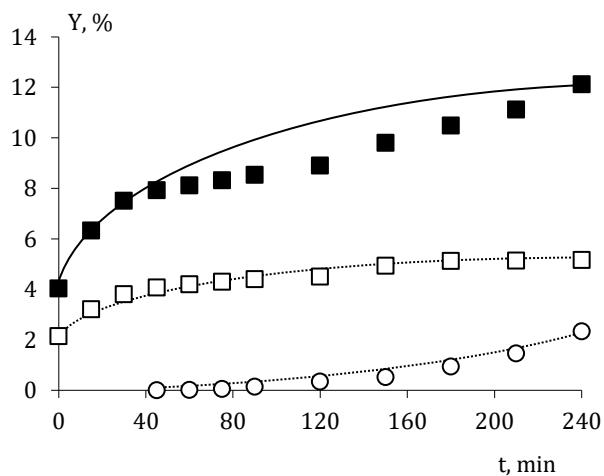


Figura AP2.7: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl2.

Tabla AP2.12:
Experimento HC-Cl3. 0,7 N HCl. T = 75 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	0,93	0,14	1,53	n.d.	0,01	0,92	3,54
15	1,58	0,15	2,73	n.d.	0,02	1,18	5,65
30	2,20	0,18	3,09	0,01	0,02	1,33	6,82
45	2,15	0,19	3,29	0,05	0,02	1,41	7,10
60	2,38	0,20	3,35	0,15	0,02	1,43	7,52
75	2,34	0,20	3,33	0,22	0,02	1,44	7,55
90	2,50	0,24	3,80	0,31	0,04	1,44	8,32
120	2,52	0,26	4,34	0,78	0,04	1,41	9,34
150	2,82	0,34	4,61	1,14	0,06	1,44	10,41
180	2,89	0,40	5,47	1,67	0,06	1,43	11,91
210	2,90	0,46	6,14	2,43	0,07	1,45	13,45
240	2,90	0,52	6,79	3,56	0,08	1,43	15,28

n.d.: no detectado.

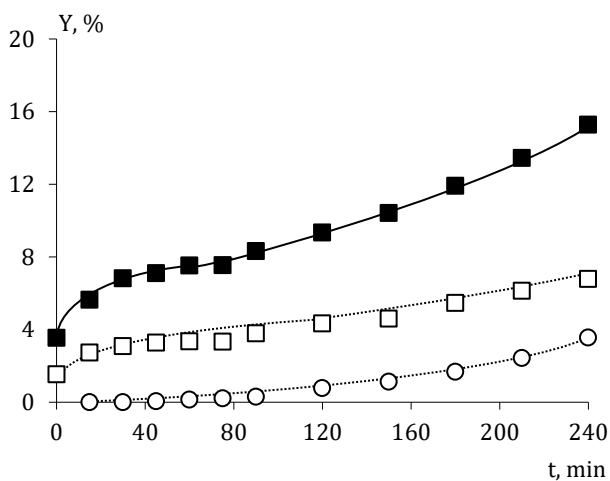


Figura AP2.8: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl3.

Tabla AP2.13:
Experimento HC-Cl4. 1,0 N HCl.T = 75 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	1,05	0,11	1,45	n.d.	0,02	1,08	3,70
15	1,61	0,18	3,00	0,09	0,02	1,28	6,19
30	2,26	0,23	3,69	0,16	0,02	1,42	7,79
45	2,56	0,27	3,85	0,35	0,02	1,48	8,52
60	2,70	0,33	4,41	0,53	0,06	1,48	9,50
75	2,71	0,36	4,53	0,79	0,05	1,47	9,91
90	2,90	0,41	4,85	0,99	0,07	1,48	10,70
120	3,03	0,49	5,42	1,66	0,09	1,48	12,18
150	3,06	0,50	6,06	1,93	0,07	1,47	13,08
180	3,11	0,63	6,93	2,75	0,08	1,46	14,95
210	3,12	0,70	7,56	3,30	0,11	1,48	16,27
240	3,15	0,73	8,23	3,87	0,10	1,47	17,55

n.d.: no detectado.

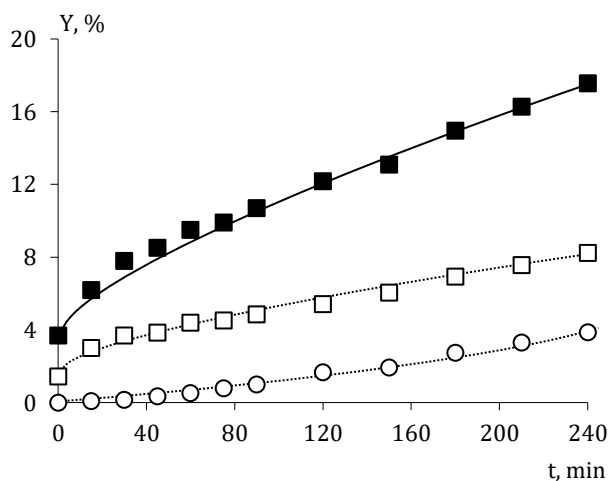


Figura AP2.9: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl4.

Tabla AP2.14:
Experimento HC-Cl5. 0,1 N HCl. T = 80 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	0,02	0,06	1,27	n.d.	0,01	0,45	1,80
15	0,07	0,06	1,62	n.d.	0,01	0,89	2,64
30	0,11	0,06	1,87	n.d.	0,01	1,27	3,32
45	0,14	0,06	2,10	n.d.	0,01	1,32	3,63
60	0,19	0,07	2,43	n.d.	0,01	1,36	4,06
75	0,21	0,07	2,54	n.d.	0,02	1,35	4,19
90	0,22	0,07	2,76	n.d.	0,02	1,37	4,43
120	0,33	0,07	3,12	n.d.	0,02	1,46	5,00
150	0,43	0,08	3,36	n.d.	0,02	1,42	5,30
180	0,49	0,08	3,49	n.d.	0,02	1,41	5,48
210	0,86	0,08	3,58	n.d.	0,02	1,37	5,91
240	1,08	0,09	3,67	n.d.	0,02	1,39	6,24

n.d.: no detectado.

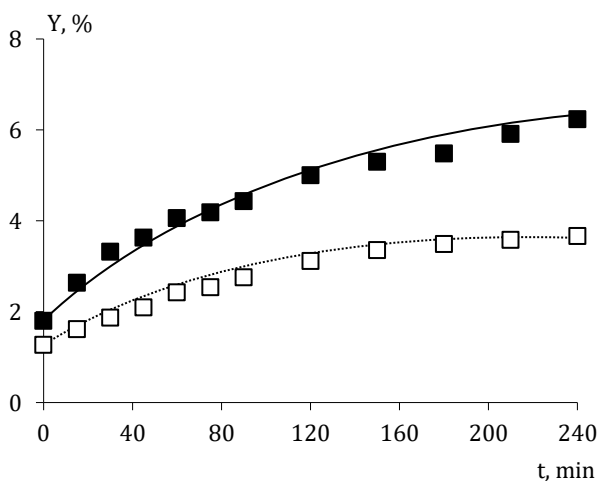


Figura AP2.10: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■) y D-glucosa (□) con el tiempo en el experimento HC-Cl5.

Tabla AP2.15:
Experimento HC-Cl6. 0,5 N HCl. T = 80 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	1,21	0,09	1,60	n.d.	0,01	1,05	3,96
15	2,20	0,14	2,67	0,01	0,01	1,38	6,41
30	2,54	0,18	3,38	0,08	0,01	1,48	7,67
45	2,64	0,21	3,47	0,08	0,01	1,54	7,95
60	2,78	0,23	3,87	0,13	0,01	1,58	8,61
75	2,94	0,30	4,30	0,31	0,04	1,57	9,45
90	3,31	0,34	4,44	0,39	0,05	1,54	10,06
120	3,35	0,41	4,92	0,79	0,06	1,56	11,10
150	3,36	0,50	5,44	1,28	0,07	1,55	12,20
180	3,37	0,52	5,90	1,63	0,07	1,53	13,02
210	3,41	0,61	6,34	2,25	0,07	1,55	14,23
240	3,44	0,67	6,87	2,77	0,09	1,54	15,38

n.d.: no detectado.

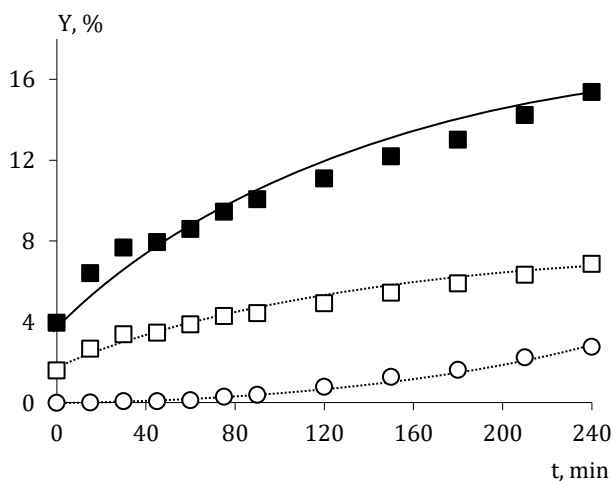


Figura AP2.11: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl6.

Tabla AP2.16:
Experimento HC-Cl7. 0,7 N HCl. T = 80 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	2,19	0,15	2,15	0,01	0,02	1,09	5,61
15	3,22	0,24	4,18	0,09	0,03	1,46	9,21
30	3,84	0,31	4,65	0,16	0,03	1,58	10,57
45	3,83	0,35	4,86	0,31	0,03	1,63	11,01
60	3,97	0,41	5,20	0,59	0,05	1,58	11,80
75	3,94	0,47	5,48	0,81	0,05	1,61	12,37
90	4,03	0,52	5,84	1,15	0,05	1,62	13,22
120	3,90	0,58	6,34	1,94	0,05	1,59	14,39
150	4,01	0,66	7,33	2,90	0,07	1,57	16,53
180	4,20	0,71	8,15	3,90	0,08	1,62	18,67
210	4,40	0,85	8,44	4,64	0,10	1,58	20,01
240	4,37	0,91	8,47	5,18	0,11	1,61	20,66

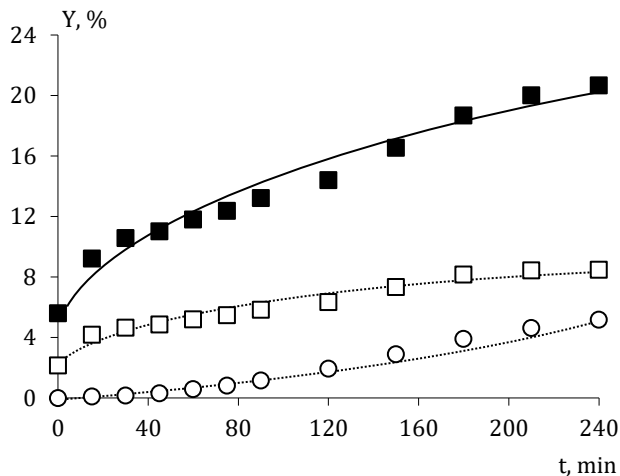


Figura AP2.12: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl7.

Tabla AP2.17:
Experimento HC-Cl8. 1,0 N HCl. T = 80 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	2,21	0,23	2,01	0,07	0,03	1,15	5,70
15	3,24	0,32	4,12	0,33	0,04	1,51	9,56
30	3,41	0,45	4,92	0,87	0,06	1,62	11,33
45	3,46	0,53	5,48	1,43	0,08	1,64	12,61
60	3,51	0,57	6,12	1,86	0,08	1,58	13,72
75	3,52	0,67	6,94	2,75	0,08	1,61	15,57
90	3,53	0,70	7,21	3,13	0,11	1,59	16,27
120	3,53	0,83	8,12	4,02	0,11	1,62	18,23
150	3,53	0,92	9,01	4,53	0,13	1,58	19,69
180	3,61	1,05	9,78	5,38	0,14	1,61	21,58
210	3,61	1,12	10,41	5,67	0,16	1,57	22,55
240	3,51	1,17	10,65	5,87	0,19	1,59	22,97

n.d.: no detectado.

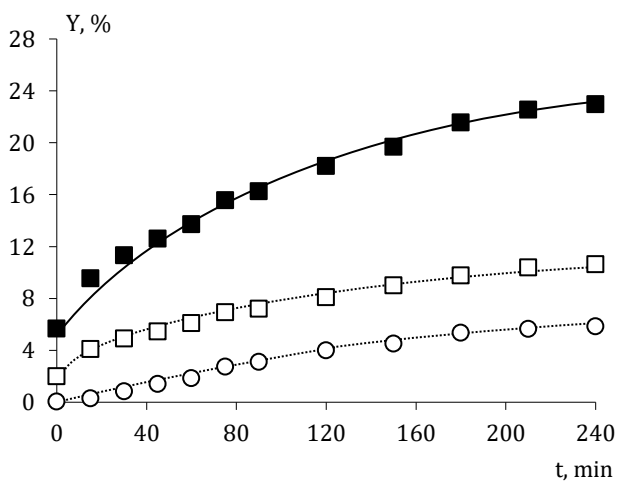


Figura AP2.13: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl8.

Tabla AP2.18:
Experimento HC-Cl9. 0,1 N HCl. T = 85 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	0,12	0,05	1,34	n.d.	0,01	1,01	2,54
15	0,19	0,06	1,95	n.d.	0,01	1,41	3,63
30	0,36	0,07	2,37	n.d.	0,01	1,57	4,38
45	0,48	0,07	2,46	n.d.	0,01	1,54	4,56
60	0,57	0,07	2,46	n.d.	0,02	1,52	4,64
75	0,66	0,07	2,62	n.d.	0,02	1,56	4,94
90	0,86	0,09	2,86	n.d.	0,02	1,54	5,37
120	1,13	0,10	2,95	n.d.	0,02	1,52	5,71
150	1,33	0,11	3,08	n.d.	0,02	1,49	6,03
180	1,79	0,12	3,15	n.d.	0,02	1,54	6,63
210	1,75	0,13	3,21	0,01	0,02	1,49	6,62
240	2,10	0,14	3,48	0,01	0,02	1,49	7,24

n.d.: no detectado.

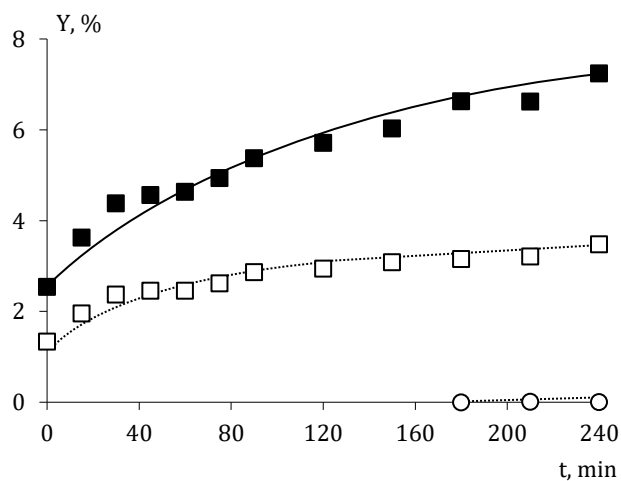


Figura AP2.14: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl9.

Tabla AP2.19:
Experimento HC-Cl10. 0,5 N HCl. T = 85°C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	1,27	0,10	2,30	n.d.	0,02	1,09	4,78
15	2,81	0,19	3,53	n.d.	0,02	1,47	8,02
30	2,90	0,30	4,52	0,27	0,03	1,54	9,55
45	2,92	0,44	5,26	0,46	0,03	1,59	10,70
60	3,01	0,47	5,40	0,75	0,04	1,56	11,23
75	3,04	0,48	5,42	1,88	0,05	1,57	12,43
90	3,04	0,51	5,44	2,08	0,06	1,59	12,71
120	3,01	0,53	5,86	2,17	0,08	1,55	13,19
150	3,02	0,62	6,19	2,77	0,09	1,52	14,21
180	2,91	0,74	7,28	3,67	0,09	1,54	16,23
210	2,94	0,80	7,60	4,26	0,10	1,56	17,26
240	2,95	0,86	8,33	5,16	0,10	1,52	18,93

n.d.: no detectado.

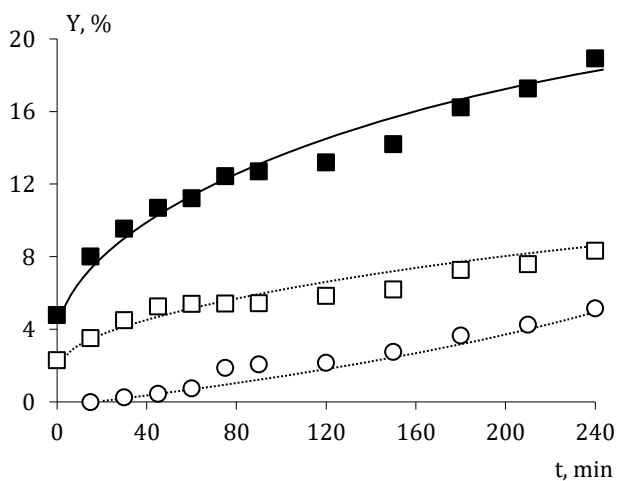


Figura AP2.15: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl10.

Tabla AP2.20:
Experimento HC-Cl11. 0,7 N HCl. T = 85 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	2,20	0,16	2,10	0,06	0,02	1,13	5,67
15	2,50	0,28	4,09	0,37	0,02	1,60	8,87
30	2,70	0,33	4,75	0,68	0,05	1,64	10,16
45	2,65	0,36	5,06	0,94	0,06	1,62	10,68
60	3,05	0,50	5,57	1,80	0,06	1,63	12,61
75	3,08	0,52	6,39	2,10	0,06	1,57	13,71
90	3,04	0,64	6,86	3,01	0,07	1,64	15,26
120	3,11	0,71	7,97	3,43	0,09	1,64	16,94
150	3,26	0,87	9,13	4,62	0,11	1,62	19,61
180	3,35	0,97	10,32	5,22	0,11	1,63	21,60
210	3,38	1,03	11,27	5,85	0,11	1,61	23,25
240	3,41	1,11	11,99	6,07	0,13	1,59	24,30

n.d.: no detectado.

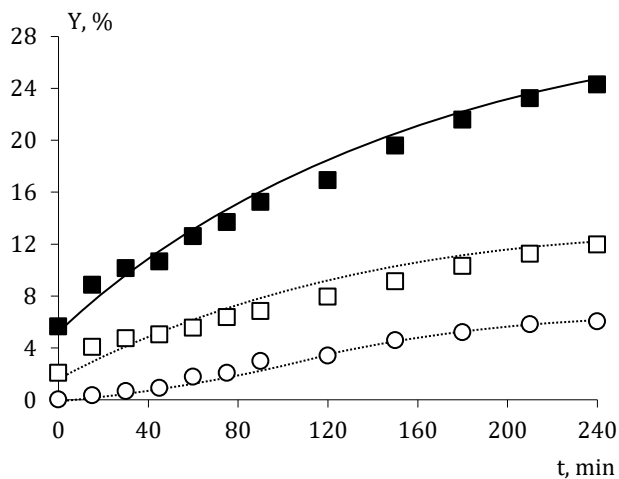


Figura AP2.16: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (O) con el tiempo en el experimento HC-Cl11.

Tabla AP2.21:
Experimento HC-Cl12. 1,0 N HCl. T = 85 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	1,67	0,11	3,05	0,02	0,02	1,01	5,87
15	3,13	0,38	5,38	0,57	0,04	1,34	10,83
30	3,20	0,54	5,80	1,47	0,06	1,57	12,64
45	3,31	0,60	6,45	2,33	0,06	1,63	14,39
60	3,33	0,71	7,23	3,01	0,07	1,59	15,94
75	3,28	0,81	8,36	4,20	0,08	1,63	18,36
90	3,50	1,04	8,89	5,00	0,10	1,56	20,09
120	3,57	1,12	9,89	6,32	0,11	1,59	22,60
150	3,64	1,24	11,54	7,01	0,15	1,62	25,20
180	3,77	1,32	11,98	7,61	0,15	1,59	26,42
210	3,84	1,42	13,21	8,01	0,17	1,64	28,28
240	4,12	1,45	13,72	8,43	0,20	1,62	29,54

n.d.: no detectado.

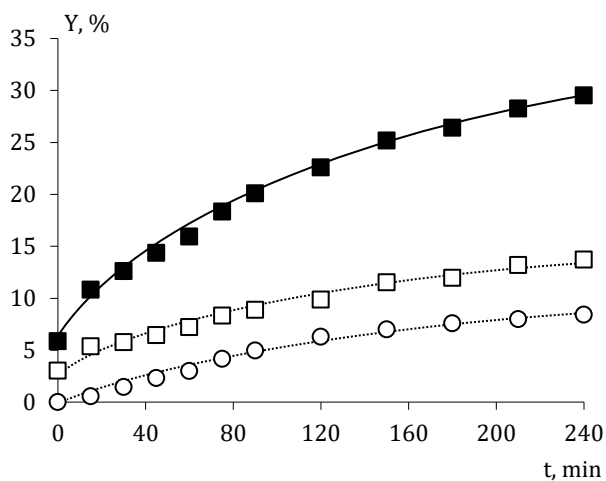


Figura AP2.17: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl12.

Tabla AP2.22:
Experimento HC-Cl13. 0,1 N HCl. T = 90 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	0,35	0,06	1,41	n.d.	0,01	1,09	2,92
15	0,73	0,09	1,98	n.d.	0,01	1,29	4,10
30	1,04	0,10	2,32	n.d.	0,01	1,58	5,05
45	1,36	0,11	2,65	n.d.	0,01	1,63	5,76
60	1,55	0,11	2,89	n.d.	0,01	1,64	6,20
75	1,89	0,12	3,19	n.d.	0,02	1,61	6,82
90	2,13	0,13	3,41	n.d.	0,02	1,59	7,28
120	2,39	0,15	3,56	0,01	0,02	1,62	7,75
150	2,90	0,16	3,72	0,01	0,02	1,62	8,44
180	3,02	0,17	3,81	0,01	0,02	1,59	8,62
210	3,49	0,21	3,87	0,02	0,02	1,57	9,18
240	3,58	0,20	4,02	0,03	0,03	1,59	9,45

n.d.: no detectado.

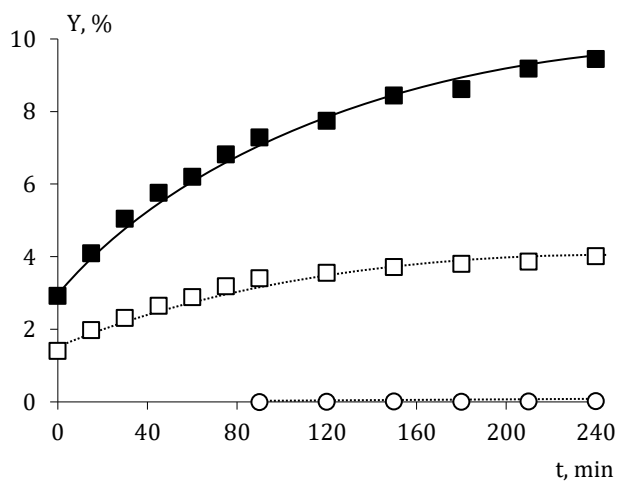


Figura AP2.18: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl13.

Tabla AP2.23:
Experimento HC-Cl14. 0,5 N HCl. T = 90 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	1,88	0,17	2,00	n.d.	0,01	1,15	5,21
15	2,33	0,21	3,10	0,17	0,02	1,53	7,36
30	2,45	0,38	4,58	0,80	0,02	1,61	9,83
45	2,52	0,44	5,12	1,07	0,03	1,63	10,80
60	2,76	0,52	6,38	1,83	0,03	1,59	13,11
75	2,87	0,67	6,50	2,54	0,06	1,55	14,19
90	2,91	0,67	7,50	3,16	0,08	1,58	15,90
120	3,29	0,91	9,10	4,76	0,09	1,59	19,73
150	3,30	0,96	9,50	5,00	0,09	1,56	20,41
180	3,59	1,12	10,82	6,20	0,10	1,54	23,35
210	3,70	1,20	11,60	7,00	0,10	1,53	25,13
240	3,88	1,32	12,54	7,64	0,11	1,54	27,02

n.d.: no detectado.

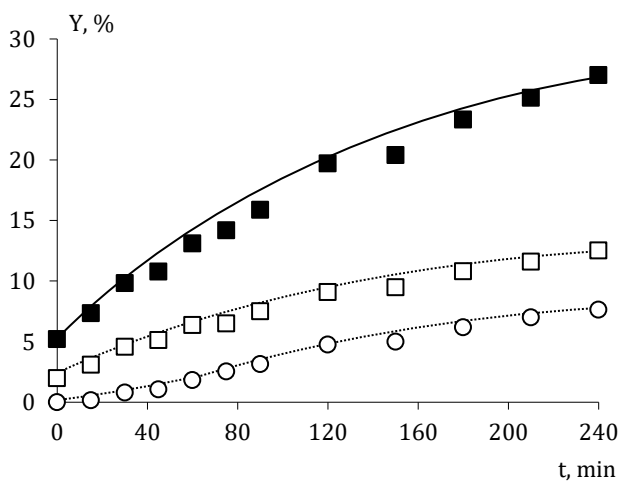


Figura AP2.19: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl14.

Tabla AP2.24:
Experimento HC-Cl15. 0,7 N HCl. T = 90 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	2,42	0,22	2,40	n.d.	0,01	1,09	6,14
15	2,87	0,39	4,41	0,50	0,04	1,40	9,62
30	3,02	0,55	5,13	1,16	0,05	1,58	11,49
45	3,10	0,71	6,44	2,08	0,05	1,64	14,02
60	3,17	0,82	7,55	2,89	0,06	1,61	16,09
75	3,20	0,82	8,07	3,51	0,06	1,57	17,21
90	3,21	0,85	8,69	4,18	0,08	1,61	18,59
120	3,22	0,90	10,23	5,76	0,08	1,57	21,74
150	3,24	1,04	11,80	6,89	0,09	1,56	24,59
180	3,26	1,12	12,50	7,45	0,10	1,55	25,98
210	3,31	1,29	13,56	8,15	0,11	1,53	27,95
240	3,92	1,56	13,89	8,59	0,14	1,54	29,64

n.d.: no detectado.

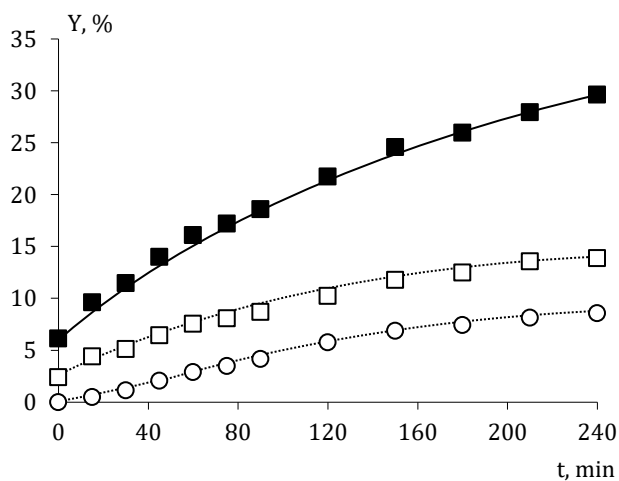


Figura AP2.20: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl15.

Tabla AP2.25:
Experimento HC-Cl16. 1,0 N HCl. T = 90 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	2,65	0,28	3,88	0,24	0,01	1,15	8,21
15	3,49	0,56	7,03	1,88	0,02	1,59	14,57
30	3,61	0,78	10,11	3,96	0,03	1,63	20,12
45	3,81	1,04	12,54	6,28	0,05	1,59	25,30
60	3,98	1,12	13,89	7,23	0,06	1,62	27,90
75	4,02	1,30	14,27	8,28	0,06	1,57	29,50
90	4,27	1,39	14,46	8,81	0,07	1,58	30,58
120	4,31	1,42	14,96	8,87	0,08	1,53	31,17
150	4,42	1,59	15,02	9,25	0,09	1,55	31,92
180	4,32	1,63	15,22	9,73	0,11	1,53	32,54
210	4,04	1,64	15,74	10,23	0,12	1,54	33,31
240	3,87	1,63	15,87	10,47	0,14	1,52	33,49

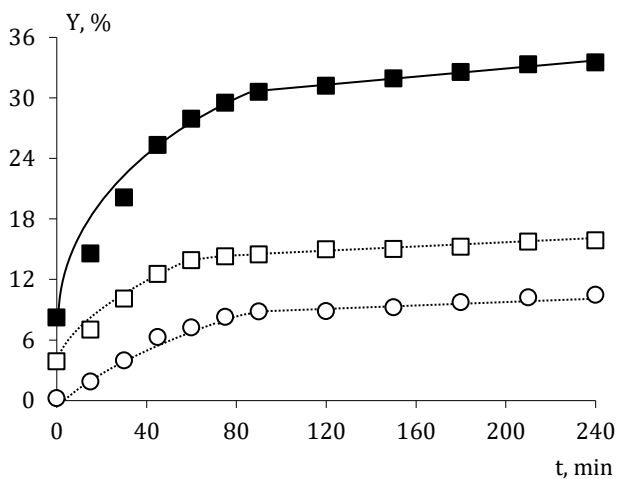


Figura AP2.21: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl16.

Tabla AP2.26:
Experimento HC-Cl17. 0,1 N HCl. T = 95 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	0,90	0,08	2,25	n.d.	0,01	1,27	4,51
15	1,29	0,10	2,87	n.d.	0,02	1,37	5,64
30	1,55	0,10	3,42	n.d.	0,02	1,43	6,52
45	1,90	0,13	3,78	n.d.	0,02	1,54	7,36
60	2,11	0,14	4,03	n.d.	0,02	1,64	7,95
75	2,11	0,14	4,67	n.d.	0,02	1,63	8,58
90	2,38	0,17	4,98	n.d.	0,02	1,60	9,16
120	2,47	0,20	5,67	0,13	0,03	1,64	10,13
150	2,49	0,21	6,32	0,15	0,03	1,57	10,76
180	2,56	0,23	6,89	0,16	0,04	1,56	11,45
210	2,60	0,24	7,28	0,19	0,04	1,54	11,89
240	2,58	0,27	7,67	0,23	0,06	1,55	12,36

n.d.: no detectado.

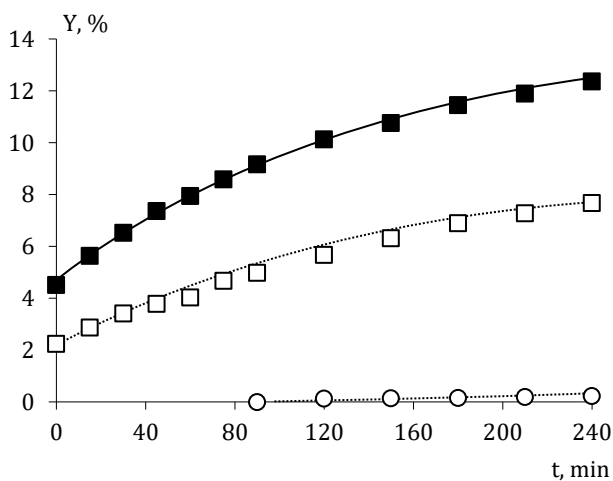


Figura AP2.22: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl17.

Tabla AP2.27:
Experimento HC-Cl18. 0,5 N HCl. T = 95 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	2,41	0,22	3,30	0,13	0,02	1,24	7,31
15	2,98	0,51	5,05	0,89	0,02	1,58	11,03
30	3,24	0,58	6,25	1,74	0,02	1,62	13,45
45	3,42	0,72	7,01	2,71	0,02	1,64	15,52
60	3,51	0,77	8,03	3,41	0,03	1,64	17,39
75	3,50	0,86	8,91	5,21	0,03	1,64	20,15
90	3,52	1,08	9,98	6,05	0,05	1,64	22,32
120	3,51	1,21	11,34	7,45	0,06	1,60	25,17
150	3,54	1,44	12,67	8,85	0,06	1,63	28,18
180	3,65	1,46	13,02	9,01	0,08	1,58	28,80
210	3,67	1,50	13,55	9,09	0,10	1,55	29,46
240	3,84	1,51	13,76	9,30	0,11	1,54	30,06

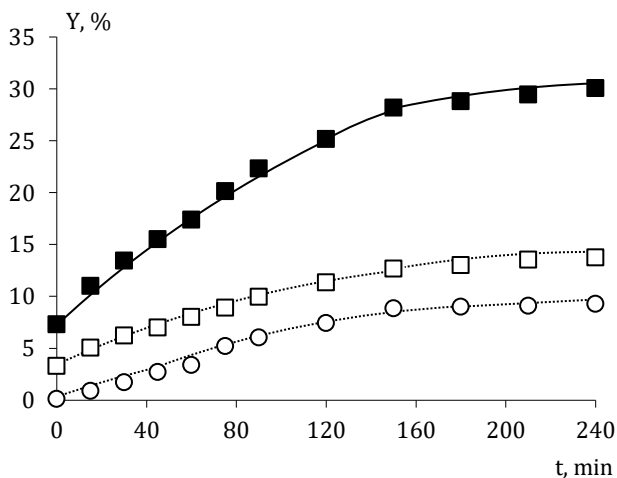


Figura AP2.23: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl18.

Tabla AP2.28:
Experimento HC-Cl19. 0,7 N HCl. T = 95 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	3,29	0,49	5,38	1,35	0,03	1,17	11,71
15	3,79	0,73	7,96	2,56	0,03	1,56	16,62
30	4,18	0,93	9,41	3,98	0,04	1,59	20,13
45	4,22	1,10	11,13	5,76	0,04	1,64	23,89
60	4,28	1,22	12,56	7,01	0,05	1,63	26,75
75	4,09	1,29	13,12	7,98	0,05	1,64	28,18
90	4,23	1,40	14,02	8,95	0,05	1,63	30,28
120	4,26	1,50	14,04	9,53	0,06	1,61	31,00
150	4,26	1,58	14,28	9,78	0,08	1,56	31,54
180	4,33	1,61	14,37	10,03	0,10	1,60	32,05
210	4,63	1,62	14,83	10,10	0,11	1,51	32,79
240	4,42	1,63	15,04	10,27	0,12	1,51	32,99

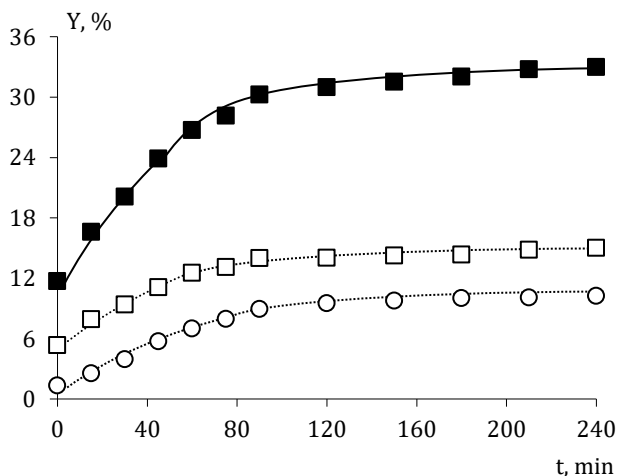


Figura AP2.24: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl19.

Tabla AP2.29:
Experimento HC-Cl20. 1,0 N HCl. T = 95 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	1,85	0,57	5,47	2,14	0,04	1,22	11,29
15	2,21	0,74	8,92	4,88	0,04	1,63	18,42
30	2,54	1,11	12,12	7,05	0,06	1,64	24,53
45	3,19	1,23	13,76	8,91	0,06	1,61	28,76
60	3,20	1,38	14,23	9,00	0,09	1,60	29,49
75	3,50	1,40	14,54	9,22	0,10	1,64	30,39
90	3,79	1,42	14,78	9,67	0,11	1,64	31,41
120	3,94	1,61	15,96	10,10	0,11	1,63	33,35
150	4,15	1,66	15,75	10,71	0,11	1,58	33,96
180	4,24	1,68	15,72	10,33	0,12	1,52	33,61
210	3,77	1,70	15,88	10,79	0,15	1,47	33,76
240	4,01	1,72	15,92	10,46	0,16	1,48	33,75

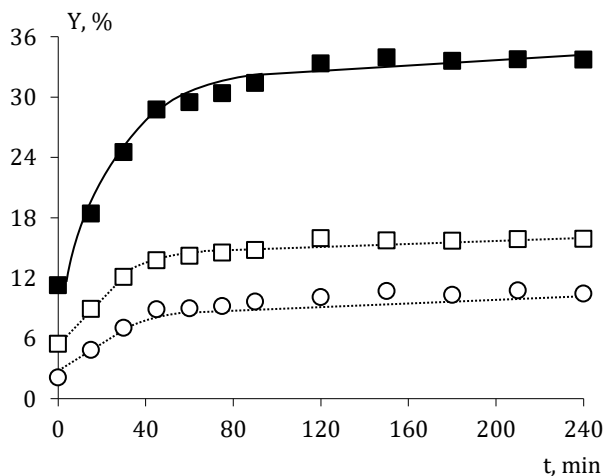


Figura AP2.25: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-Cl20.

c) Inhibidores

En la Tabla AP2.30 se recogen los inhibidores correspondientes a los hidrolizados obtenidos en cada uno de los experimentos realizados con poda de olivar y en los que se empleó HCl como agente hidrolítico. Los resultados corresponden a tiempo experimental 240 minutos.

Tabla AP2.30:
Caracterización en inhibidores de los hidrolizados obtenidos
en los experimentos realizados con poda de olivar empleando HCl.

Ensayo	T, °C	CHCl, N	F, g m ⁻³	HMF, g m ⁻³	AcH, kg m ⁻³	CFT, kg m ⁻³
HC-Cl1	75	0,1	n.d.	1,41	0,93	1,86
HC-Cl2	75	0,5	1,04	67,22	3,08	2,49
HC-Cl3	75	0,7	7,21	79,77	3,46	2,57
HC-Cl4	75	1,0	11,56	91,84	4,07	2,71
HC-Cl5	80	0,1	n.d.	9,31	0,60	1,72
HC-Cl6	80	0,5	3,02	94,45	2,92	2,64
HC-Cl7	80	0,7	19,38	173,55	3,71	2,72
HC-Cl8	80	1,0	34,54	187,11	3,87	2,86
HC-Cl9	85	0,1	n.d.	29,31	1,29	2,04
HC-Cl10	85	0,5	12,76	138,64	3,45	2,66
HC-Cl11	85	0,7	29,33	249,32	3,90	2,89
HC-Cl12	85	1,0	48,76	273,19	4,16	2,94
HC-Cl13	90	0,1	n.d.	48,54	1,60	2,18
HC-Cl14	90	0,5	39,33	197,53	3,43	2,73
HC-Cl15	90	0,7	53,92	303,47	4,04	2,92
HC-Cl16	90	1,0	97,44	331,89	4,45	3,11
HC-Cl17	95	0,1	n.d.	64,27	1,99	2,26
HC-Cl18	95	0,5	62,34	276,52	4,18	2,89
HC-Cl19	95	0,7	102,78	366,87	4,49	3,16
HC-Cl20	95	1,0	141,23	421,33	4,74	3,21

n.d.: no detectado.

AP2.2.3. Experimentos realizados con H₂SO₄

a) Residuos sólidos

Tabla AP2.31:
Caracterización de la poda de olivar
tras las hidrólisis realizadas con H₂SO₄.

Ensayo	T, °C	C _{H₂SO₄} , N	CEL, %	HEM, %	LIG, %	CEN, %
HC-S1	75	0,1	30,11	17,99	25,75	2,32
HC-S2	75	0,5	29,45	16,47	26,46	1,54
HC-S3	75	0,7	29,03	15,62	26,14	1,01
HC-S4	75	1,0	32,35	16,32	30,91	0,97
HC-S5	80	0,1	29,65	17,33	25,72	1,98
HC-S6	80	0,5	30,04	16,25	27,36	0,66
HC-S7	80	0,7	31,72	15,21	29,70	0,57
HC-S8	80	1,0	31,87	13,72	31,03	0,69
HC-S9	85	0,1	28,43	16,34	25,01	1,83
HC-S10	85	0,5	29,76	14,98	28,42	0,15
HC-S11	85	0,7	30,64	12,06	30,02	0,24
HC-S12	85	1,0	28,32	2,65	29,31	0,17
HC-S13	90	0,1	27,84	15,49	25,00	1,74
HC-S14	90	0,5	30,48	7,38	30,41	0,11
HC-S15	90	0,7	31,22	4,21	32,56	0,09
HC-S16	90	1,0	29,78	0,11	31,14	0,14
HC-S17	95	0,1	32,76	15,83	30,01	1,88
HC-S18	95	0,5	32,54	2,53	33,08	0,17
HC-S19	95	0,7	30,62	0,28	32,09	0,11
HC-S20	95	1,0	31,54	0,00	33,12	0,14

b) Hidrolizados

Tabla AP2.32:
Experimento HC-S1. 0,1 N H₂SO₄. T = 75 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	n.d.	0,05	0,74	n.d.	0,02	0,42	1,23
15	n.d.	0,06	0,96	n.d.	0,02	0,55	1,59
30	0,01	0,07	1,28	n.d.	0,02	0,56	1,95
45	0,01	0,07	1,54	n.d.	0,02	0,61	2,26
60	0,02	0,07	1,76	n.d.	0,02	0,61	2,48
75	0,03	0,07	1,87	n.d.	0,02	0,66	2,65
90	0,03	0,07	1,89	n.d.	0,02	0,66	2,66
120	0,05	0,07	1,98	n.d.	0,02	0,68	2,80
150	0,06	0,07	2,13	n.d.	0,02	0,72	3,00
180	0,08	0,07	2,18	n.d.	0,02	0,79	3,14
210	0,09	0,07	2,37	n.d.	0,02	0,79	3,34
240	0,09	0,07	2,41	n.d.	0,02	0,80	3,39

n.d.: no detectado.

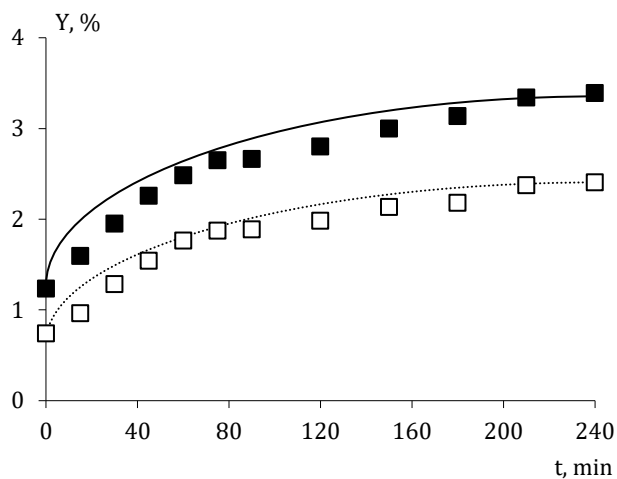


Figura AP2.26: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■) y D-glucosa (□) con el tiempo en el experimento HC-S1.

Tabla AP2.33:
Experimento HC-S2. 0,5 N H₂SO₄. T = 75 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	0,21	0,01	0,86	n.d.	0,01	0,79	1,88
15	0,65	0,01	1,38	n.d.	0,01	0,81	2,87
30	0,95	0,04	1,94	n.d.	0,01	0,83	3,76
45	1,31	0,06	2,32	n.d.	0,01	0,83	4,53
60	1,66	0,10	2,44	n.d.	0,01	0,84	5,05
75	1,83	0,11	2,55	n.d.	0,01	0,84	5,35
90	2,00	0,13	2,62	n.d.	0,01	0,85	5,61
120	2,42	0,15	2,82	0,01	0,01	0,86	6,28
150	2,41	0,16	3,24	0,02	0,02	0,86	6,72
180	2,42	0,17	3,25	0,05	0,02	0,86	6,77
210	2,42	0,18	3,28	0,05	0,03	0,86	6,83
240	2,48	0,21	3,35	0,07	0,03	0,86	7,00

n.d.: no detectado.

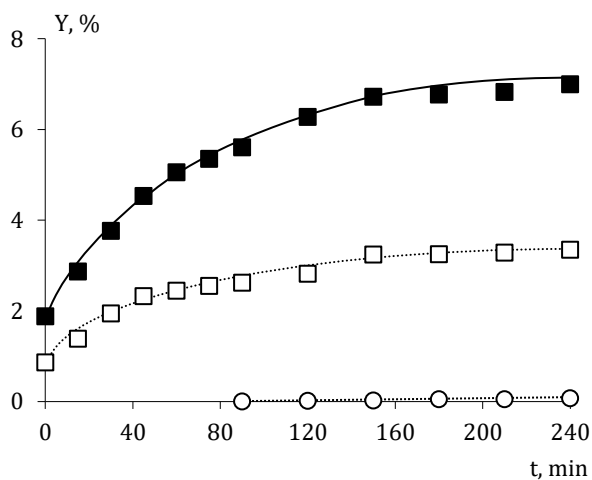


Figura AP2.27: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-S2.

Tabla AP2.34:
Experimento HC-S3. 0,7 N H₂SO₄. T = 75 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	0,79	0,09	1,17	n.d.	0,02	0,93	3,00
15	1,13	0,09	1,82	n.d.	0,02	1,14	4,20
30	1,59	0,11	2,55	n.d.	0,02	1,12	5,39
45	1,78	0,12	3,19	n.d.	0,01	1,13	6,24
60	2,06	0,13	3,32	0,02	0,02	1,12	6,67
75	2,10	0,14	3,33	0,02	0,02	1,10	6,71
90	2,36	0,15	3,38	0,02	0,02	1,13	7,06
120	2,48	0,18	3,32	0,08	0,02	1,18	7,26
150	2,61	0,20	3,61	0,07	0,03	1,14	7,65
180	2,74	0,23	3,58	0,13	0,02	1,12	7,82
210	2,65	0,24	3,58	0,14	0,05	1,13	7,78
240	2,69	0,26	3,59	0,13	0,02	1,13	7,82

n.d.: no detectado.

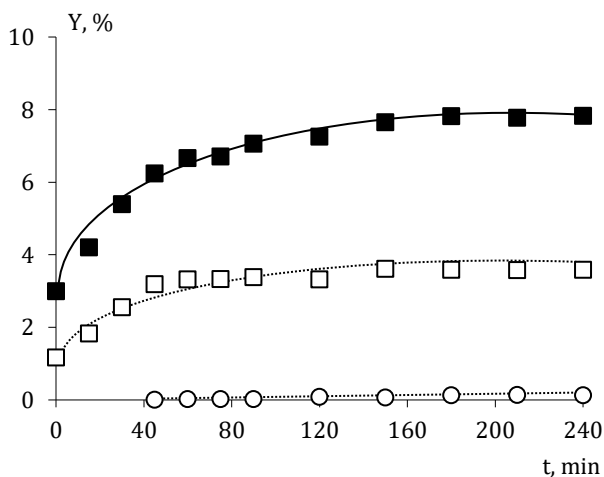


Figura AP2.28: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-S3.

Tabla AP2.35:
Experimento HC-S4. 1,0 N H₂SO₄. T = 75 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	0,94	0,07	1,85	n.d.	0,02	0,93	3,81
15	1,18	0,11	2,87	n.d.	0,02	1,09	5,26
30	1,29	0,11	3,23	n.d.	0,02	1,12	5,77
45	1,48	0,15	3,88	0,01	0,02	1,13	6,67
60	2,07	0,16	3,93	0,02	0,02	1,11	7,31
75	2,20	0,18	4,11	0,07	0,02	1,13	7,71
90	2,65	0,18	4,22	0,07	0,03	1,10	8,25
120	2,77	0,19	4,24	0,07	0,03	1,17	8,47
150	2,78	0,24	4,50	0,10	0,03	1,17	8,82
180	2,81	0,29	4,63	0,21	0,03	1,18	9,15
210	2,98	0,35	5,16	0,34	0,03	1,16	10,02
240	3,08	0,38	5,31	0,50	0,03	1,15	10,45

n.d.: no detectado.

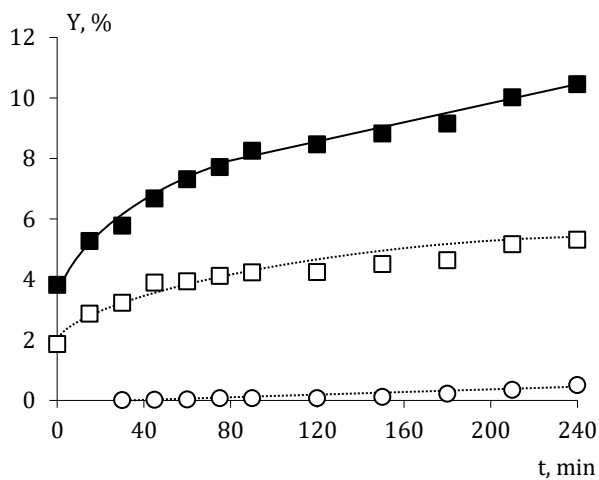


Figura AP2.29: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-S4.

Tabla AP2.36:
Experimento HC-S5. 0,1 N H₂SO₄. T = 80 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	0,02	0,05	1,92	n.d.	0,02	0,96	2,97
15	0,03	0,05	2,15	n.d.	0,02	1,04	3,28
30	0,05	0,05	2,77	n.d.	0,01	1,03	3,92
45	0,08	0,05	2,85	n.d.	0,02	1,03	4,03
60	0,09	0,05	2,89	n.d.	0,01	1,03	4,08
75	0,13	0,06	2,92	n.d.	0,02	1,04	4,15
90	0,15	0,06	3,02	n.d.	0,02	1,04	4,28
120	0,19	0,06	3,10	n.d.	0,02	1,03	4,39
150	0,25	0,06	3,11	n.d.	0,02	1,03	4,47
180	0,31	0,06	3,15	n.d.	0,02	1,03	4,58
210	0,36	0,06	3,16	n.d.	0,02	1,03	4,63
240	0,43	0,06	3,20	n.d.	0,02	1,04	4,74

n.d.: no detectado.

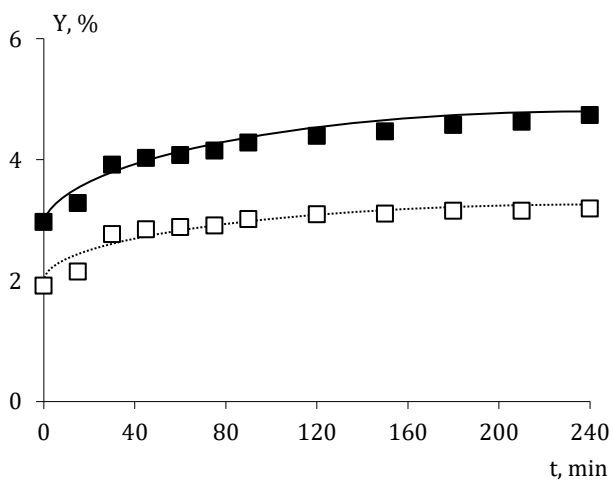


Figura AP2.30: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■) y D-glucosa (□) con el tiempo en el experimento HC-S5.

Tabla AP2.37:
Experimento HC-S6. 0,5 N H₂SO₄. T = 80 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	0,54	0,03	1,41	n.d.	0,02	1,40	3,40
15	0,60	0,04	1,93	n.d.	0,02	1,83	4,41
30	0,80	0,04	2,51	n.d.	0,02	1,89	5,26
45	1,31	0,04	2,70	n.d.	0,02	1,65	5,72
60	1,62	0,11	3,08	n.d.	0,02	1,49	6,31
75	1,72	0,14	3,12	n.d.	0,02	1,49	6,49
90	2,17	0,15	3,22	n.d.	0,02	1,40	6,96
120	2,18	0,15	3,23	n.d.	0,02	1,48	7,06
150	2,28	0,16	3,32	n.d.	0,02	1,48	7,27
180	2,34	0,16	3,34	n.d.	0,02	1,44	7,29
210	2,39	0,18	3,35	n.d.	0,02	1,41	7,34
240	2,47	0,19	3,40	n.d.	0,02	1,46	7,53

n.d.: no detectado.

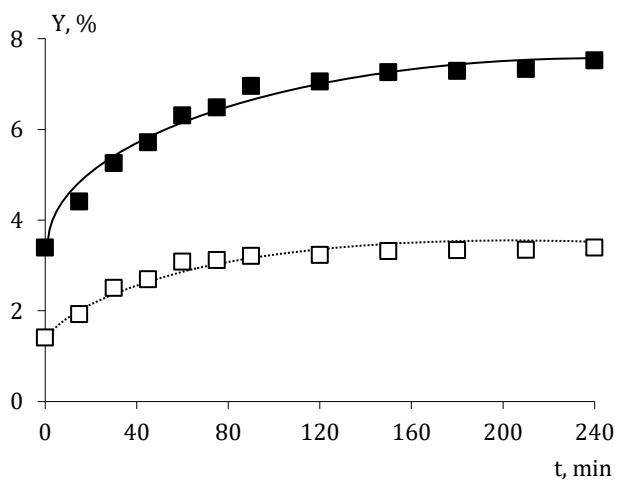


Figura AP2.31: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■) y D-glucosa (□) con el tiempo en el experimento HC-S6.

Tabla AP2.38:
Experimento HC-S7. 0,7 N H₂SO₄. T = 80 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	0,66	0,09	3,30	n.d.	0,02	0,98	5,05
15	0,79	0,13	3,96	n.d.	0,02	1,27	6,16
30	1,30	0,16	4,19	0,01	0,02	1,47	7,15
45	1,59	0,18	4,22	0,02	0,02	1,50	7,54
60	1,76	0,20	4,24	0,03	0,02	1,50	7,75
75	1,89	0,22	4,31	0,06	0,03	1,50	8,02
90	1,99	0,25	4,48	0,08	0,03	1,50	8,33
120	2,17	0,30	4,94	0,15	0,03	1,55	9,13
150	2,18	0,32	5,10	0,23	0,03	1,57	9,44
180	2,60	0,34	5,14	0,29	0,03	1,58	9,97
210	2,80	0,42	5,16	0,48	0,03	1,57	10,45
240	2,82	0,44	5,18	0,64	0,06	1,56	10,70

n.d.: no detectado.

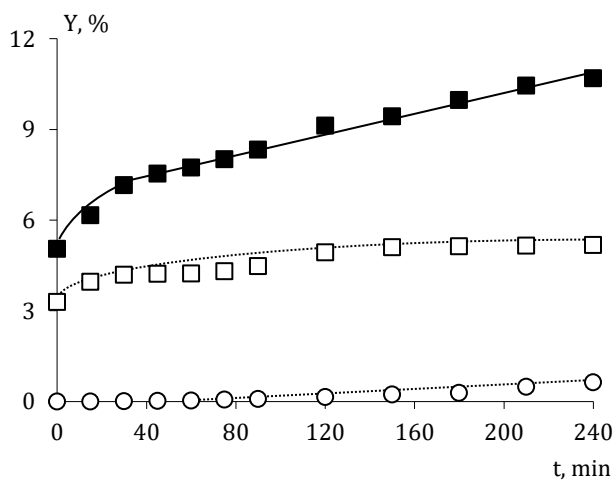


Figura AP2.32: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-S7.

Tabla AP2.39:
Experimento HC-S8. 1,0 N H₂SO₄. T = 80 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	1,43	0,09	2,29	n.d.	0,02	0,94	4,77
15	2,15	0,13	3,22	0,02	0,02	1,32	6,87
30	2,67	0,18	3,75	0,07	0,02	1,41	8,10
45	2,69	0,20	3,87	0,09	0,02	1,42	8,28
60	2,71	0,24	3,87	0,18	0,02	1,42	8,44
75	2,74	0,27	3,98	0,21	0,03	1,45	8,66
90	2,84	0,31	4,37	0,32	0,05	1,46	9,34
120	2,93	0,33	4,47	0,51	0,05	1,53	9,82
150	2,96	0,39	5,08	0,84	0,05	1,55	10,87
180	3,00	0,43	5,13	1,15	0,05	1,56	11,32
210	3,11	0,51	5,28	1,58	0,06	1,57	12,11
240	3,13	0,54	5,65	1,88	0,06	1,57	12,83

n.d.: no detectado.

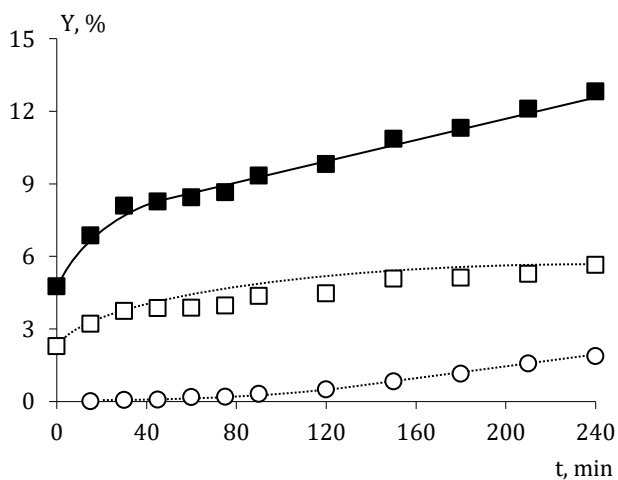


Figura AP2.33: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-S8.

Tabla AP2.40:
Experimento HC-S9. 0,1 N H₂SO₄. T = 85 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	0,01	0,05	2,56	n.d.	0,01	0,68	3,32
15	0,11	0,06	2,64	n.d.	0,01	1,34	4,16
30	0,20	0,06	2,86	n.d.	0,02	1,37	4,51
45	0,25	0,06	2,87	n.d.	0,02	1,37	4,57
60	0,36	0,06	3,06	n.d.	0,02	1,38	4,88
75	0,41	0,07	3,04	n.d.	0,02	1,36	4,90
90	0,49	0,07	3,04	n.d.	0,02	1,35	4,96
120	0,57	0,07	3,06	n.d.	0,02	1,34	5,06
150	0,77	0,08	3,07	n.d.	0,02	1,33	5,27
180	1,05	0,08	3,08	n.d.	0,02	1,31	5,55
210	1,09	0,08	3,08	n.d.	0,02	1,31	5,58
240	1,15	0,09	3,12	n.d.	0,02	1,31	5,69

n.d.: no detectado.

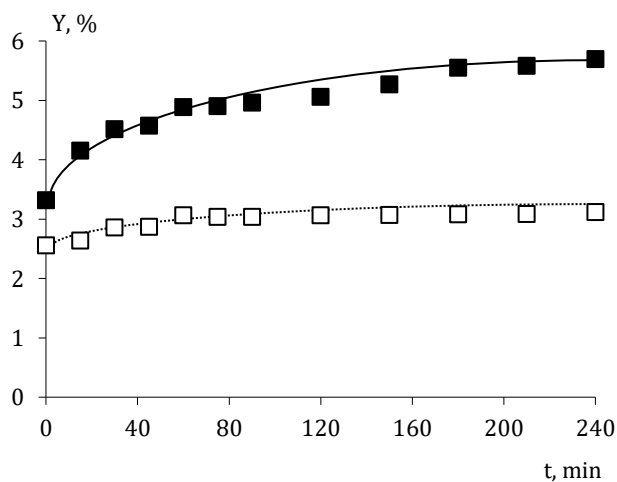


Figura AP2.34: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■) y D-glucosa (□) con el tiempo en el experimento HC-S9.

Tabla AP2.41:
Experimento HC-S10. 0,5 N H2SO4. T = 85 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	0,56	0,08	2,38	n.d.	n.d.	0,90	4,07
15	1,01	0,09	2,83	0,01	0,02	1,25	5,36
30	1,84	0,14	3,13	0,02	0,03	1,32	6,18
45	2,25	0,17	3,26	0,03	0,03	1,42	7,06
60	2,22	0,17	3,45	0,04	0,03	1,58	7,65
75	2,64	0,19	3,46	0,06	0,04	1,75	8,30
90	2,84	0,23	3,51	0,06	0,04	1,62	8,81
120	3,05	0,29	3,82	0,14	0,05	1,57	9,27
150	3,12	0,33	3,87	0,23	0,05	1,57	9,49
180	2,91	0,34	4,21	0,32	0,05	1,58	10,02
210	2,87	0,39	4,59	0,53	0,05	1,46	10,39
240	2,96	0,43	5,17	0,72	0,06	1,41	10,76

n.d.: no detectado.

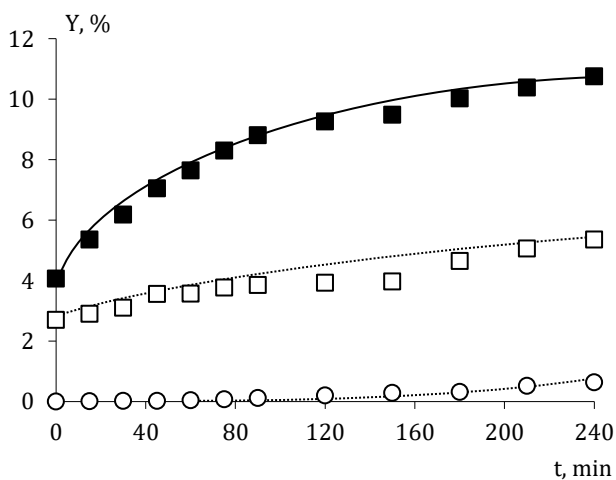


Figura AP2.35: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-S10.

Tabla AP2.42:
Experimento HC-S11. 0,7 N H₂SO₄. T = 85 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	0,75	0,09	2,67	n.d.	0,03	0,90	4,45
15	1,68	0,16	3,44	n.d.	0,04	1,42	6,75
30	2,84	0,20	3,52	0,01	0,04	1,58	8,19
45	2,93	0,20	3,62	0,08	0,04	1,58	8,44
60	2,96	0,29	3,82	0,14	0,04	1,62	8,86
75	3,04	0,31	4,03	0,23	0,05	1,65	9,31
90	3,11	0,37	4,44	0,39	0,05	1,73	10,09
120	3,12	0,39	4,50	0,59	0,06	1,60	10,25
150	3,13	0,46	4,96	0,93	0,06	1,60	11,14
180	3,14	0,53	5,45	1,37	0,08	1,58	12,15
210	3,16	0,59	6,10	1,79	0,09	1,55	13,27
240	3,17	0,64	6,22	2,06	0,09	1,54	13,72

n.d.: no detectado.

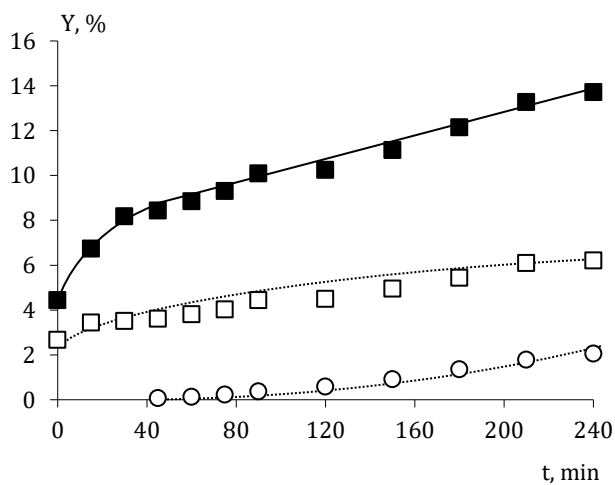


Figura AP2.36: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-S11.

Tabla AP2.43:
Experimento HC-S12. 1,0 N H₂SO₄. T = 85 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	2,27	0,22	2,91	0,02	0,03	0,99	6,43
15	2,60	0,17	5,05	0,12	0,04	1,48	9,46
30	2,92	0,25	5,12	0,14	0,05	1,59	10,06
45	3,72	0,33	7,39	0,25	0,06	1,57	13,31
60	4,03	0,45	9,12	0,55	0,07	1,62	15,83
75	4,05	0,53	10,38	0,96	0,08	1,63	17,62
90	4,06	0,58	10,72	1,25	0,08	1,62	18,30
120	4,06	0,75	11,14	2,46	0,08	1,58	20,06
150	4,07	1,04	12,01	3,89	0,08	1,62	22,71
180	4,07	1,05	12,70	4,55	0,08	1,59	24,05
210	4,08	1,05	13,05	5,01	0,08	1,58	24,85
240	4,08	1,04	13,22	5,47	0,08	1,58	25,46

n.d.: no detectado.

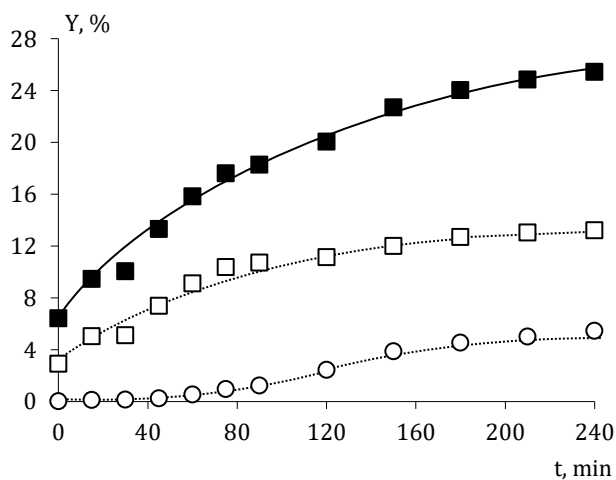


Figura AP2.37: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-S12.

Tabla AP2.44:
Experimento HC-S13. 0,1 N H₂SO₄. T = 90 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	0,02	0,05	1,48	n.d.	0,01	0,89	2,45
15	0,10	0,06	1,74	n.d.	0,01	1,31	3,22
30	0,18	0,06	2,01	n.d.	0,01	1,33	3,59
45	0,22	0,07	2,82	0,01	0,02	1,34	4,47
60	0,39	0,07	3,10	0,02	0,02	1,34	4,93
75	0,43	0,07	3,15	0,02	0,02	1,33	5,01
90	0,53	0,07	3,17	0,02	0,02	1,34	5,15
120	0,68	0,08	3,29	0,02	0,02	1,34	5,44
150	0,84	0,08	3,30	0,02	0,02	1,33	5,58
180	1,03	0,09	3,30	0,02	0,02	1,34	5,79
210	1,13	0,11	3,32	0,02	0,02	1,35	5,96
240	1,18	0,11	3,35	0,02	0,02	1,34	6,02

n.d.: no detectado.

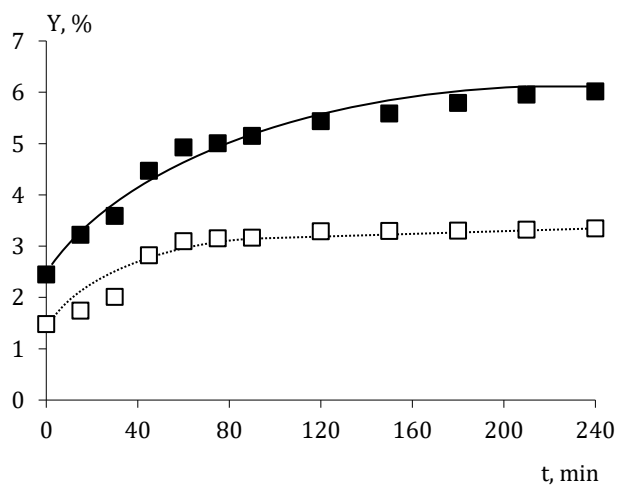


Figura AP2.38: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■) y D-glucosa (□) con el tiempo en el experimento HC-S13.

Tabla AP2.45:
Experimento HC-S14. 0,5 N H₂SO₄. T = 90 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	0,90	0,08	2,39	0,03	0,01	0,92	4,33
15	1,79	0,14	3,91	0,07	0,02	1,35	7,27
30	2,06	0,19	4,10	0,18	0,02	1,52	8,06
45	2,36	0,22	4,39	0,29	0,03	1,60	8,89
60	2,22	0,26	4,88	0,89	0,04	1,58	9,87
75	2,21	0,28	5,50	1,15	0,05	1,63	10,81
90	2,22	0,32	6,10	1,45	0,05	1,61	11,74
120	2,02	0,41	6,98	2,23	0,05	1,57	13,25
150	2,44	0,53	7,73	3,00	0,06	1,55	15,30
180	2,60	0,59	8,12	3,57	0,06	1,58	16,53
210	2,72	0,69	8,98	4,35	0,06	1,55	18,36
240	2,96	0,70	9,56	5,15	0,06	1,53	19,96

n.d.: no detectado.

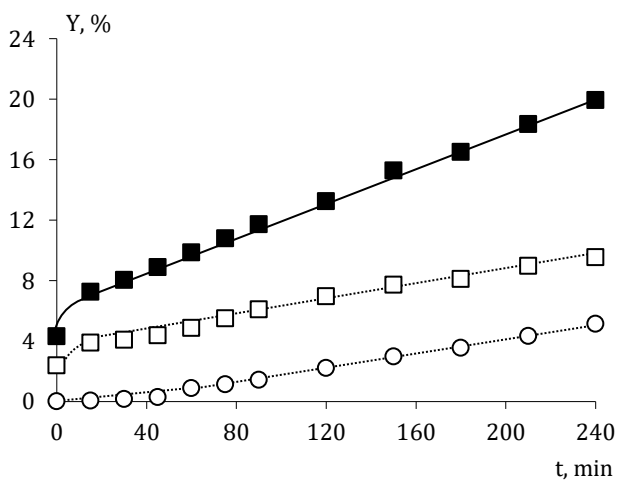


Figura AP2.39: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-S14.

Tabla AP2.46:
Experimento HC-S15. 0,7 N H₂SO₄. T = 90 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	1,32	0,11	2,54	n.d.	0,02	0,87	4,86
15	2,40	0,19	2,88	0,03	0,01	1,24	6,75
30	2,73	0,26	3,68	0,11	0,03	1,46	8,27
45	2,73	0,30	4,23	0,19	0,03	1,59	9,07
60	2,38	0,41	5,43	0,43	0,05	1,61	10,30
75	2,92	0,42	6,55	0,87	0,05	1,61	12,41
90	3,02	0,45	7,43	1,22	0,07	1,57	13,76
120	3,11	0,56	8,87	2,43	0,08	1,53	16,58
150	3,28	0,69	9,54	4,12	0,11	1,55	19,29
180	3,19	0,73	11,03	5,32	0,13	1,58	21,99
210	3,36	0,85	11,87	6,07	0,13	1,58	23,84
240	3,74	0,92	12,03	6,64	0,13	1,55	25,01

n.d.: no detectado.

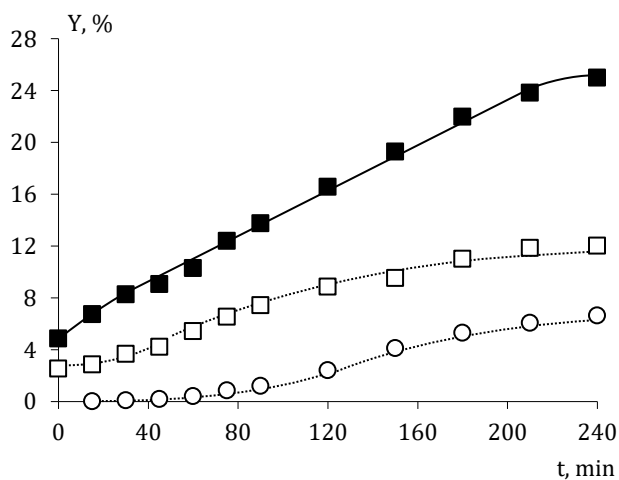


Figura AP2.40: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-S15.

Tabla AP2.47:
Experimento HC-S16. 1,0 N H₂SO₄. T = 90 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	1,24	0,17	2,94	0,03	0,03	1,06	5,47
15	2,54	0,29	4,49	0,19	0,05	1,47	9,03
30	3,90	0,42	4,96	0,47	0,08	1,65	11,48
45	4,29	0,51	5,40	1,67	0,09	1,61	13,57
60	4,35	0,72	6,36	2,21	0,09	1,64	15,38
75	4,48	0,74	7,29	2,65	0,15	1,64	16,95
90	4,52	0,80	7,20	3,17	0,16	1,63	17,48
120	4,68	0,98	9,22	4,32	0,17	1,65	21,02
150	4,76	1,15	10,74	5,81	0,17	1,62	24,24
180	4,97	1,30	12,36	7,09	0,17	1,64	27,53
210	4,94	1,41	13,88	8,38	0,17	1,63	30,42
240	4,95	1,47	14,18	8,38	0,17	1,60	30,75

n.d.: no detectado.

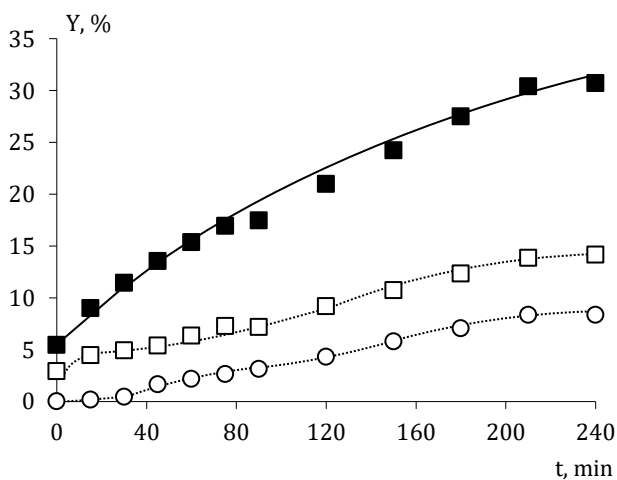


Figura AP2.41: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-S16.

Tabla AP2.48:
Experimento HC-S17. 0,1 N H₂SO₄. T = 95 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	0,29	0,05	2,54	n.d.	0,01	0,81	3,71
15	0,48	0,06	2,82	n.d.	0,01	1,23	4,61
30	0,63	0,07	2,94	n.d.	0,02	1,34	5,00
45	0,68	0,06	3,09	n.d.	0,02	1,35	5,20
60	0,84	0,07	3,15	n.d.	0,02	1,36	5,44
75	0,98	0,08	3,50	0,01	0,02	1,35	5,94
90	1,12	0,08	3,76	0,01	0,02	1,35	6,34
120	1,43	0,10	4,14	0,02	0,02	1,36	7,07
150	1,59	0,11	4,94	0,02	0,02	1,33	8,02
180	1,80	0,11	5,76	0,02	0,03	1,34	9,06
210	2,20	0,13	6,17	0,03	0,03	1,33	9,89
240	2,67	0,14	6,49	0,03	0,04	1,32	10,68

n.d.: no detectado.

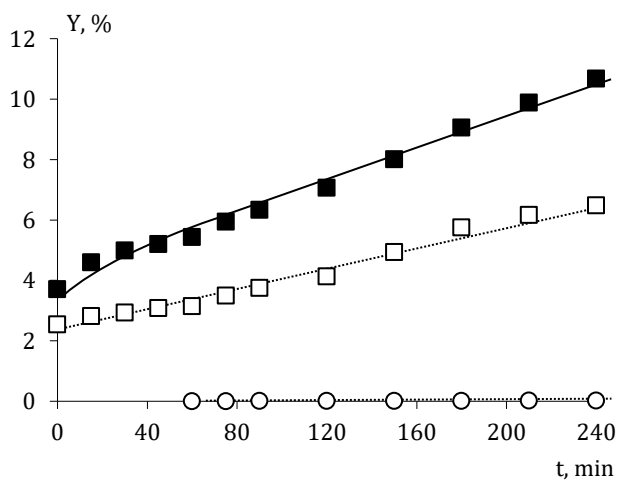


Figura AP2.42: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-S17.

Tabla AP2.49:
Experimento HC-S18. 0,5 N H₂SO₄. T = 95 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	2,07	0,08	2,29	n.d.	0,04	0,89	5,37
15	3,24	0,20	3,18	0,06	0,05	1,13	7,86
30	3,39	0,29	4,20	0,21	0,06	1,37	9,53
45	3,53	0,39	4,95	0,65	0,07	1,48	11,06
60	3,66	0,42	5,35	0,93	0,07	1,49	11,92
75	4,04	0,56	6,78	1,67	0,07	1,53	14,66
90	4,08	0,64	7,03	2,54	0,07	1,48	15,83
120	4,20	0,79	8,34	3,43	0,07	1,49	18,32
150	4,32	0,81	10,03	4,17	0,07	1,45	20,85
180	4,37	0,86	11,73	4,68	0,07	1,52	23,22
210	4,55	0,98	12,45	5,58	0,07	1,51	25,15
240	4,67	1,04	13,34	5,79	0,07	1,49	26,41

n.d.: no detectado.

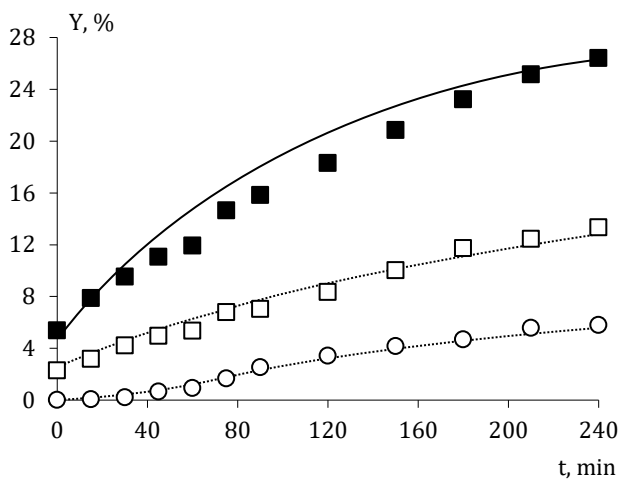


Figura AP2.43: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-S18.

Tabla AP2.50:
Experimento HC-S19. 0,7 N H₂SO₄. T = 95 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	3,45	0,44	4,03	0,58	0,07	0,87	9,44
15	3,88	0,54	5,89	0,94	0,09	1,19	12,52
30	3,98	0,66	6,54	1,41	0,12	1,44	14,14
45	4,01	0,74	7,49	2,03	0,16	1,58	16,01
60	4,02	0,79	8,33	2,60	0,15	1,54	17,44
75	4,09	0,86	9,88	3,27	0,16	1,57	19,82
90	4,13	0,92	10,74	3,80	0,16	1,61	21,35
120	4,46	1,15	11,62	4,83	0,18	1,58	23,81
150	4,67	1,27	12,88	5,62	0,18	1,49	26,11
180	4,65	1,36	13,77	6,80	0,19	1,53	28,30
210	4,73	1,42	14,65	6,75	0,21	1,48	29,24
240	4,74	1,52	15,32	7,76	0,22	1,51	31,07

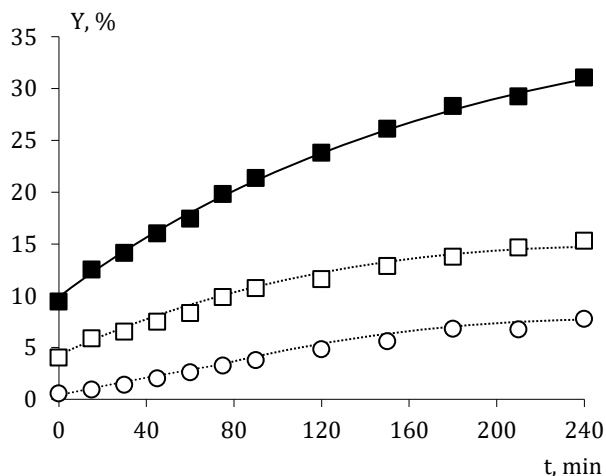


Figura AP2.44: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HC-S19.

Tabla AP2.51:
Experimento HC-S20. 1,0 N H₂SO₄. T = 95 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	2,55	0,22	5,03	0,69	0,03	1,14	9,66
15	2,60	0,69	6,77	1,98	0,03	1,36	13,42
30	3,15	0,66	7,85	2,45	0,07	1,53	15,71
45	3,61	0,75	8,18	3,07	0,09	1,61	17,31
60	3,81	0,33	9,63	3,58	0,11	1,55	19,01
75	4,28	0,83	10,67	4,66	0,12	1,58	22,14
90	4,29	0,96	11,49	5,74	0,13	1,52	24,14
120	4,31	1,27	12,45	6,74	0,15	1,49	26,41
150	4,31	1,34	13,77	7,42	0,19	1,51	28,54
180	4,31	1,50	14,04	8,85	0,23	1,53	30,46
210	4,35	1,52	15,06	9,76	0,23	1,49	32,42
240	4,54	1,57	15,88	9,87	0,24	1,48	33,58

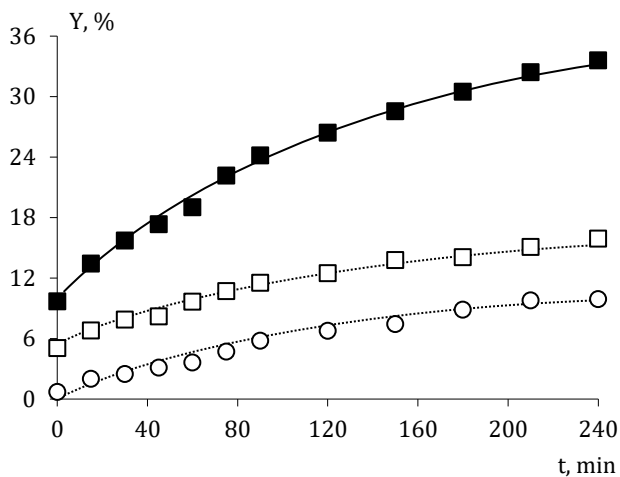


Figura AP2.45: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (O) con el tiempo en el experimento HC-S20.

c) Inhibidores

En la Tabla AP2.52 se recogen los inhibidores correspondientes a los hidrolizados obtenidos en cada uno de los experimentos realizados con poda de olivar y en los que se empleó H₂SO₄ como agente hidrolítico. Los resultados corresponden a tiempo experimental 240 minutos.

Tabla AP2.52:

Caracterización en inhibidores de los hidrolizados obtenidos en los experimentos realizados con poda de olivar empleando H₂SO₄.

Ensayo	T, °C	CH ₂ SO ₄ , N	F, g m ⁻³	HMF, g m ⁻³	AcH, kg m ⁻³	CFT, kg m ⁻³
HC-S1	75	0,1	n.d.	0,87	0,11	1,45
HC-S2	75	0,5	n.d.	18,31	1,93	2,09
HC-S3	75	0,7	n.d.	37,93	2,42	2,22
HC-S4	75	1,0	n.d.	58,71	3,11	2,31
HC-S5	80	0,1	n.d.	3,14	0,52	1,76
HC-S6	80	0,5	n.d.	31,65	2,39	2,15
HC-S7	80	0,7	n.d.	69,77	2,75	2,29
HC-S8	80	1,0	1,88	73,29	3,27	2,51
HC-S9	85	0,1	n.d.	9,83	0,94	1,87
HC-S10	85	0,5	n.d.	77,61	2,52	2,21
HC-S11	85	0,7	4,76	98,74	3,30	2,43
HC-S12	85	1,0	27,33	159,34	3,78	2,58
HC-S13	90	0,1	n.d.	17,22	0,91	1,53
HC-S14	90	0,5	12,34	117,98	3,17	2,38
HC-S15	90	0,7	20,61	199,32	3,10	2,51
HC-S16	90	1,0	58,78	240,77	4,06	2,67
HC-S17	95	0,1	n.d.	39,23	1,44	2,03
HC-S18	95	0,5	22,37	125,74	3,48	2,54
HC-S19	95	0,7	61,92	278,12	3,75	2,77
HC-S20	95	1,0	81,34	337,43	3,90	2,62

n.d.: no detectado.

AP2.3. Hidrólisis de poda de olivar sin hoja

AP2.3.1. Experimentos realizados con HCl

a) Residuos sólidos

Tabla AP2.53:
Caracterización de la poda de olivar sin hoja
resultante de las hidrólisis realizadas con HCl.

Ensayo	T, °C	C _{HCl} , N	CEL, %	HEM, %	LIG, %	CEN, %
HSh-Cl1	85	0,5	53,43	7,45	27,38	0,15
HSh-Cl2	85	1,0	55,80	2,13	29,59	0,20
HSh-Cl3	85	1,5	54,49	0,65	29,71	0,23
HSh-Cl4	85	2,0	56,50	0,09	31,11	0,20
HSh-Cl5	90	0,5	54,20	2,77	28,37	0,19
HSh-Cl6	90	1,0	55,20	0,33	29,92	0,19
HSh-Cl7	90	1,5	50,87	0,00	30,34	0,10
HSh-Cl8	90	2,0	51,14	0,00	31,84	0,16
HSh-Cl9	95	0,5	57,00	0,19	30,75	0,31
HSh-Cl10	95	1,0	55,99	0,00	32,55	0,20
HSh-Cl11	95	1,5	52,26	0,00	32,56	0,08
HSh-Cl12	95	2,0	50,32	0,00	32,03	0,14
HSh-Cl13	100	0,5	54,76	0,00	31,13	0,19
HSh-Cl14	100	1,0	52,98	0,00	32,04	0,14
HSh-Cl15	100	1,5	52,31	0,00	33,79	0,15
HSh-Cl16	100	2,0	49,02	0,00	33,60	0,17

b) Hidrolizados

Tabla AP2.54:
Experimento HSh-Cl1. 0,5NHCl. T = 85°C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	0,40	0,05	0,85	n.d.	n.d.	n.d.	1,30
15	1,74	0,07	1,31	n.d.	n.d.	n.d.	3,11
30	2,29	0,12	1,71	0,15	n.d.	n.d.	4,27
45	2,44	0,17	2,11	0,65	n.d.	n.d.	5,37
60	2,39	0,21	2,54	1,30	0,04	n.d.	6,48
75	2,20	0,23	2,67	1,87	0,09	n.d.	7,06
90	2,37	0,28	3,24	2,96	0,08	n.d.	8,94
120	2,46	0,39	4,30	5,28	0,13	n.d.	12,57
150	2,50	0,47	5,40	7,13	0,25	n.d.	15,75
180	2,28	0,50	5,51	7,70	0,34	n.d.	16,34
210	2,40	0,58	6,45	9,50	0,36	n.d.	19,28
240	2,43	0,68	7,03	10,47	0,36	n.d.	20,97

n.d.: no detectado.

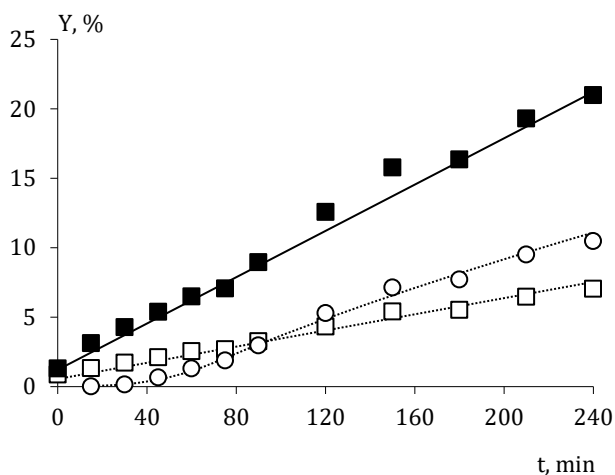


Figura AP2.46: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-Cl1.

Tabla AP2.55:
Experimento HSh-Cl2. 1,0 N HCl. T = 85°C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	1,82	0,08	1,37	n.d.	n.d.	n.d.	3,28
15	2,43	0,20	2,28	0,71	n.d.	n.d.	5,61
30	2,49	0,31	3,63	3,09	0,03	n.d.	9,56
45	2,53	0,42	4,77	5,59	0,04	n.d.	13,35
60	2,50	0,51	5,42	6,80	0,09	n.d.	15,33
75	2,43	0,59	6,66	9,43	0,18	n.d.	19,28
90	2,55	0,69	7,73	11,02	0,27	n.d.	22,26
120	2,57	0,88	8,21	12,20	0,42	n.d.	24,28
150	2,63	1,03	9,71	13,97	0,59	n.d.	27,93
180	2,61	1,05	9,98	14,34	0,48	n.d.	28,47
210	2,59	1,14	10,21	14,82	0,57	n.d.	29,32
240	2,56	1,19	10,54	15,26	0,54	n.d.	30,09

n.d.: no detectado.

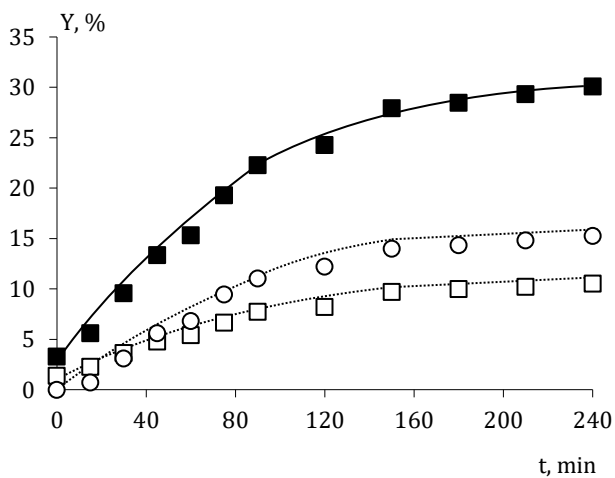


Figura AP2.47: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-Cl2.

Tabla AP2.56:
Experimento HSh-Cl3. 1,5 N HCl. T = 85°C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	1,32	0,07	1,12	n.d.	n.d.	n.d.	2,51
15	2,57	0,29	3,59	2,75	0,04	n.d.	9,24
30	2,59	0,48	6,00	7,77	0,24	n.d.	17,09
45	2,52	0,69	7,68	11,16	0,33	n.d.	22,38
60	2,46	0,77	8,49	11,94	0,32	n.d.	23,98
75	2,45	0,84	8,82	12,36	0,44	n.d.	24,90
90	2,45	0,96	9,23	12,98	0,50	n.d.	26,13
120	2,50	1,06	9,34	13,29	0,73	n.d.	26,92
150	2,53	1,24	10,13	14,98	0,66	n.d.	29,54
180	2,54	1,22	10,26	15,61	0,70	n.d.	30,33
210	2,54	1,20	10,64	16,08	0,98	n.d.	31,44
240	2,48	1,25	10,69	16,10	1,03	n.d.	31,56

n.d.: no detectado.

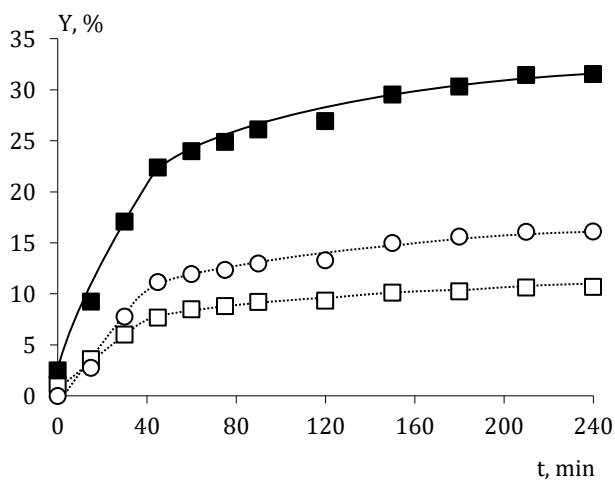


Figura AP2.48: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-Cl3.

Tabla AP2.57:
Experimento HSh-Cl4. 2,0 N HCl. T = 85°C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	2,44	0,17	2,17	0,57	n.d.	n.d.	5,35
15	2,50	0,40	6,00	8,00	n.d.	n.d.	16,90
30	2,60	0,60	8,00	11,50	0,02	n.d.	22,72
45	2,65	0,80	9,00	13,50	0,03	n.d.	25,98
60	2,70	1,10	10,01	14,61	0,61	n.d.	29,04
75	2,60	1,13	10,08	14,90	0,65	n.d.	29,36
90	2,50	1,18	10,10	15,20	0,70	n.d.	29,68
120	2,48	1,25	10,15	15,59	0,82	n.d.	30,30
150	2,50	1,30	10,40	16,00	0,88	n.d.	31,08
180	2,60	1,36	10,67	16,04	0,95	n.d.	31,63
210	2,60	1,37	10,80	16,09	1,00	n.d.	31,86
240	2,62	1,38	11,07	16,04	1,26	n.d.	32,36

n.d.: no detectado.

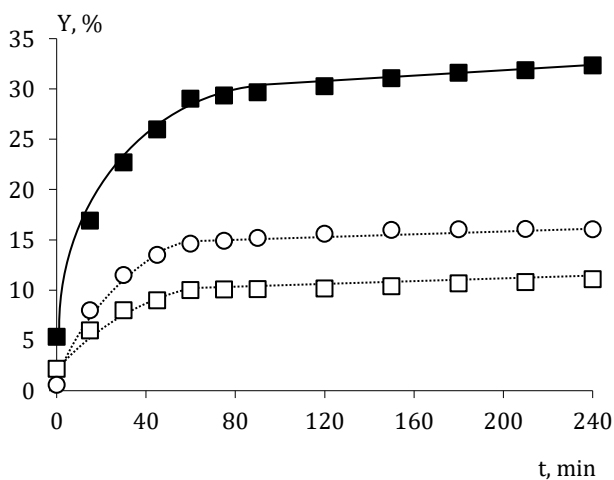


Figura AP2.49: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-Cl4.

Tabla AP2.58:
Experimento HSh-Cl5. 0,5 N HCl. T = 90°C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	0,76	0,06	1,04	n.d.	n.d.	n.d.	1,86
15	1,90	0,19	2,50	1,00	0,03	n.d.	5,62
30	2,57	0,25	3,02	1,71	0,03	n.d.	7,58
45	2,55	0,30	3,80	3,20	0,05	n.d.	9,90
60	2,53	0,43	4,36	4,62	0,07	n.d.	12,01
75	2,60	0,50	5,40	6,80	0,17	n.d.	15,47
90	2,64	0,60	6,40	8,49	0,30	n.d.	18,43
120	2,53	0,70	7,26	10,17	0,52	n.d.	21,17
150	2,55	0,80	7,90	11,20	0,50	n.d.	22,95
180	2,61	0,92	8,74	12,52	0,48	n.d.	25,27
210	2,60	1,00	9,00	13,60	0,70	n.d.	26,90
240	2,64	1,06	9,86	14,23	0,81	n.d.	28,61

n.d.: no detectado.

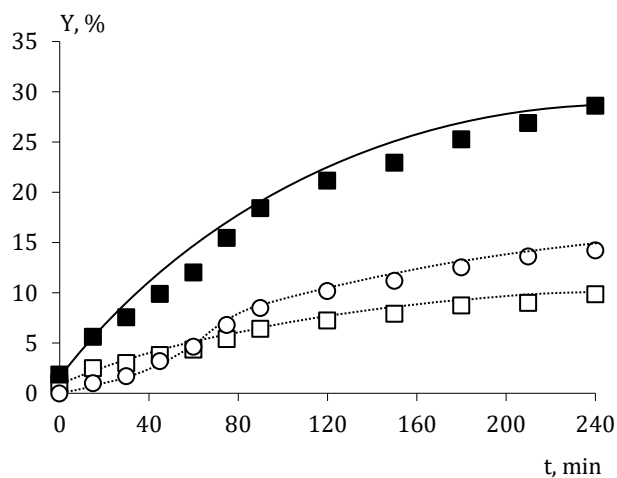


Figura AP2.50: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-Cl5.

Tabla AP2.59:
Experimento HSh-Cl6. 1,0 N HCl. T = 90°C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	2,20	0,13	1,42	0,85	n.d.	n.d.	4,60
15	2,30	0,30	2,85	4,00	0,10	n.d.	9,55
30	2,48	0,44	5,13	6,53	0,23	n.d.	14,81
45	2,40	0,60	6,30	8,80	0,30	n.d.	18,40
60	2,43	0,71	7,62	10,93	0,42	n.d.	22,11
75	2,30	0,70	7,80	11,40	0,57	n.d.	22,77
90	2,17	0,87	7,99	11,61	0,56	n.d.	23,20
120	2,32	0,99	8,73	12,91	0,62	n.d.	25,56
150	2,30	1,00	8,80	13,30	0,75	n.d.	26,15
180	2,29	1,07	8,89	13,76	0,81	n.d.	26,83
210	2,47	1,19	9,42	14,84	0,95	n.d.	28,86
240	2,40	1,17	9,63	15,21	0,97	n.d.	29,38

n.d.: no detectado.

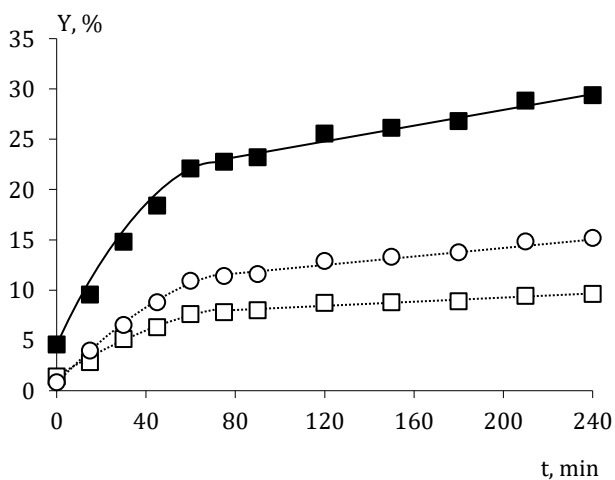


Figura AP2.51: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (O) con el tiempo en el experimento HSh-Cl6.

Tabla AP2.60:
Experimento HSh-Cl7. 1,5 N HCl. T = 90°C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	2,45	0,26	2,79	1,45	n.d.	n.d.	6,94
15	2,50	0,60	5,50	8,00	0,40	n.d.	17,00
30	2,65	0,83	7,92	11,74	0,49	n.d.	23,63
45	2,50	1,00	8,90	13,00	0,60	n.d.	26,00
60	2,47	1,12	9,50	14,07	0,69	n.d.	27,85
75	2,47	1,17	9,70	14,60	0,74	n.d.	28,68
90	2,48	1,20	9,80	15,00	0,80	n.d.	29,28
120	2,48	1,28	9,89	15,55	0,91	n.d.	30,11
150	2,50	1,27	10,00	15,90	1,00	n.d.	30,67
180	2,52	1,26	10,08	16,08	1,11	n.d.	31,05
210	2,61	1,35	10,01	16,09	1,19	n.d.	31,24
240	2,41	1,29	9,99	15,99	1,12	n.d.	30,81

n.d.: no detectado.

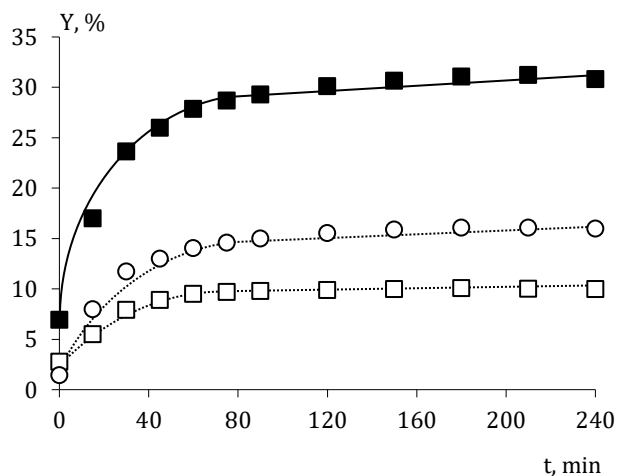


Figura AP2.52: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-Cl7.

Tabla AP2.61:
Experimento HSh-Cl8. 2,0 N HCl. T = 90 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	2,50	0,26	3,40	2,32	n.d.	n.d.	8,48
15	2,64	0,79	8,24	11,76	0,65	n.d.	24,08
30	2,78	1,11	9,59	14,70	0,71	n.d.	28,89
45	2,60	1,15	10,20	15,00	0,70	n.d.	29,65
60	2,57	1,20	10,38	15,43	0,80	n.d.	30,38
75	2,70	1,25	10,47	16,04	1,00	n.d.	31,46
90	2,82	1,31	10,69	16,10	1,09	n.d.	32,00
120	2,59	1,26	10,97	16,09	0,80	n.d.	31,70
150	2,60	1,30	10,99	16,08	1,00	n.d.	31,97
180	2,67	1,36	11,10	16,05	1,11	n.d.	32,28
210	2,70	1,35	11,08	16,10	1,18	n.d.	32,41
240	2,71	1,35	11,04	16,06	1,23	n.d.	32,39

n.d.: no detectado.

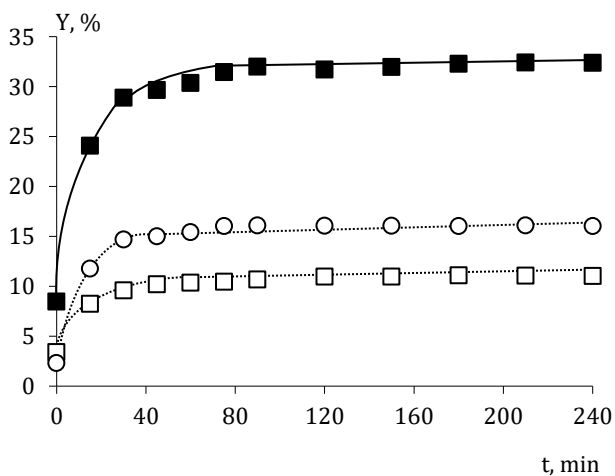


Figura AP2.53: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (O) con el tiempo en el experimento HSh-Cl8.

Tabla AP2.62:
Experimento HSh-Cl9. 0,5 N HCl. T = 95°C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	1,29	0,09	1,21	n.d.	n.d.	n.d.	2,74
15	2,20	0,24	2,70	1,60	0,07	n.d.	6,81
30	2,67	0,33	3,88	3,04	0,08	n.d.	9,99
45	2,61	0,48	5,60	6,00	0,19	n.d.	14,88
60	2,64	0,57	6,42	8,04	0,27	n.d.	17,93
75	2,60	0,67	7,30	9,00	0,35	n.d.	19,92
90	2,64	0,79	8,08	10,91	0,43	n.d.	22,85
120	2,68	0,91	9,17	12,71	0,63	n.d.	26,09
150	2,61	1,10	9,50	13,80	0,76	n.d.	27,77
180	2,58	1,22	9,78	14,08	0,68	n.d.	28,34
210	2,67	1,19	10,30	15,00	0,74	n.d.	29,90
240	2,72	1,23	10,48	15,62	0,84	n.d.	30,88

n.d.: no detectado.

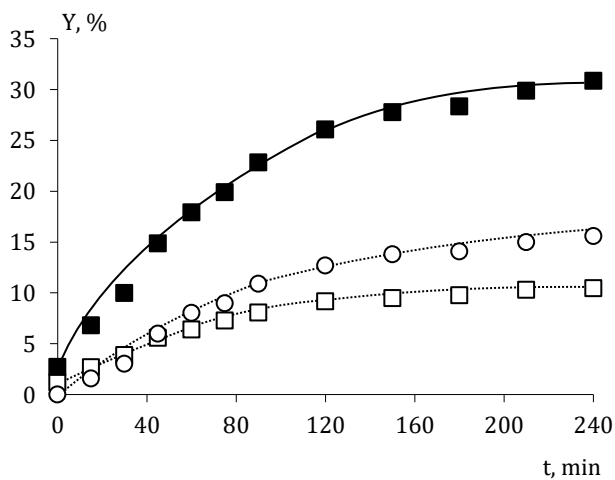


Figura AP2.54: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-Cl9.

Tabla AP2.63:
Experimento HSh-Cl10. 1,0 N HCl. T = 95 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	1,89	0,19	3,42	0,02	n.d.	n.d.	5,52
15	2,10	0,26	5,99	7,12	0,06	n.d.	15,53
30	2,67	0,33	7,76	8,98	0,08	n.d.	19,81
45	2,63	0,47	8,32	10,90	0,19	n.d.	22,51
60	2,64	0,57	9,12	11,67	0,27	n.d.	24,27
75	2,66	0,69	9,45	12,54	0,37	n.d.	25,71
90	2,64	0,79	9,63	13,01	0,43	n.d.	26,50
120	2,68	0,91	9,81	13,65	0,63	n.d.	27,68
150	2,60	1,10	9,89	14,78	0,66	n.d.	29,03
180	2,58	1,22	10,12	15,00	0,68	n.d.	29,60
210	2,63	1,23	10,40	15,23	0,77	n.d.	30,26
240	2,74	1,25	10,65	15,67	0,84	n.d.	31,15

n.d.: no detectado.

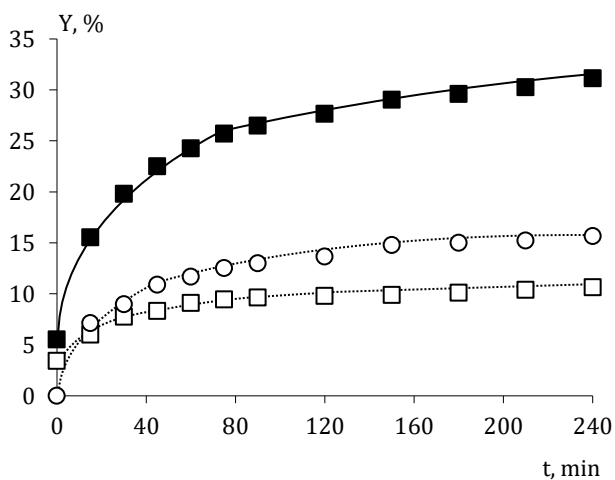


Figura AP2.55: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-Cl10.

Tabla AP2.64:
Experimento HSh-Cl11. 1,5 N HCl. T = 95°C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	2,29	0,30	3,59	3,12	0,10	n.d.	9,39
15	2,75	0,86	7,65	12,12	0,47	n.d.	23,86
30	2,45	1,04	9,17	12,81	0,74	n.d.	26,20
45	2,57	1,21	10,03	14,68	0,71	n.d.	29,20
60	2,36	1,12	10,03	15,83	0,88	n.d.	30,21
75	2,61	1,25	9,99	15,90	0,98	n.d.	30,73
90	2,67	1,30	10,01	16,02	1,09	n.d.	31,09
120	2,15	1,18	10,03	16,03	1,05	n.d.	30,44
150	2,20	1,20	9,84	16,05	1,05	n.d.	30,34
180	2,23	1,23	9,87	15,99	1,05	n.d.	30,37
210	2,18	1,22	9,86	16,02	1,20	n.d.	30,48
240	2,13	1,20	10,22	16,06	1,18	n.d.	30,79

n.d.: no detectado.

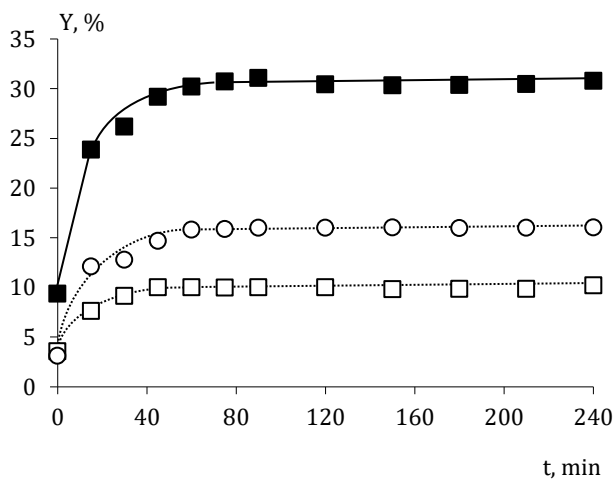


Figura AP2.56: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-Cl11.

Tabla AP2.65:
Experimento HSh-Cl12. 2,0 N HCl. T = 95 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	2,71	0,33	3,25	3,60	0,10	n.d.	9,99
15	2,78	0,98	9,21	13,10	0,68	n.d.	26,75
30	2,65	1,26	9,54	14,33	0,92	n.d.	28,70
45	2,70	1,30	9,70	15,40	1,00	n.d.	30,10
60	2,71	1,40	10,12	15,99	1,05	n.d.	31,27
75	2,70	1,38	10,60	16,03	1,20	n.d.	31,91
90	2,68	1,37	10,47	16,02	1,36	n.d.	31,89
120	2,68	1,35	10,74	16,07	1,20	n.d.	32,05
150	2,70	1,36	11,00	16,04	1,50	n.d.	32,60
180	2,71	1,37	11,05	16,03	1,66	n.d.	32,83
210	2,65	1,26	11,00	16,05	1,50	n.d.	32,46
240	2,58	1,35	11,01	16,00	1,43	n.d.	32,38

n.d.: no detectado.

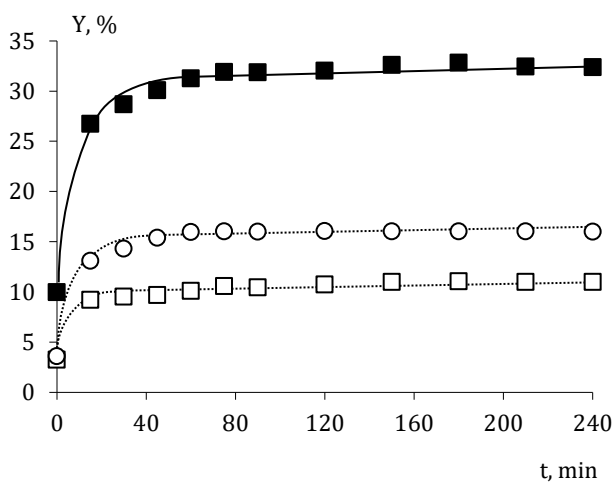


Figura AP2.57: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-Cl12.

Tabla AP2.66:
Experimento HSh-Cl13. 0,5 N HCl. T = 100 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	1,57	0,08	1,22	n.d.	n.d.	n.d.	2,87
15	2,00	0,40	3,40	3,70	0,18	n.d.	9,68
30	2,61	0,52	5,46	6,35	0,23	n.d.	15,16
45	2,60	0,70	7,00	9,00	0,45	n.d.	19,75
60	2,53	0,84	8,43	11,31	0,59	n.d.	23,69
75	2,61	1,00	9,50	12,70	0,69	n.d.	26,50
90	2,68	1,11	9,76	13,87	0,78	n.d.	28,20
120	2,67	1,20	9,97	15,22	0,95	n.d.	30,01
150	2,60	1,24	10,56	16,02	0,90	n.d.	31,32
180	2,55	1,23	10,45	16,05	0,88	n.d.	31,16
210	2,60	1,29	10,89	16,03	1,00	n.d.	31,81
240	2,76	1,32	10,63	16,08	1,05	n.d.	31,84

n.d.: no detectado.

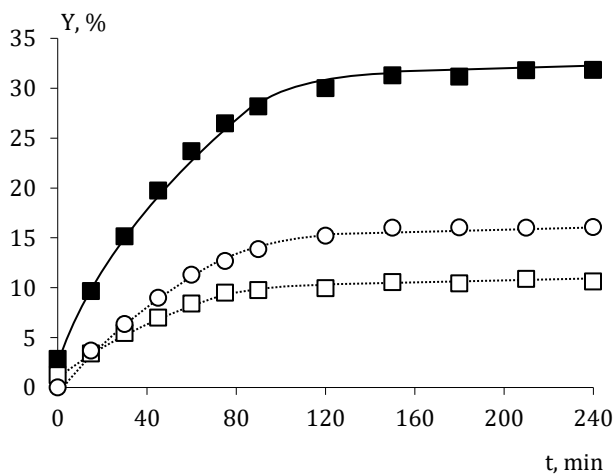


Figura AP2.58: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-Cl13.

Tabla AP2.67:
Experimento HSh-Cl14. 1,0 N HCl. T = 100°C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	2,00	0,21	3,54	0,67	n.d.	n.d.	6,42
15	2,56	0,69	7,56	9,89	0,35	n.d.	21,05
30	2,20	0,90	8,03	11,27	0,67	n.d.	23,06
45	2,35	1,07	9,13	12,64	0,79	n.d.	25,98
60	2,49	1,03	9,30	13,67	1,00	n.d.	27,49
75	2,52	1,15	9,73	14,96	1,00	n.d.	29,36
90	2,47	1,18	9,96	15,14	1,08	n.d.	29,83
120	2,10	1,10	10,01	15,90	1,14	n.d.	30,26
150	2,49	1,15	10,06	16,04	1,29	n.d.	31,03
180	2,14	1,15	10,22	16,08	1,42	n.d.	31,01
210	2,22	1,18	10,65	15,99	1,19	n.d.	31,24
240	2,09	1,16	10,87	16,03	1,46	n.d.	31,60

n.d.: no detectado.

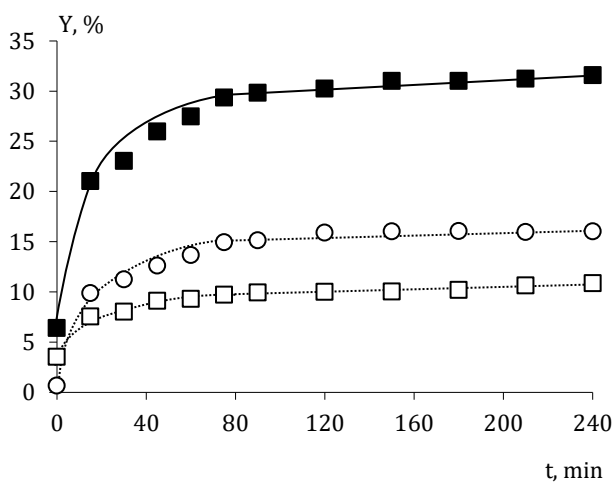


Figura AP2.59: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-Cl14.

Tabla AP2.68:
Experimento HSh-Cl15. 1,5 N HCl. T = 100 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	2,69	0,54	4,87	7,21	0,29	n.d.	15,58
15	2,67	1,00	9,65	14,70	0,80	n.d.	29,21
30	2,66	1,23	10,36	15,37	0,97	n.d.	30,59
45	2,70	1,30	10,40	16,00	1,00	n.d.	31,40
60	2,77	1,36	10,87	15,97	1,19	n.d.	31,78
75	2,70	1,30	10,89	16,04	1,30	n.d.	31,90
90	2,67	1,29	10,91	16,01	1,40	n.d.	31,88
120	2,72	1,39	11,03	16,02	1,49	n.d.	32,35
150	2,65	1,36	11,00	16,03	1,50	n.d.	32,34
180	2,60	1,34	10,86	15,99	1,54	n.d.	32,33
210	2,59	1,33	11,05	16,01	1,57	n.d.	32,55
240	2,54	1,31	10,69	15,89	1,63	n.d.	32,06

n.d.: no detectado.

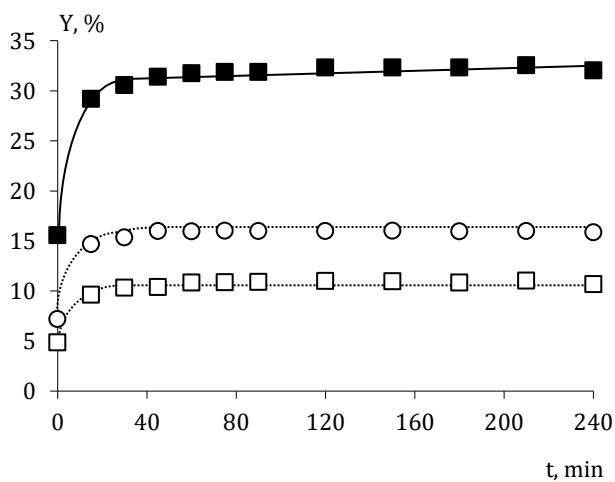


Figura AP2.60: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-Cl15.

Tabla AP2.69:
Experimento HSh-Cl16. 2,0N HCl. T = 100°C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	2,11	0,27	4,24	10,21	0,01	n.d.	16,84
15	2,73	1,29	9,86	15,83	0,93	n.d.	30,64
30	2,68	1,34	9,66	16,01	0,99	n.d.	30,68
45	2,50	1,30	10,00	16,05	1,00	n.d.	30,85
60	2,49	1,26	10,45	15,86	1,24	n.d.	31,31
75	2,50	1,27	10,60	16,05	1,20	n.d.	31,62
90	2,51	1,29	10,68	16,06	1,22	n.d.	31,76
120	2,46	1,28	10,60	16,02	1,52	n.d.	31,88
150	2,44	1,28	11,00	16,04	1,53	n.d.	32,29
180	2,45	1,29	10,99	16,01	1,57	n.d.	32,31
210	2,29	1,26	11,01	16,02	1,69	n.d.	32,27
240	2,24	1,24	11,09	16,03	1,66	n.d.	32,27

n.d.: no detectado.

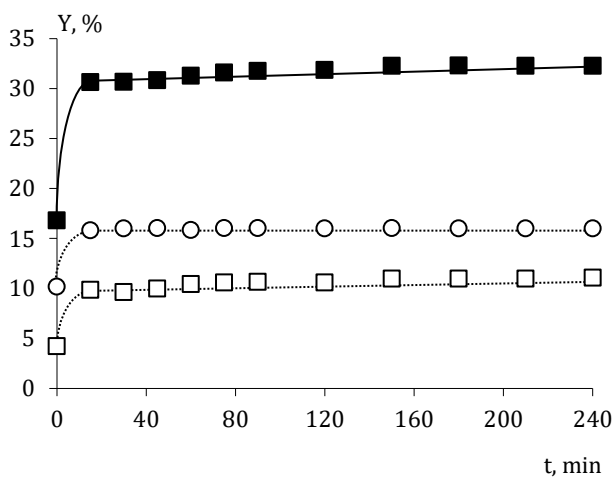


Figura AP2.61: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-Cl16.

c) Inhibidores

En la Tabla AP2.70 se recogen los inhibidores correspondientes a los hidrolizados obtenidos en cada uno de los experimentos realizados con poda de olivar sin hoja y en los que se empleó HCl como agente hidrolítico. Los resultados corresponden a tiempo experimental 240 minutos.

Tabla AP2.70:
Caracterización en inhibidores de los hidrolizados obtenidos en los experimentos realizados con poda de olivar sin hoja empleando HCl.

Ensayo	T, °C	C _{HCl} , N	F, g dm ⁻³	HMF, mg dm ⁻³	ACh, g dm ⁻³	CFT, g dm ⁻³
HSh-Cl1	85	0,5	0,015	21,2	3,08	1,86
HSh-Cl2	85	1,0	0,057	36,1	3,61	2,49
HSh-Cl3	85	1,5	0,160	49,6	3,62	2,57
HSh-Cl4	85	2,0	0,209	51,5	3,72	2,71
HSh-Cl5	90	0,5	0,034	27,7	3,10	1,72
HSh-Cl6	90	1,0	0,123	52,6	3,63	2,64
HSh-Cl7	90	1,5	0,279	56,7	3,77	2,72
HSh-Cl8	90	2,0	0,445	61,6	3,77	2,86
HSh-Cl9	95	0,5	0,072	37,2	3,51	2,04
HSh-Cl10	95	1,0	0,240	59,1	3,65	2,66
HSh-Cl11	95	1,5	0,486	63,0	3,84	2,89
HSh-Cl12	95	2,0	0,566	66,6	3,86	2,94
HSh-Cl13	100	0,5	0,128	48,6	3,72	2,18
HSh-Cl14	100	1,0	0,438	67,0	3,83	2,73
HSh-Cl15	100	1,5	0,896	81,5	3,95	2,92
HSh-Cl16	100	2,0	1,255	83,2	3,87	3,11

AP2.3.2. Experimentos realizados con H₂SO₄

a) Residuos sólidos

Tabla AP2.71:
Caracterización de la poda de olivar sin hoja
resultante de las hidrólisis realizadas con ácido sulfúrico

Ensayo	T, °C	C _{H₂SO₄} , N	CEL, %	HEM, %	LIG, %	CEN, %
HSh-S1	85	0,5	47,37	12,47	22,11	0,14
HSh-S2	85	1,0	49,55	5,04	24,88	0,14
HSh-S3	85	1,5	50,08	2,36	26,97	0,14
HSh-S4	85	2,0	48,72	0,04	27,42	0,19
HSh-S5	90	0,5	52,00	4,11	25,57	0,14
HSh-S6	90	1,0	51,20	0,47	27,00	0,17
HSh-S7	90	1,5	51,15	0,00	28,29	0,18
HSh-S8	90	2,0	49,48	0,00	28,22	0,17
HSh-S9	95	0,5	50,97	2,11	27,13	0,13
HSh-S10	95	1,0	53,80	0,00	29,76	0,09
HSh-S11	95	1,5	51,40	0,00	29,89	0,20
HSh-S12	95	2,0	49,00	0,00	29,83	0,13
HSh-S13	100	0,5	52,45	0,00	30,00	0,11
HSh-S14	100	1,0	55,60	0,00	33,60	0,08
HSh-S15	100	1,5	54,80	0,00	35,32	0,13
HSh-S16	100	2,0	54,08	0,00	36,15	0,15

b) Hidrolizados

Tabla AP2.72:
Experimento HSh-S1. 0,5 N H₂SO₄. T = 85°C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	0,18	0,03	0,98	n.d.	n.d.	n.d.	1,19
15	1,84	0,07	1,67	n.d.	n.d.	n.d.	3,57
30	2,65	0,10	1,79	n.d.	n.d.	n.d.	4,54
45	3,29	0,14	1,88	n.d.	n.d.	n.d.	5,31
60	3,64	0,16	2,02	n.d.	n.d.	n.d.	5,82
75	3,64	0,18	2,12	0,01	n.d.	n.d.	5,95
90	3,65	0,20	2,21	0,25	0,05	n.d.	6,36
120	3,66	0,23	2,31	0,51	0,10	n.d.	6,81
150	3,85	0,28	2,90	1,18	0,10	n.d.	8,31
180	4,20	0,34	3,31	1,68	0,10	n.d.	9,63
210	3,95	0,38	3,90	3,00	0,15	n.d.	11,38
240	3,79	0,44	4,31	4,35	0,21	n.d.	13,88

n.d.: no detectado.

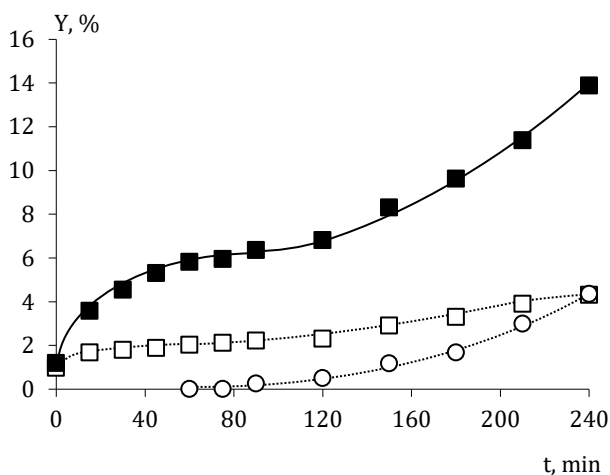


Figura AP2.62: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-S1.

Tabla AP2.73:
Experimento HSh-S2. 1,0 N H₂SO₄. T = 85 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	0,43	0,03	1,15	n.d.	n.d.	n.d.	1,62
15	3,19	0,13	1,98	0,01	n.d.	n.d.	5,32
30	3,65	0,18	2,35	0,25	n.d.	n.d.	6,43
45	3,87	0,27	2,96	1,11	0,08	n.d.	8,29
60	3,71	0,28	3,02	1,42	0,09	n.d.	8,52
75	3,80	0,35	3,40	2,00	0,09	n.d.	9,64
90	4,11	0,44	3,84	3,04	0,12	n.d.	11,55
120	4,06	0,54	4,82	5,58	0,18	n.d.	15,18
150	4,50	0,63	6,78	7,00	0,21	n.d.	19,12
180	5,22	0,72	7,85	9,75	0,24	n.d.	23,79
210	4,20	0,85	8,00	13,00	0,40	n.d.	26,45
240	3,94	1,10	8,10	13,05	0,70	n.d.	26,89

n.d.: no detectado.

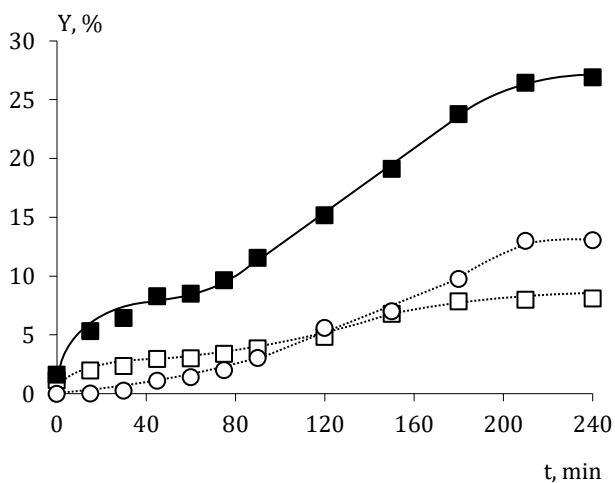


Figura AP2.63: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-S2.

Tabla AP2.74:
Experimento HSh-S3. 1,5 N H₂SO₄. T = 85 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	1,90	0,09	1,26	n.d.	0,38	n.d.	3,63
15	3,70	0,17	2,15	0,11	0,27	n.d.	6,40
30	3,92	0,28	2,85	1,00	0,29	n.d.	8,33
45	4,17	0,36	3,62	2,48	0,27	n.d.	10,90
60	4,15	0,45	4,54	4,47	0,12	n.d.	14,05
75	4,18	0,50	5,50	7,00	0,20	n.d.	17,78
90	4,23	0,63	6,58	9,11	0,36	n.d.	21,47
120	4,25	0,80	7,81	12,09	0,75	n.d.	26,30
150	4,30	0,90	8,00	13,10	0,70	n.d.	27,10
180	4,43	1,12	8,20	13,39	0,69	n.d.	27,85
210	4,50	0,90	8,28	13,80	0,80	n.d.	28,30
240	4,67	0,94	8,36	14,32	0,94	n.d.	29,23

n.d.: no detectado.

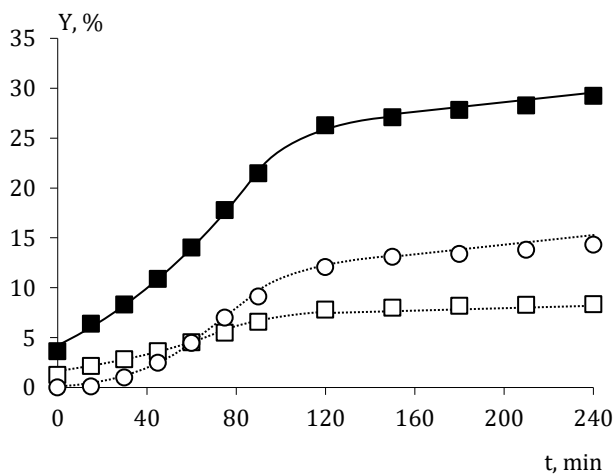


Figura AP2.64: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (O) con el tiempo en el experimento HSh-S3.

Tabla AP2.75:
Experimento HSh-S4. 2,0 N H₂SO₄. T = 85 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	1,54	0,11	1,27	n.d.	n.d.	n.d.	2,91
15	3,25	0,19	2,30	0,67	n.d.	n.d.	6,42
30	3,32	0,32	3,42	2,76	0,06	n.d.	9,88
45	3,63	0,45	4,72	5,86	0,16	n.d.	14,81
60	3,67	0,60	6,08	8,92	0,43	n.d.	19,71
75	3,70	0,70	6,80	10,00	0,47	n.d.	21,67
90	3,74	0,80	7,53	12,17	0,50	n.d.	24,74
120	3,76	0,97	8,80	14,34	0,66	n.d.	28,54
150	3,70	1,00	9,30	15,40	0,70	n.d.	30,10
180	3,60	1,15	9,73	16,07	0,83	n.d.	31,39
210	3,70	1,40	10,50	16,09	1,00	n.d.	32,69
240	3,80	1,55	11,25	16,01	1,29	n.d.	33,90

n.d.: no detectado.

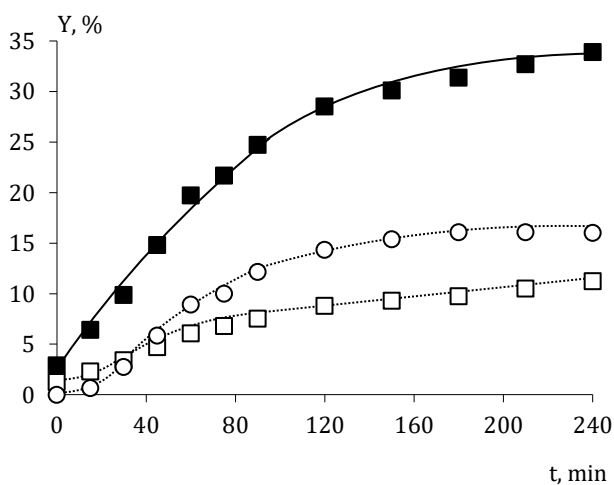


Figura AP2.65: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-S4.

Tabla AP2.76:
Experimento HSh-S5. 0,5 N H₂SO₄. T = 90°C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	0,32	0,03	0,73	n.d.	0,16	n.d.	1,25
15	2,47	0,12	1,63	n.d.	0,20	n.d.	4,42
30	2,82	0,13	1,88	0,11	0,00	n.d.	4,94
45	2,76	0,19	2,08	0,30	0,01	n.d.	5,35
60	3,20	0,21	2,54	0,77	0,03	n.d.	6,76
75	3,40	0,24	2,80	1,00	0,03	n.d.	7,47
90	3,60	0,29	3,09	1,70	0,03	n.d.	8,72
120	3,66	0,36	3,93	3,35	0,09	n.d.	11,39
150	3,60	0,40	4,70	5,00	0,10	n.d.	13,80
180	3,50	0,52	5,58	7,04	0,25	n.d.	16,91
210	3,50	0,70	6,00	8,00	0,30	n.d.	18,50
240	3,50	0,81	6,60	9,54	0,34	n.d.	20,79

n.d.: no detectado.

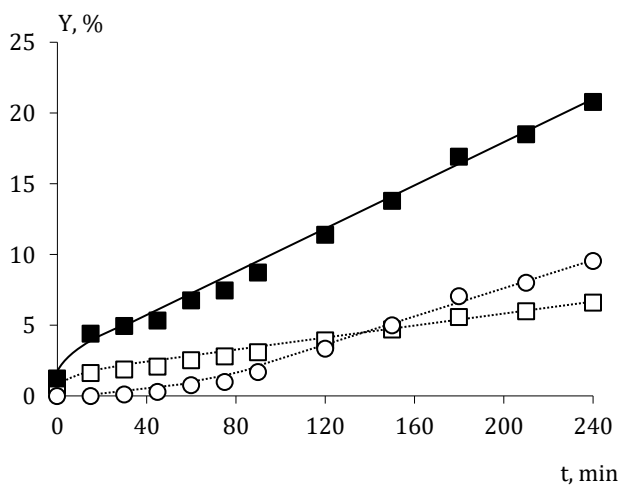


Figura AP2.66: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-S5.

Tabla AP2.77:
Experimento HSh-S6. 1,0 N H₂SO₄. T = 90 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	0,72	0,09	0,98	n.d.	0,35	n.d.	2,14
15	2,96	0,14	2,02	0,11	0,39	n.d.	5,63
30	3,39	0,22	2,77	0,92	0,04	n.d.	7,69
45	3,61	0,29	2,91	1,94	0,14	n.d.	9,35
60	3,54	0,38	4,03	3,36	0,06	n.d.	11,36
75	3,56	0,42	5,00	5,50	0,12	n.d.	14,60
90	3,58	0,58	5,85	7,29	0,22	n.d.	17,53
120	3,66	0,73	7,02	9,99	0,27	n.d.	21,67
150	3,68	0,80	8,00	12,20	0,35	n.d.	25,03
180	3,78	0,98	9,01	13,83	0,50	n.d.	28,10
210	3,78	1,00	8,98	13,90	0,56	n.d.	28,22
240	3,78	1,01	8,97	14,04	0,64	n.d.	28,44

n.d.: no detectado.

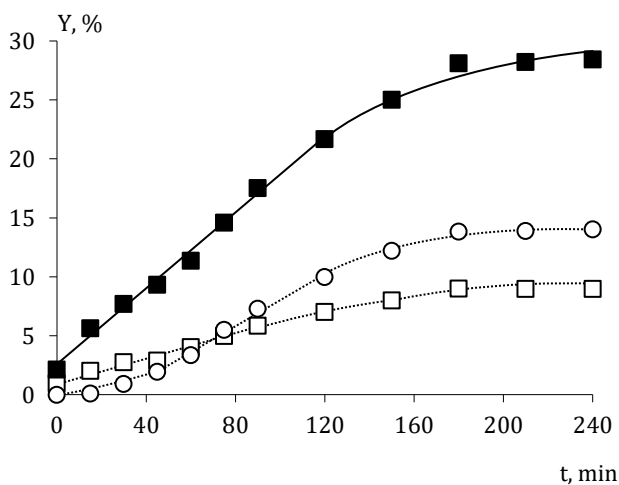


Figura AP2.67: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-S6.

Tabla AP2.78:
Experimento HSh-S7. 1,5 N H₂SO₄. T = 90 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	1,03	0,05	1,31	n.d.	n.d.	0,21	2,60
15	2,48	0,16	1,97	0,63	n.d.	0,25	5,49
30	2,58	0,26	2,76	2,14	0,04	0,24	8,01
45	3,21	0,42	4,69	5,47	0,17	0,24	14,20
60	3,54	0,65	6,48	8,73	0,22	0,18	19,80
75	3,70	0,80	7,70	11,50	0,40	n.d.	24,10
90	3,83	0,91	8,64	13,15	0,53	n.d.	27,06
120	3,83	1,09	9,78	15,18	0,67	n.d.	30,54
150	3,86	1,20	9,90	16,00	0,65	n.d.	31,61
180	3,92	1,35	10,12	16,02	0,65	n.d.	32,05
210	3,70	1,36	9,99	16,05	1,00	n.d.	32,10
240	3,61	1,38	9,96	16,01	1,55	n.d.	32,52

n.d.: no detectado.

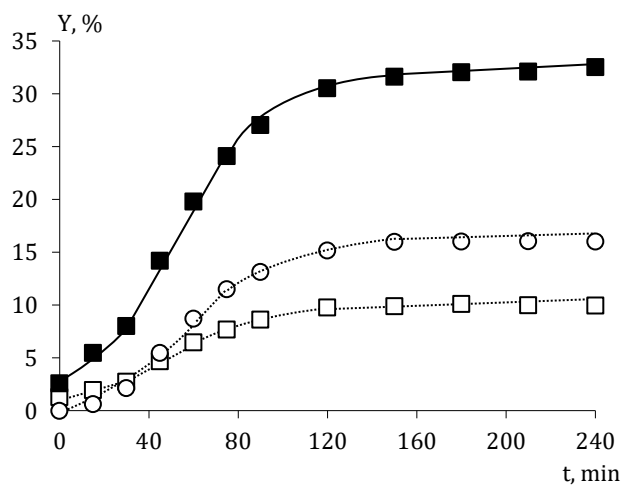


Figura AP2.68: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-S7.

Tabla AP2.79:
Experimento HSh-S8. 2,0N H₂SO₄. T = 90 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	1,97	0,07	1,53	n.d.	n.d.	n.d.	3,57
15	2,64	0,38	2,95	1,74	0,05	0,26	8,02
30	2,87	0,58	5,00	5,68	0,14	0,18	14,34
45	2,95	0,83	6,82	9,60	0,49	0,61	21,30
60	3,03	0,87	9,04	12,06	0,51	n.d.	25,51
75	2,90	1,00	9,25	13,00	0,60	n.d.	26,75
90	2,97	1,19	9,89	14,56	0,65	n.d.	29,26
120	3,11	1,74	10,80	15,92	1,27	n.d.	32,84
150	3,16	1,84	11,00	16,00	1,30	n.d.	33,30
180	3,20	1,88	11,16	16,07	1,49	n.d.	33,80
210	3,17	1,90	11,06	16,04	1,50	n.d.	33,67
240	3,14	1,93	11,32	16,06	1,53	n.d.	33,98

n.d.: no detectado.

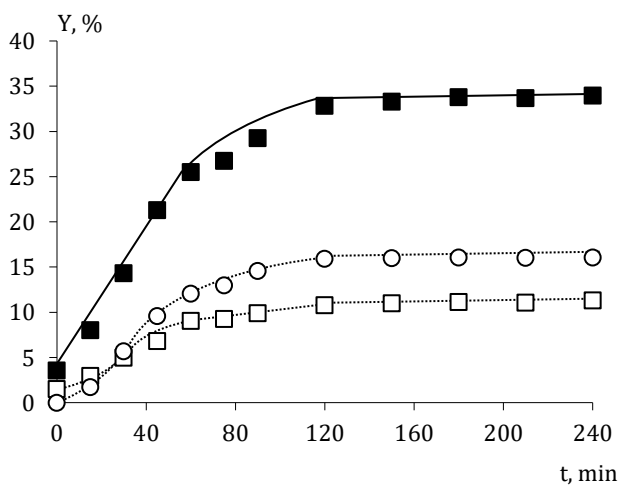


Figura AP2.69: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-S8.

Tabla AP2.80:
Experimento HSh-S9. 0,5 N H₂SO₄. T = 95 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	0,98	0,07	0,80	n.d.	n.d.	0,28	2,12
15	2,21	0,10	1,66	0,04	n.d.	0,27	4,28
30	2,10	0,24	2,06	0,67	0,05	0,33	5,45
45	2,92	0,40	2,83	1,08	0,00	0,20	7,43
60	3,23	0,28	3,42	1,97	0,04	0,09	9,04
75	3,40	0,30	4,00	2,30	0,08	n.d.	10,08
90	3,00	0,45	4,45	4,30	0,11	0,10	12,40
120	3,04	0,69	5,92	7,24	0,23	0,08	17,20
150	3,00	0,80	6,60	8,80	0,50	n.d.	19,70
180	3,65	0,99	7,49	10,88	0,74	0,03	23,78
210	3,67	1,00	7,50	11,60	0,85	0,00	24,62
240	3,56	1,12	7,82	12,23	0,94	0,00	25,68

n.d.: no detectado.

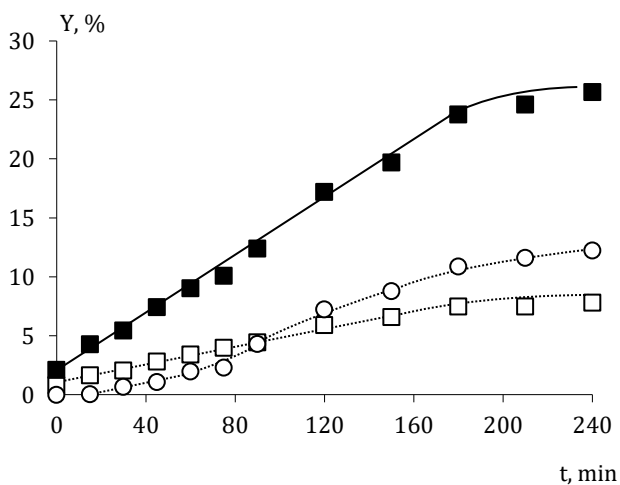


Figura 5.70: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-S9.

Tabla AP2.81:
Experimento HSh-S10. 1,0 N H₂SO₄. T = 95°C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	1,78	0,11	1,31	n.d.	n.d.	0,09	3,28
15	2,76	0,26	2,63	1,19	0,03	0,10	6,97
30	2,65	0,49	4,00	3,76	0,14	0,13	11,17
45	2,98	0,65	5,67	6,66	0,24	0,51	16,21
60	3,13	0,85	6,88	9,13	0,60	0,60	21,19
75	3,23	0,90	7,20	10,50	0,65	n.d.	22,48
90	3,22	0,96	7,51	12,08	0,73	n.d.	24,49
120	3,21	1,18	9,30	14,30	0,67	n.d.	28,66
150	3,12	1,30	9,90	15,30	0,75	n.d.	30,37
180	3,28	1,48	10,53	15,92	0,87	n.d.	32,08
210	3,20	1,55	10,80	16,03	1,00	n.d.	32,58
240	3,27	1,60	11,18	16,05	1,27	n.d.	33,36

n.d.: no detectado.

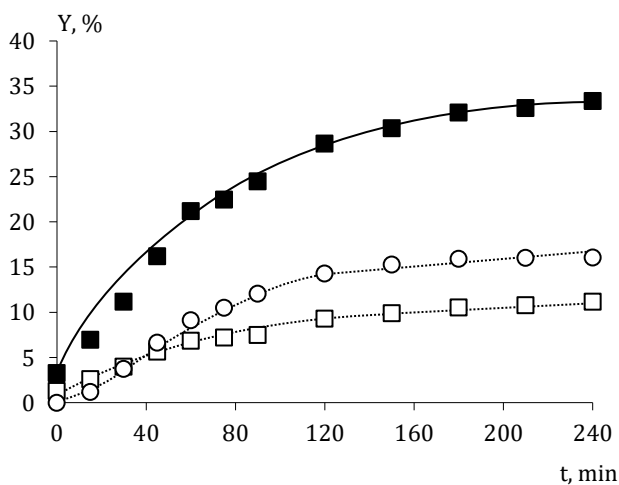


Figura AP2.71: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-S10.

Tabla AP2.82:
Experimento HSh-S11. 1,5 N H₂SO₄. T = 95 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	1,28	0,22	1,16	n.d.	n.d.	0,27	2,92
15	3,14	0,38	3,47	2,26	0,05	0,23	9,55
30	3,88	1,09	6,23	7,23	0,29	0,07	18,78
45	3,48	0,94	9,85	11,68	0,51	n.d.	26,46
60	3,30	1,00	10,50	13,20	0,60	n.d.	28,60
75	3,17	1,22	11,07	14,56	0,74	n.d.	30,76
90	3,29	1,32	11,02	15,57	0,85	n.d.	32,04
120	3,31	1,48	11,03	16,03	0,98	n.d.	32,83
150	3,35	1,50	11,09	16,20	1,00	n.d.	33,14
180	3,40	1,64	11,24	16,13	1,11	n.d.	33,52
210	3,38	1,65	11,11	16,07	1,40	n.d.	33,61
240	3,35	1,67	11,45	16,10	1,61	n.d.	34,18

n.d.: no detectado.

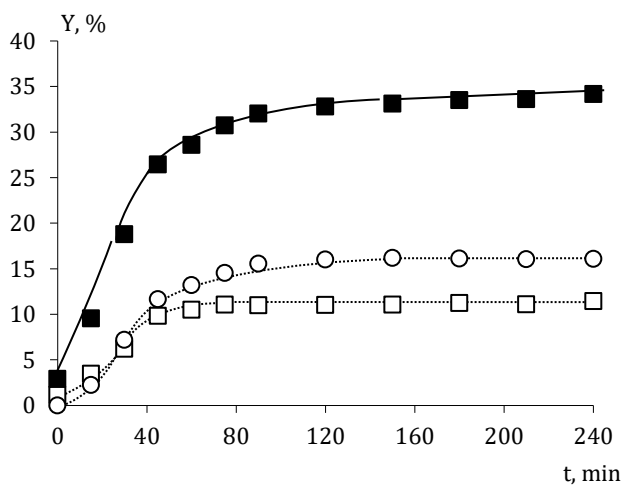


Figura AP2.72: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-S11.

Tabla AP2.83:
Experimento HSh-S12. 2,0 N H₂SO₄. T = 95 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	2,50	0,15	2,26	0,16	n.d.	0,29	5,36
15	3,18	0,57	5,98	6,13	0,23	0,13	16,23
30	3,36	0,93	9,28	11,62	0,46	n.d.	25,65
45	3,32	1,18	10,61	14,46	0,74	n.d.	30,30
60	3,44	1,37	11,14	16,20	0,88	n.d.	33,03
75	3,30	1,40	11,30	16,12	0,90	n.d.	33,02
90	3,22	1,55	11,09	16,32	0,96	n.d.	33,15
120	3,35	1,60	11,41	16,16	1,16	n.d.	33,68
150	3,45	1,70	11,32	16,15	1,50	n.d.	34,12
180	3,29	1,75	11,13	16,02	1,74	n.d.	33,93
210	3,00	1,60	11,20	16,08	1,40	n.d.	33,28
240	2,87	1,43	11,26	16,09	1,33	n.d.	32,98

n.d.: no detectado.

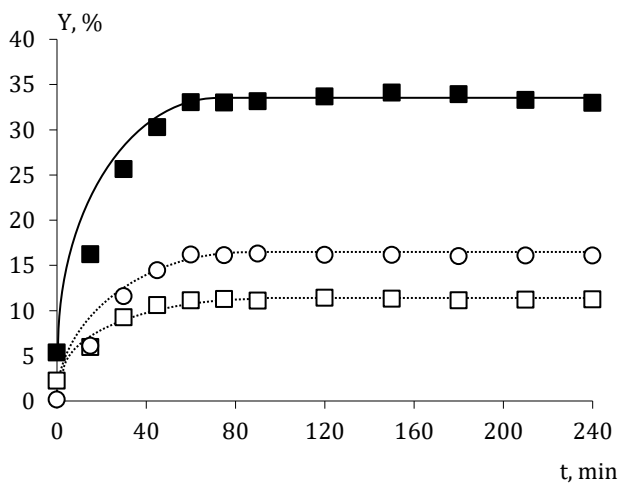


Figura AP2.73: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-S12.

Tabla AP2.84:
Experimento HSh-S13. 0,5 N H₂SO₄. T = 100°C

t, min	Y, %						
	Ara	Gal	Glu	Xil	Man	Fru	TOT
0	0,95	0,04	0,76	0,00	n.d.	n.d.	1,74
15	2,24	0,13	2,00	0,27	n.d.	n.d.	4,63
30	2,28	0,22	2,66	1,06	0,02	n.d.	6,23
45	2,20	0,31	3,54	2,56	0,06	n.d.	8,67
60	2,27	0,41	4,56	4,02	0,09	n.d.	11,36
75	3,00	0,60	6,60	7,06	0,18	n.d.	17,38
90	3,92	0,76	8,85	10,74	0,31	n.d.	24,58
120	4,40	1,08	10,00	14,06	0,55	n.d.	30,10
150	4,30	1,10	10,60	16,05	0,80	n.d.	32,85
180	4,28	1,28	11,29	16,03	0,99	n.d.	33,87
210	4,28	1,35	11,12	16,09	1,00	n.d.	33,84
240	4,28	1,48	11,40	16,04	1,18	n.d.	34,38

n.d.: no detectado.

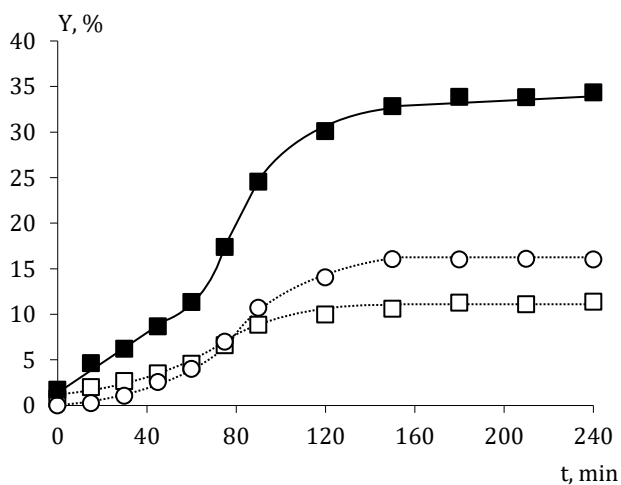


Figura AP2.74: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-S13.

Tabla AP2.85:
Experimento HSh-S14. 1,0 N H₂SO₄. T = 100 °C

t, min	Y,%						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	2,16	0,11	1,72	0,15	n.d.	n.d.	4,14
15	1,17	0,28	3,11	3,54	n.d.	n.d.	8,09
30	2,36	0,71	8,00	7,45	0,41	n.d.	18,92
45	4,95	0,75	8,76	9,20	0,35	n.d.	24,02
60	3,21	0,82	8,77	12,07	0,60	n.d.	25,47
75	2,35	0,90	9,12	12,96	0,58	n.d.	25,91
90	2,33	0,98	9,47	13,74	0,54	n.d.	27,05
120	2,44	1,13	9,80	15,40	0,84	n.d.	29,60
150	2,42	1,15	10,10	15,50	0,90	n.d.	30,07
180	2,40	1,20	11,20	16,09	0,93	n.d.	31,82
210	2,50	1,22	11,09	16,04	1,00	n.d.	31,85
240	2,58	1,28	11,13	16,10	1,16	n.d.	32,25

n.d.: no detectado.

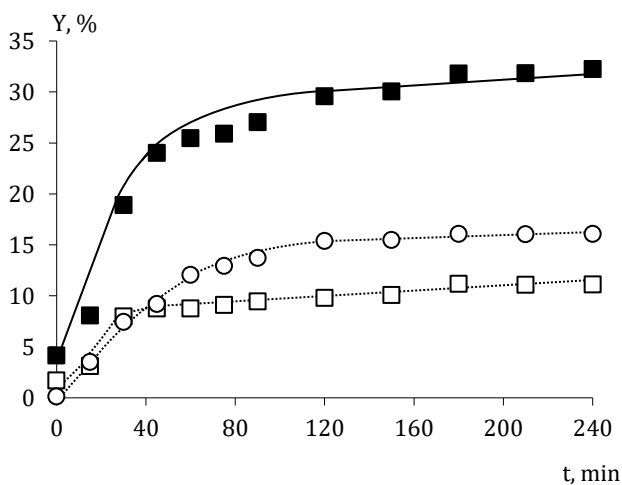


Figura AP2.75: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-S14.

Tabla AP2.86:
Experimento HSh-S15. 1,5 N H₂SO₄. T = 100 °C

t, min	Y, %						TOT
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	
0	2,42	0,16	2,22	0,49	n.d.	n.d.	5,28
15	5,26	1,06	5,38	6,28	0,64	n.d.	18,62
30	2,38	0,92	7,93	11,27	0,35	n.d.	22,85
45	2,47	1,10	9,97	14,40	0,81	n.d.	28,74
60	2,61	1,04	10,31	14,60	0,85	n.d.	29,41
75	2,55	1,06	10,27	14,65	0,87	n.d.	29,40
90	2,50	1,14	10,26	14,70	0,89	n.d.	29,49
120	2,46	1,15	10,31	15,77	0,94	n.d.	30,63
150	2,40	1,18	10,34	16,20	0,93	n.d.	31,05
180	2,36	1,21	11,09	16,15	0,93	n.d.	31,74
210	2,40	1,24	11,05	16,12	0,92	n.d.	31,73
240	2,52	1,28	11,06	16,09	0,92	n.d.	31,87

n.d.: no detectado.

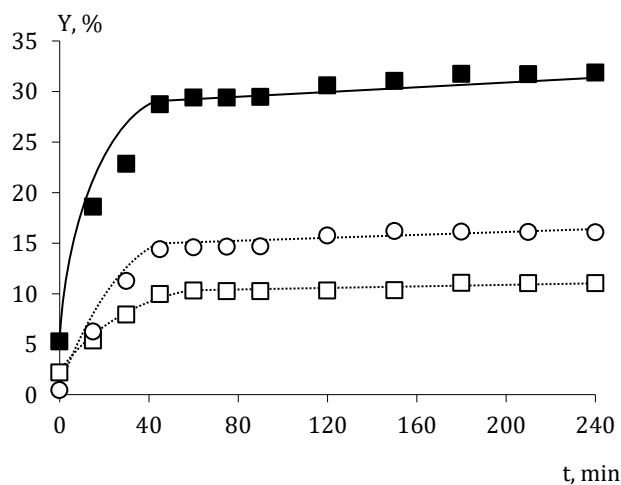


Figura AP2.76: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-S15.

Tabla AP2.87:
Experimento HSh-S16. 2,0 N H₂SO₄. T = 100 °C

t, min	Y, %						
	L-Ara	D-Gal	D-Glu	D-Xil	D-Man	D-Fru	TOT
0	2,41	0,21	2,66	1,08	n.d.	n.d.	6,36
15	2,63	0,69	7,63	9,79	0,29	n.d.	21,03
30	2,45	1,05	9,39	12,55	0,42	n.d.	25,84
45	2,54	1,15	9,87	14,47	0,67	n.d.	28,70
60	2,35	1,16	10,10	15,02	0,64	n.d.	29,26
75	2,40	1,20	10,31	15,67	0,70	n.d.	30,28
90	2,47	1,27	10,78	16,08	0,84	n.d.	31,44
120	2,38	1,09	11,04	16,03	0,95	n.d.	31,50
150	2,37	1,10	11,08	16,11	0,90	n.d.	31,56
180	2,37	1,17	11,10	16,08	0,88	n.d.	31,59
210	2,35	1,18	11,08	16,12	0,90	n.d.	31,63
240	2,33	1,19	11,01	16,01	1,04	n.d.	31,58

n.d.: no detectado.

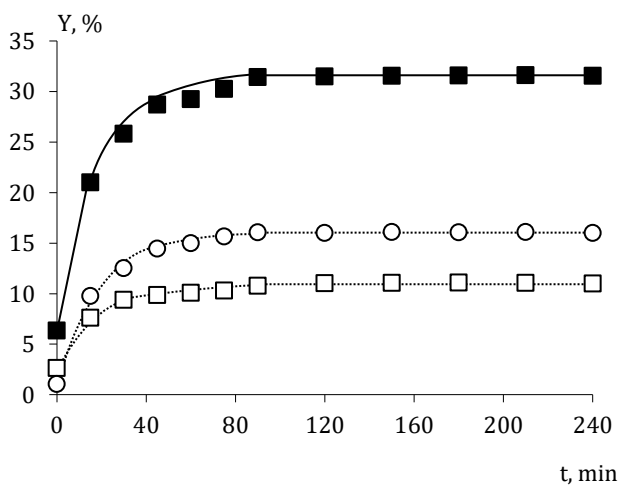


Figura 5.77: Evolución de las concentraciones de azúcares totales (■), D-glucosa (□) y D-xilosa (○) con el tiempo en el experimento HSh-S16.

c) Inhibidores

En la Tabla AP2.88 se recogen los inhibidores correspondientes a los hidrolizados obtenidos en cada uno de los experimentos realizados con poda de olivar sin hoja y en los que se empleó H₂SO₄ como agente hidrolítico. Los resultados corresponden a tiempo experimental 240 minutos.

Tabla AP2.88:
Caracterización en inhibidores de los hidrolizados obtenidos en los experimentos realizados con poda de olivar sin hoja empleando H₂SO₄.

Ensayo	T, °C	C _{H₂SO₄} , N	F, g m ⁻³	HMF, g m ⁻³	AcH, kg m ⁻³	CFT, kg m ⁻³
HSh-S1	85	0,5	5,6	7,3	2,44	1,51
HSh-S2	85	1,0	10,8	20,6	3,42	2,01
HSh-S3	85	1,5	24,6	31,6	3,54	2,61
HSh-S4	85	2,0	47,9	32,0	3,57	2,47
HSh-S5	90	0,5	10,3	11,8	2,90	1,64
HSh-S6	90	1,0	26,0	29,5	3,50	2,25
HSh-S7	90	1,5	55,2	34,0	3,52	3,01
HSh-S8	90	2,0	98,9	43,2	3,61	3,12
HSh-S9	95	0,5	21,5	26,0	3,46	2,24
HSh-S10	95	1,0	57,4	32,7	3,53	2,54
HSh-S11	95	1,5	116,1	53,0	3,61	3,23
HSh-S12	95	2,0	176,5	55,3	3,65	3,26
HSh-S13	100	0,5	35,8	36,0	3,58	2,39
HSh-S14	100	1,0	131,3	56,4	3,70	3,22
HSh-S15	100	1,5	220,0	63,3	3,66	3,51
HSh-S16	100	2,0	323,4	61,7	3,73	3,42

AP2.4. Cálculo de severidades

Como quedó plasmado en el apartado 4.5.2.2, en este trabajo de investigación se ha optado por utilizar el factor severidad en los tratamientos con agua caliente, debido a que la aplicación del factor severidad combinado arrojaba resultados negativos al aplicar el efecto del pH. En los experimentos de hidrólisis ácida si se ha empleado el factor de severidad combinado.

En los dos casos se pueden apreciar tres etapas: calentamiento, mantenimiento y enfriamiento. Cada una de estas etapas han sido modelizadas mediante mínimos cuadrados. Para el cálculo de $\text{Log } R_0$ y R_0' , se ha empleado el programa informático denominado: *Wolfram Mathematica 9*, con Licencia para la Universidad de Jaén.

AP2.4.1. Material de poda de olivar completa

a) Tratamientos hidrotérmicos

Tabla AP2.89:
Ajustes realizados en los ensayos de hidrólisis con agua caliente sobre material de poda de olivar completa.

Ensayo	Fases						R_0	$\text{Log } R_0$
	Cal.	r^2	Mant.	r^2	Enf.	r^2		
HC-T1	$T = 0,44t + 60,99$	0,993	$T = 75$	1	$T = -0,93t + 331,91$	0,991	757,01	2,88
HC-T2	$T = 0,46t + 60,48$	0,986	$T = 80$	1	$T = -1,13t + 401,02$	0,989	1068,24	3,03
HC-T3	$T = 0,62t + 60,83$	0,991	$T = 85$	1	$T = -1,12t + 387,11$	0,989	1202,26	3,08
HC-T4	$T = 0,96t + 61,05$	0,992	$T = 90$	1	$T = -0,57t + 249,56$	0,990	2166,31	3,34
HC-T5	$T = 1,02t + 60,97$	0,991	$T = 95$	1	$T = -0,92t + 341,23$	0,994	2884,03	3,46

Fase de calentamiento (Cal.), fase de mantenimiento (Mant.), fase de enfriamiento (Enf.).

b) Hidrólisis con ácido clorhídrico

Tabla AP2.90:
Ajustes realizados en los ensayos de hidrólisis con HCl
sobre material de poda de olivar completa.

Ensayo	Fases						Ro	pH	Log Ro'
	Cal.	r ²	Mant.	r ²	Enf.	r ²			
HC-Cl1	T = t + 60	0,992	T = 75	1	T = -0,47t + 198,3	0,989	760,51	1,35	1,54
HC-Cl2	T = 0,42t + 61,14	0,994	T = 75	1	T = -0,70t + 270,4	0,991	767,14	0,37	2,52
HC-Cl3	T = 0,74t + 60,11	0,989	T = 75	1	T = -0,62t + 236,2	0,979	742,26	0,22	2,65
HC-Cl4	T = 0,49t + 61,24	0,991	T = 75	1	T = -0,68t + 263,9	0,993	777,31	0,05	2,85
HC-Cl5	T = 0,51t + 60,08	0,998	T = 80	1	T = -0,76t + 290,5	0,984	1087,81	1,77	1,27
HC-Cl6	T = 0,79t + 60,64	0,991	T = 80	1	T = -0,83t + 299,8	0,991	1034,28	0,43	2,58
HC-Cl7	T = 0,69t + 61,26	0,990	T = 80	1	T = -0,75t + 287,7	0,990	1079,79	0,25	2,78
HC-Cl8	T = 0,82t + 60,79	0,993	T = 80	1	T = -0,61t + 250,3	0,992	1142,13	0,07	2,99
HC-Cl9	T = 0,43t + 60,90	0,980	T = 85	1	T = -0,72t + 301,6	0,987	1587,10	1,49	1,72
HC-Cl10	T = 0,95t + 59,96	0,993	T = 85	1	T = -0,84t + 306,1	0,995	1440,47	0,42	2,74
HC-Cl11	T = 0,86t + 60,18	0,973	T = 85	1	T = -0,57t + 242,0	0,994	1558,10	0,22	2,98
HC-Cl12	T = t + 60	0,994	T = 85	1	T = -0,83t + 303,5	0,989	1495,42	0,10	3,07
HC-Cl13	T = 0,74t + 61,75	0,993	T = 90	1	T = -1,14t + 416,2	0,990	2097,48	1,45	1,88
HC-Cl14	T = 0,98t + 61,03	0,990	T = 90	1	T = -0,93t + 321,3	0,989	2089,30	0,50	2,82
HC-Cl15	T = 1,67t + 61,08	0,993	T = 90	1	T = -0,67t + 262,9	0,994	2035,50	0,24	3,07
HC-Cl16	T = 0,99t + 60,13	0,995	T = 90	1	T = -0,93t + 342,1	0,993	2052,49	0,10	3,21
HC-Cl17	T = 0,78t + 60,27	0,991	T = 95	1	T = -0,59t + 275,7	0,991	3516,00	1,46	2,09
HC-Cl18	T = 0,61t + 60,79	0,987	T = 95	1	T = -1,17t + 439,5	0,997	2909,20	0,48	2,99
HC-Cl19	T = 0,67t + 62,27	0,982	T = 95	1	T = -0,85t + 347,2	0,989	3004,24	0,25	3,23
HC-Cl20	T = t + 60	0,995	T = 95	1	T = -1,05t + 387,3	0,996	2903,61	0,13	3,34

Fase de calentamiento (Cal.), fase de mantenimiento (Mant.), fase de enfriamiento (Enf.).

c) Hidrólisis con ácido sulfúrico

Tabla AP2.91:
Ajustes realizados en los ensayos de hidrólisis con H₂SO₄
sobre material de poda de olivar completa.

Ensayo	Fases						R ₀	pH	Log R ₀ '
	Cal.	r ²	Mant.	r ²	Enf.	r ²			
HC-S1	T = 0,44t + 61,06	0,990	T = 75	1	T = -0,65t + 251,5	0,988	761,72	1,89	1,00
HC-S2	T = 0,58t + 67,92	0,996	T = 75	1	T = -t + 327	0,990	718,39	0,70	2,16
HC-S3	T = 0,39t + 60,35	0,987	T = 75	1	T = -0,55t + 224,6	0,994	808,57	0,53	2,38
HC-S4	T = 0,59t + 60,65	0,993	T = 75	1	T = -0,74t + 280,2	0,979	787,43	0,37	2,53
HC-S5	T = 0,54t + 60,31	0,989	T = 80	1	T = -0,71t + 277,8	0,991	1093,72	1,51	1,53
HC-S6	T = 0,45t + 59,98	0,991	T = 80	1	T = -0,77t + 302,2	0,998	1101,81	0,66	2,39
HC-S7	T = 0,64t + 60,46	0,988	T = 80	1	T = -0,62t + 250,9	0,986	1091,01	0,52	2,52
HC-S8	T = 0,68t + 61,24	0,998	T = 80	1	T = -0,33t + 161,8	0,979	1050,04	0,33	2,70
HC-S9	T = 0,52t + 60,02	0,999	T = 85	1	T = -1,63t + 571,4	0,993	1538,20	1,47	1,72
HC-S10	T = 1,61t + 60,01	0,991	T = 85	1	T = -0,73t + 270,9	0,990	1191,61	0,67	2,41
HC-S11	T = 0,71t + 60,42	0,979	T = 85	1	T = -1,05t + 383,3	0,991	1524,85	0,54	2,65
HC-S12	T = 0,98t + 60,33	0,990	T = 85	1	T = -1,04t + 398,1	0,989	1584,89	0,43	2,78
HC-S13	T = 3,02t + 60,76	0,993	T = 90	1	T = -6,36t + 1699	0,990	1924,80	2,12	1,16
HC-S14	T = 3,16t + 60,01	0,995	T = 90	1	T = -1,22t + 391,1	0,991	1924,69	0,68	2,63
HC-S15	T = 1,06t + 60,30	0,988	T = 90	1	T = -0,72t + 285,3	0,993	2025,38	0,60	2,71
HC-S16	T = 1,09t + 60,15	0,991	T = 90	1	T = -1,55t + 513,9	0,997	2057,31	0,39	2,92
HC-S17	T = 0,38t + 61,17	0,994	T = 95	1	T = -0,98t + 432,4	0,989	3287,16	1,56	1,96
HC-S18	T = 0,85t + 60,78	0,997	T = 95	1	T = -1,05t + 389,6	0,991	2867,07	0,61	2,85
HC-S19	T = 0,70t + 62,32	0,990	T = 95	1	T = -1,14t + 460,3	0,999	3614,95	0,53	3,03
HC-S20	T = 1,02t + 59,99	0,991	T = 95	1	T = -0,98t + 360,5	0,994	2358,44	0,50	2,88

Fase de calentamiento (Cal.), fase de mantenimiento (Mant.), fase de enfriamiento (Enf.).

AP2.4.2. Material de poda de olivar sin hoja

a) Hidrólisis con ácido clorhídrico

Tabla AP2.92:
Ajustes realizados en los ensayos de hidrólisis con HCl
sobre material de poda de olivar sin hoja.

Ensayo	Fases						R ₀	pH	Log R ₀ '
	Cal.	r ²	Mant.	r ²	Enf.	r ²			
HSh-Cl1	T = 0,93t + 60,21	0,990	T = 85	1	T = -0,63t + 254,92	0,989	1499,85	0,49	2,69
HSh-Cl2	T = 0,93t + 60,20	0,991	T = 85	1	T = -0,63t + 254,92	0,994	1501,42	0,19	2,99
HSh-Cl3	T = 0,5t + 60	0,995	T = 85	1	T = -0,67t + 281,7	0,996	1817,93	0,00	3,26
HSh-Cl4	T = 0,92t + 60,26	0,998	T = 85	1	T = -0,64t + 256,67	0,988	1506,85	0,00	3,18
HSh-Cl5	T = 0,3571t + 60	0,993	T = 90	1	T = -0,76t + 336,24	0,997	2243,41	0,63	2,72
HSh-Cl6	T = 0,39t + 60	0,996	T = 90	1	T = -0,59t + 278,34	0,990	2261,94	0,21	3,14
HSh-Cl7	T = 0,36t + 60	0,990	T = 90	1	T = -0,76t + 336,24	0,993	2256,36	0,00	3,35
HSh-Cl8	T = 0,36t + 60	0,993	T = 90	1	T = -0,76t + 336,24	0,988	2371,74	0,00	3,38
HSh-Cl9	T = 0,3571t + 60	0,991	T = 95	1	T = -0,76t + 336,24	0,979	3043,44	0,51	2,97
HSh-Cl10	-	-	T = 95	1	T = -0,75t + 275,31	0,991	2774,48	0,20	3,24
HSh-Cl11	T = 0,5t + 60	0,990	T = 95	1	T = -0,64t + 282,67	0,979	3047,80	0,00	3,48
HSh-Cl12	T = 0,64t + 60	0,995	T = 95	1	T = -0,68t + 295,24	0,996	3026,64	0,00	3,48
HSh-Cl13	T = 0,36t + 60	0,993	T = 100	1	T = -0,76t + 336,24	0,999	5044,16	0,49	3,21
HSh-Cl14	T = 0,94t + 60,04	0,997	T = 100	1	T = -0,59t + 256,74	0,998	4227,41	0,17	3,46
HSh-Cl15	T = 0,94t + 60,04	0,989	T = 100	1	T = -0,59t + 256,74	0,991	4953,70	0,00	3,69
HSh-Cl16	T = 0,94t + 60,04	0,993	T = 100	1	T = -0,59t + 256,74	0,990	3933,66	0,00	3,59

Fase de calentamiento (Cal.), fase de mantenimiento (Mant.), fase de enfriamiento (Enf.).

b) Hidrólisis con ácido sulfúrico

Tabla AP2.93:
Ajustes realizados en los ensayos de hidrólisis con H₂SO₄
sobre material de poda de olivar sin hoja.

Ensayo	Fases						R ₀	pH	Log R ₀ '
	Cal.	r ²	Mant.	r ²	Enf.	r ²			
HSh-S1	-	-	T = 85	1	y = -0,79x + 277,09	0,990	1405,43	0,63	2,52
HSh-S2	y = x + 60	0,995	T = 85	1	y = -1,32x + 439,91	0,979	1456,06	0,30	2,86
HSh-S3	-	-	T = 85	1	y = -0,61x + 235,11	0,995	1448,46	0,13	3,03
HSh-S4	y = 0,64x + 59,99	0,991	T = 85	1	y = -0,83x + 318,73	0,997	1512,24	0,09	3,09
HSh-S5	-	-	T = 90	1	y = -0,57x + 228,67	0,987	2029,13	0,61	2,70
HSh-S6	-	-	T = 90	1	y = -0,68x + 253,9	0,994	1983,34	0,39	2,91
HSh-S7	-	-	T = 90	1	y = -0,77x + 279,69	0,990	2009,73	0,36	2,94
HSh-S8	-	-	T = 90	1	y = -0,77x + 278,73	0,986	2005,62	0,18	3,12
HSh-S9	y = 0,39x + 60	0,998	T = 95	1	y = -1,28x + 519,87	0,993	3097,8	0,59	2,90
HSh-S10	y = 0,74x + 60	0,990	T = 95	1	y = -0,67x + 288,97	0,978	3027,62	0,47	3,01
HSh-S11	-	-	T = 95	1	y = -0,71x + 264,49	0,993	2748,96	0,20	3,24
HSh-S12	y = x + 60	0,991	T = 95	1	y = -0,71x + 287,17	0,990	2873,95	0,09	3,37
HSh-S13	y = 0,5x + 60	0,997	T = 100	1	y = -0,89x + 383,87	0,987	4325,79	0,53	3,11
HSh-S14	y = 0,37x + 60	0,990	T = 100	1	y = -0,70x + 344,64	0,988	4468,35	0,22	3,43
HSh-S15	y = x + 60	0,986	T = 100	1	y = -0,73x + 305,77	0,999	4375,36	0,23	3,41
HSh-S16	y = x + 60	0,991	T = 100	1	y = -0,52x + 248,36	0,996	4224,92	0,11	3,52

Fase de calentamiento (Cal.), fase de mantenimiento (Mant.), fase de enfriamiento (Enf.).



Apéndice

Datos primarios de fermentación

3

Este apéndice contiene los resultados de los ensayos de fermentación de diferentes medios de cultivo sintetizados y de hidrolizados con las levaduras *C. guilliermondii* y *P. stipitis*. A modo de recordatorio, las fermentaciones se nombran por un código que indica en primer lugar el nombre de la especie, seguido de siglas que hacen referencia al tipo de hidrolizado.

En los laboratorios del Dpto. de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de *São Paulo* (Brasil), se han realizado una serie de experimentos preliminares con objeto de seleccionar la levadura. Posteriormente, se ha programado un diseño de experimentos y, finalmente, se ha escalado la fermentación a biorreactor tipo tanque agitado. En los laboratorios del Dpto. de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén, se han desarrollado igualmente una serie de fermentaciones en biorreactor tipo tanque agitado variando diferentes parámetros.

AP3.1. Selección de la levadura *C. guilliermondii*

AP3.1.1. Ensayos con diferentes medios de cultivo.

Tabla AP3.1:
Fermentación en Erlenmeyer Cg-H. Medio de cultivo: hidrolizado de poda de olivo sin hoja sin hoja. Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, $\omega = 0,4$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,41±0,01	35,74±0,03	23,92±0,04	5,80±0,02	n.d.	n.d.	3,61±0,01	4,92±0,01
16	1,88±0,03	35,31±0,25	23,54±0,34	5,76±0,01	n.d.	n.d.	3,50±0,02	4,76±0,01
40	1,93±0,02	35,37±0,11	23,41±0,33	5,75±0,02	n.d.	n.d.	3,52±0,03	4,59±0,01
64	1,98±0,01	35,49±0,07	23,70±0,17	5,73±0,04	n.d.	n.d.	3,64±0,02	4,53±0,01
88	2,04±0,05	35,64±0,07	23,61±0,34	5,81±0,02	n.d.	n.d.	3,64±0,02	4,52±0,01
112	2,09±0,02	35,44±0,14	23,74±0,28	5,81±0,03	n.d.	n.d.	3,54±0,04	4,48±0,02

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.2:
 Fermentación en Erlenmeyer *Cg*-HR. Medio de cultivo: hidrolizado de poda de olivo sin hoja suplementado según proponen Roberto *et al.* (1994).
 Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, $\omega = 0,4$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,44±0,01	39,36±0,52	21,52±0,01	5,32±0,03	n.d.	n.d.	3,27±0,01	4,94±0,01
16	2,05±0,01	39,06±0,48	20,96±0,09	5,16±0,05	n.d.	n.d.	3,35±0,03	4,77±0,08
40	2,59±0,16	38,84±0,07	20,42±0,71	5,16±0,09	0,47±0,03	n.d.	3,30±0,02	4,72±0,06
64	4,28±0,01	25,87±0,14	0,40±0,05	5,30±0,02	11,11±0,03	4,14±0,06	2,70±0,13	4,72±0,11
88	4,75±0,01	15,16±0,07	n.d.	5,23±0,11	15,09±0,01	6,16±0,03	1,76±0,36	5,01±0,05
112	5,91±0,01	4,23±0,39	n.d.	5,29±0,11	12,61±0,08	7,98±0,05	1,43±0,33	5,22±0,04

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.3:
 Fermentación en Erlenmeyer *Cg*-HL. Medio de cultivo: hidrolizado de poda de olivo sin hoja suplementado con medio propuesto por Lindegren *et al.* (1958) al 50 % Cuevas (2007). Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, $\omega = 0,4$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,43±0,01	39,45±0,05	21,41±0,03	5,39±0,05	n.d.	n.d.	3,13±0,21	4,99±0,01
16	2,20±0,01	36,33±0,93	15,22±0,07	5,42±0,04	1,90±0,13	0,28±0,02	2,89±0,39	4,94±0,01
40	3,52±0,05	28,14±0,11	0,25±0,07	5,33±0,02	7,52±0,38	1,14±0,03	2,65±0,42	4,92±0,01
64	4,24±0,03	17,94±0,53	n.d.	5,34±0,03	15,09±0,03	6,11±0,28	1,62±0,28	4,91±0,02
88	5,77±0,09	7,70±0,11	n.d.	2,09±0,16	18,42±0,18	10,84±0,17	0,40±0,01	5,23±0,06
112	6,24±0,06	0,99±0,14	n.d.	0,33±0,08	17,59±0,02	10,23±0,06	0,05±0,01	5,32±0,07

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.4:
 Fermentación en Erlenmeyer *Cg*-SR. Medio de cultivo: medio sintético suplementado con medio propuesto por Roberto *et al.* (1994).
 Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, $\omega = 0,4$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	pH
0	1,51±0,01	39,49±0,09	20,37±0,01	5,70±0,02	n.d.	n.d.	5,00±0,01
16	2,67±0,03	35,20±0,02	0,43±0,13	5,69±0,01	4,58±0,12	2,63±0,29	3,94±0,03
40	5,54±0,02	10,45±0,19	n.d.	5,52±0,27	6,16±0,03	18,34±0,32	3,50±0,02
64	6,08±0,04	0,57±0,12	n.d.	5,35±0,11	5,18±0,06	25,00±0,30	3,09±0,08
88	6,22±0,01	n.d.	n.d.	4,73±0,05	4,28±0,01	24,03±0,79	2,90±0,19
112	6,33±0,12	n.d.	n.d.	4,20±0,02	2,76±0,04	23,63±0,62	2,50±0,05

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.5:
 Fermentación en Erlenmeyer *Cg*-SL. Medio de cultivo: medio sintético suplementado con medio propuesto por Lindegren *et al.* (1958) al 50 % Cuevas (2007).
 Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, $\omega = 0,4$.

t, h	x, kg m ⁻³	D-xil, kg m ⁻³	D-glu, kg m ⁻³	L-ara, kg m ⁻³	E, kg m ⁻³	Xi, kg m ⁻³	pH
0	1,52±0,02	39,32±0,05	20,41±0,04	5,95±0,08	n.d.	n.d.	5,07±0,04
16	3,59±0,06	33,85±0,16	0,22±0,13	6,07±0,11	9,13±0,02	1,52±0,04	4,83±0,02
40	5,89±0,01	21,20±0,41	n.d.	4,85±0,19	15,18±0,06	5,48±0,04	3,77±0,04
64	6,26±0,06	6,28±0,25	n.d.	3,64±0,07	11,60±0,03	12,43±0,02	3,54±0,02
88	6,47±0,03	0,83±0,22	n.d.	3,58±0,14	11,27±0,08	13,74±0,02	2,81±0,02
112	6,61±0,02	n.d.	n.d.	3,41±0,15	10,31±0,04	11,62±0,11	2,43±0,06

No detectado (n.d.).

AP3.1.2. Plan experimental.

Fermentaciones realizadas en Erlenmeyer a pH 5 y agitación de 200 rpm. Las variables a modificar son: concentración inicial de inóculo, aeración y temperatura. Tabla A3.6. Como medio de cultivo se utiliza hidrolizado de poda sin hoja suplementado con medio propuesto por Lindegren *et al.* (1958) al 50 %.

Tabla AP3.6:
 Diseño de experimentos proyectado.

Expto.	x_0 , kg m ⁻³	ω	T, °C
<i>Cg</i> -1	-1	-1	-1
<i>Cg</i> -2	1	-1	-1
<i>Cg</i> -3	-1	1	-1
<i>Cg</i> -4	1	1	-1
<i>Cg</i> -5	-1	-1	1
<i>Cg</i> -6	1	-1	1
<i>Cg</i> -7	-1	1	1
<i>Cg</i> -8	1	1	1
<i>Cg</i> -9	0	0	0
<i>Cg</i> -10	0	0	0
<i>Cg</i> -11	0	0	0

x_0 (concentración inicial de biomasa: 0,5, 1,5, 2,5 kg m⁻³), ω (aeración, volumen medio/volumen Erlenmeyer: 0,2, 0,4, 0,6), T (temperatura: 25, 30 y 35 °C).

Tabla AP3.7:
Fermentación diseño experimental con *C. guilliermondii*. Experimento Cg-1.
Condiciones: $x_0 = 0,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,2$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	0,48±0,01	32,56±0,62	23,48±0,09	4,89±0,03	n.d.	n.d.	3,22±0,08	4,75±0,02
12	1,71±0,01	32,10±0,11	23,32±0,01	4,84±0,23	n.d.	n.d.	3,16±0,06	4,53±0,04
24	1,78±0,07	32,14±0,09	23,02±0,17	5,04±0,13	n.d.	n.d.	3,21±0,09	4,46±0,04
48	1,87±0,09	31,67±0,31	21,69±0,18	5,21±0,01	n.d.	n.d.	3,27±0,23	4,63±0,11
72	2,19±0,01	31,88±0,32	21,45±0,15	5,19±0,06	n.d.	n.d.	3,31±0,01	4,45±0,01
96	2,37±0,21	31,97±0,33	20,67±0,77	5,22±0,01	n.d.	n.d.	3,03±0,04	4,51±0,01
120	3,96±0,16	31,79±0,76	13,87±0,21	5,13±0,04	2,37±0,31	0,12±0,01	1,91±0,03	4,63±0,04
144	6,44±0,54	13,93±0,61	n.d.	5,26±0,07	8,68±0,24	3,18±0,98	1,47±0,06	5,01±0,01
168	8,09±0,01	n.d.	n.d.	5,08±0,27	7,91±0,13	7,38±0,06	0,88±0,05	5,06±0,01
192	7,66±0,67	n.d.	n.d.	5,13±0,29	7,49±0,06	7,08±0,05	0,76±0,16	5,11±0,01

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.8:
Fermentación diseño experimental con *C. guilliermondii*. Experimento Cg-2.
Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,2$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	2,46±0,05	31,89±0,06	21,49±0,23	5,06±0,08	n.d.	n.d.	3,15±0,01	4,70±0,01
12	2,63±0,01	31,44±0,33	20,67±0,75	4,67±0,49	n.d.	n.d.	3,17±0,06	4,48±0,01
24	2,98±0,02	31,31±0,13	20,91±0,28	4,96±0,09	n.d.	n.d.	3,35±0,07	4,48±0,01
48	3,28±0,08	31,72±0,02	21,01±0,63	4,79±0,31	n.d.	n.d.	3,47±0,33	4,50±0,01
72	3,37±0,05	31,19±0,27	20,80±0,63	4,61±0,56	n.d.	n.d.	3,48±0,11	4,59±0,16
96	4,29±0,04	31,17±0,06	9,58±0,33	4,86±0,49	2,39±0,22	n.d.	3,25±0,21	4,76±0,06
120	6,13±0,07	19,89±0,44	n.d.	4,92±0,19	8,08±0,06	1,17±0,05	0,81±0,03	4,43±0,61
144	7,81±0,01	6,89±0,16	n.d.	4,97±0,23	7,77±0,05	4,81±0,06	n.d.	4,89±0,01
168	8,46±0,03	n.d.	n.d.	4,80±0,26	7,51±0,16	7,88±0,13	n.d.	5,00±0,01
192	8,59±0,11	n.d.	n.d.	4,78±0,02	7,31±0,12	7,75±0,07	n.d.	4,99±0,03

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.9:
 Fermentación diseño experimental con *C. guilliermondii*. Experimento Cg-3.
 Condiciones: $x_0 = 0,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,6$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	0,48±0,03	32,78±0,03	22,05±0,02	4,94±0,11	n.d.	n.d.	3,34±0,06	4,83±0,01
12	1,23±0,05	31,87±0,16	22,00±0,15	5,00±0,01	n.d.	n.d.	3,24±0,07	4,48±0,01
24	1,68±0,22	32,34±0,64	21,98±0,06	5,08±0,06	n.d.	n.d.	3,27±0,21	4,47±0,01
48	1,74±0,19	32,28±0,71	21,89±0,21	5,10±0,03	n.d.	n.d.	3,26±0,24	4,44±0,03
72	1,78±0,03	32,24±0,77	21,75±0,37	5,20±0,21	n.d.	n.d.	3,30±0,21	4,42±0,01
96	2,33±0,01	32,17±0,43	21,52±0,73	5,26±0,08	n.d.	n.d.	3,25±0,21	4,41±0,01
120	2,64±0,05	32,15±0,35	21,60±0,64	5,13±0,14	n.d.	n.d.	3,32±0,23	4,41±0,01
144	4,14±0,01	27,88±1,10	n.d.	5,26±0,07	5,90±0,06	0,80±0,02	2,12±0,05	4,66±0,08
168	5,53±0,04	17,04±1,17	n.d.	5,14±0,01	10,19±0,33	5,57±0,78	1,83±0,06	4,75±0,05
192	6,41±0,06	8,90±1,10	n.d.	5,13±0,09	9,88±0,21	7,70±0,33	0,86±0,06	4,82±0,04
216	6,75±0,07	2,04±0,43	n.d.	5,10±0,02	9,77±0,11	7,16±0,06	n.d.	4,90±0,03
240	7,28±0,03	n.d.	n.d.	5,11±0,02	9,38±0,10	7,20±0,15	n.d.	5,11±0,02

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.10:
 Fermentación diseño experimental con *C. guilliermondii*. Experimento Cg-4.
 Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,6$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	2,45±0,04	32,58±0,31	23,71±0,18	5,10±0,19	n.d.	n.d.	3,37±0,08	4,81±0,02
12	2,67±0,13	31,88±0,01	23,36±0,34	5,06±0,06	n.d.	n.d.	3,35±0,07	4,50±0,01
24	2,97±0,01	31,79±0,35	23,22±0,18	4,90±0,01	n.d.	n.d.	3,33±0,06	4,49±0,01
48	3,25±0,13	31,55±0,63	20,11±0,93	4,78±0,35	n.d.	n.d.	3,36±0,06	4,43±0,01
72	3,99±0,12	31,21±0,81	13,85±0,54	4,69±0,31	3,51±0,27	n.d.	2,89±0,04	4,58±0,03
96	4,83±0,01	23,64±0,42	n.d.	5,14±0,23	9,53±0,29	1,82±0,17	2,21±0,04	4,80±0,01
120	5,54±0,01	17,22±0,24	n.d.	5,22±0,28	10,17±0,74	4,88±0,03	2,20±0,03	5,02±0,01
144	6,68±0,03	8,89±0,17	n.d.	5,32±0,15	10,08±0,88	8,02±0,11	1,19±0,02	4,99±0,01
168	7,03±0,06	1,65±0,47	n.d.	4,94±0,07	9,86±0,31	8,15±0,05	0,55±0,02	5,03±0,03
192	7,20±0,05	n.d.	n.d.	4,55±0,06	9,42±0,17	8,01±0,10	0,27±0,04	5,09±0,01

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.11:
Fermentación diseño experimental con *C. guilliermondii*. Experimentos Cg-5.
Condiciones: $x_0 = 0,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,2$, $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	0,47±0,04	31,25±0,07	20,99±0,07	4,90±0,06	n.d.	n.d.	3,20±0,01	4,70±0,04
12	2,25±0,37	31,50±0,41	20,82±0,08	5,02±0,01	n.d.	n.d.	3,11±0,01	4,47±0,01
24	2,97±0,08	31,45±0,09	21,31±0,32	5,04±0,08	n.d.	n.d.	3,12±0,04	4,45±0,01
48	3,25±0,06	31,65±0,34	21,44±0,64	5,03±0,23	n.d.	n.d.	3,17±0,01	4,41±0,02
72	3,60±0,01	31,91±1,02	21,88±1,12	5,09±0,25	n.d.	n.d.	3,19±0,11	4,39±0,01
96	3,79±0,04	31,87±0,76	21,73±0,86	5,10±0,13	n.d.	n.d.	3,17±0,06	4,37±0,02
120	4,10±0,02	31,79±0,62	21,91±1,21	5,10±0,16	n.d.	n.d.	3,18±0,02	4,35±0,01

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.12:
Fermentación diseño experimental con *C. guilliermondii*. Experimento Cg-6.
Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,2$, $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	2,45±0,05	31,25±0,51	20,70±0,38	4,83±0,27	n.d.	n.d.	3,17±0,07	4,70±0,01
12	2,82±0,03	31,27±0,37	20,53±0,48	4,84±0,22	n.d.	n.d.	3,22±0,08	4,49±0,01
24	3,22±0,17	31,03±0,13	20,65±0,16	4,77±0,46	n.d.	n.d.	3,22±0,09	4,46±0,01
48	3,94±0,12	31,19±0,28	20,47±0,23	5,01±0,16	n.d.	n.d.	3,24±0,05	4,42±0,01
72	4,22±0,01	31,50±0,41	20,74±0,41	4,98±0,31	n.d.	n.d.	3,20±0,03	4,39±0,01
96	4,39±0,02	31,06±0,24	20,84±0,43	5,05±0,06	n.d.	n.d.	3,20±0,01	4,38±0,01
120	4,49±0,05	31,05±0,41	21,17±0,38	4,98±0,04	n.d.	n.d.	3,19±0,02	4,35±0,01

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.13:
Fermentación diseño experimental con *C. guilliermondii*. Experimento Cg-7.
Condiciones: $x_0 = 0,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	0,47±0,01	31,91±0,42	21,27±0,42	5,06±0,14	n.d.	n.d.	3,36±0,01	4,82±0,02
12	1,30±0,05	32,01±0,48	21,40±0,51	5,13±0,13	n.d.	n.d.	3,28±0,09	4,49±0,01
24	1,75±0,01	31,95±0,87	21,33±0,48	5,10±0,34	n.d.	n.d.	3,29±0,13	4,43±0,01
48	1,99±0,06	31,67±0,64	21,23±0,33	5,05±0,18	n.d.	n.d.	3,25±0,04	4,40±0,01
72	2,16±0,01	31,59±0,27	21,46±0,51	5,13±0,28	n.d.	n.d.	3,29±0,01	4,40±0,02
96	2,42±0,01	31,50±0,04	21,36±0,22	5,09±0,25	n.d.	n.d.	3,18±0,04	4,45±0,01
120	2,68±0,08	31,51±0,73	21,41±0,52	5,14±0,18	n.d.	n.d.	3,26±0,01	4,31±0,01

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.14:
 Fermentación diseño experimental con *C. guilliermondii*. Experimento Cg-8.
 Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	2,51±0,06	31,46±0,36	21,44±0,81	5,06±0,06	n.d.	n.d.	3,28±0,04	4,81±0,01
12	2,71±0,09	31,77±0,47	21,50±0,86	5,04±0,08	n.d.	n.d.	3,23±0,06	4,50±0,01
24	2,91±0,15	31,76±0,93	21,50±0,42	5,11±0,03	n.d.	n.d.	3,36±0,16	4,47±0,01
48	3,34±0,01	31,54±0,47	21,36±0,91	5,05±0,01	n.d.	n.d.	3,35±0,04	4,42±0,01
72	3,49±0,12	31,71±0,08	21,40±0,39	4,94±0,09	n.d.	n.d.	3,27±0,11	4,42±0,04
96	3,75±0,02	31,57±0,01	20,98±0,32	5,06±0,06	n.d.	n.d.	3,27±0,08	4,48±0,01
120	4,20±0,11	31,79±0,47	21,04±0,24	5,07±0,04	n.d.	n.d.	3,44±0,04	4,36±0,01
No detectado (n.d.).								

Tabla AP3.15:
 Fermentación diseño experimental con *C. guilliermondii*. Experimentos Cg-9, Cg-10 y Cg-11.
 Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,42±0,02	32,80±0,25	23,60±0,03	5,88±0,13	n.d.	n.d.	3,66±0,04	5,02±0,04
24	2,16±0,01	32,49±0,23	23,53±0,09	5,70±0,17	n.d.	n.d.	3,42±0,18	4,73±0,01
48	2,98±0,14	32,46±0,09	19,40±0,59	5,80±0,14	1,43±0,49	n.d.	3,43±0,18	4,76±0,03
72	4,35±0,31	28,34±0,74	n.d.	5,46±0,07	10,18±0,57	0,57±0,03	3,19±0,21	4,71±0,03
96	5,58±0,30	17,12±0,49	n.d.	6,10±0,18	12,94±0,07	3,93±0,08	2,99±0,01	4,77±0,04
120	6,02±0,23	9,07±0,59	n.d.	6,06±0,14	11,44±0,21	8,46±0,36	2,17±0,05	4,90±0,09
144	6,32±0,06	1,98±0,31	n.d.	5,48±0,22	10,98±0,33	9,15±0,10	1,30±0,09	5,16±0,04
168	6,40±0,07	0,65±0,16	n.d.	4,72±0,15	9,56±0,30	8,50±0,33	0,73±0,07	5,15±0,03
216	6,43±0,10	n.d.	n.d.	2,49±0,12	8,42±0,21	8,50±0,31	0,37±0,09	5,18±0,03
240	6,41±0,14	n.d.	n.d.	1,97±0,09	7,81±0,38	8,33±0,38	0,00±0,00	5,15±0,03
No detectado (n.d.).								

AP3.1.3. Influencia del pH.

Tabla AP3.16:
 Fermentación con *C. guilliermondii* - pH 3. Cg-1,5-3,0.
 Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 3$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,53±0,01	36,03±0,11	24,14±0,23	5,62±0,09	n.d.	n.d.	3,58±0,04	3,08±0,02
24	1,75±0,03	35,29±0,02	23,49±0,11	5,76±0,06	n.d.	n.d.	3,47±0,05	3,07±0,01
48	1,95±0,15	35,76±0,08	23,72±0,01	5,43±0,08	n.d.	n.d.	3,24±0,04	3,04±0,03
72	2,37±0,09	35,35±0,01	23,71±0,43	5,71±0,41	n.d.	n.d.	3,38±0,25	3,03±0,03
96	2,59±0,07	36,33±0,39	24,53±0,57	5,70±0,04	n.d.	n.d.	3,36±0,11	3,06±0,11
120	2,68±0,01	35,98±0,37	24,26±0,35	5,65±0,06	n.d.	n.d.	3,46±0,07	3,04±0,06
144	2,81±0,05	36,88±0,18	24,45±0,31	5,83±0,17	n.d.	n.d.	3,46±0,21	3,06±0,04

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.17:
 Fermentación con *C. guilliermondii* - pH 4. Cg-1,5-4,0.
 Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 4$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,57±0,02	35,74±0,19	24,03±0,23	5,61±0,08	n.d.	n.d.	3,45±0,03	4,07±0,02
24	1,61±0,02	35,49±0,26	23,68±0,17	5,47±0,06	n.d.	n.d.	3,37±0,11	3,82±0,01
48	1,78±0,01	35,93±0,17	23,63±0,13	5,69±0,11	n.d.	n.d.	3,42±0,11	3,78±0,01
72	2,16±0,29	35,93±0,81	24,00±0,89	5,64±0,31	n.d.	n.d.	3,48±0,01	3,76±0,01
96	2,49±0,34	35,41±0,28	24,19±0,47	5,69±0,09	n.d.	n.d.	3,58±0,18	3,74±0,01
120	2,43±0,25	36,16±0,76	24,39±0,88	5,80±0,13	n.d.	n.d.	3,77±0,09	3,74±0,02
144	2,60±0,31	36,75±0,64	24,61±0,85	5,86±0,01	n.d.	n.d.	3,66±0,04	3,75±0,01
168	2,69±0,19	36,62±0,39	24,40±1,03	5,44±0,17	n.d.	n.d.	3,60±0,05	3,75±0,02

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.18:
 Fermentación con *C. guilliermondii* - pH 5. *Cg*-1,5-5,0.
 Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,43±0,01	39,45±0,05	21,41±0,03	5,39±0,05	n.d.	n.d.	3,13±0,21	4,99±0,01
16	2,20±0,01	36,33±0,93	15,22±0,07	5,42±0,04	1,90±0,13	0,28±0,02	2,89±0,39	4,94±0,01
40	3,52±0,05	28,14±0,11	0,25±0,07	5,33±0,02	7,52±0,38	1,14±0,03	2,65±0,42	4,92±0,01
64	4,24±0,03	17,94±0,53	n.d.	5,34±0,03	15,09±0,03	6,11±0,28	1,62±0,28	4,91±0,02
88	5,77±0,09	7,70±0,11	n.d.	2,09±0,16	18,42±0,18	10,84±0,17	0,40±0,01	5,23±0,06
112	6,24±0,06	0,99±0,14	n.d.	0,33±0,08	17,59±0,02	10,23±0,06	0,05±0,01	5,32±0,07
No detectado (n.d.).								

Tabla AP3.19:
 Fermentación con *C. guilliermondii* - pH 6. *Cg*-1,5-6,0
 Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,43±0,01	35,69±0,04	23,59±0,11	5,82±0,09	n.d.	n.d.	3,64±0,08	6,08±0,01
24	2,26±0,02	35,65±0,11	23,64±0,04	5,62±0,13	n.d.	n.d.	3,36±0,02	6,13±0,04
48	3,03±0,04	34,97±0,16	18,92±1,65	5,79±0,21	1,58±0,61	n.d.	3,51±0,12	6,17±0,05
72	4,51±0,03	29,35±0,08	n.d.	5,42±0,01	10,86±0,04	0,53±0,03	3,27±0,11	6,20±0,04
96	5,91±0,07	16,18±0,11	n.d.	6,16±0,21	11,38±0,49	2,70±0,06	3,00±0,07	6,22±0,03
120	6,52±0,13	9,01±0,81	n.d.	6,04±0,17	11,24±0,58	5,39±0,03	2,18±0,09	6,23±0,05
144	7,32±0,11	1,99±0,44	n.d.	5,41±0,25	11,10±0,35	8,07±0,16	1,29±0,13	6,26±0,05
168	7,54±0,06	n.d.	n.d.	3,05±0,11	10,77±1,25	7,86±0,55	0,38±0,01	6,28±0,04
No detectado (n.d.).								

AP3.1.4. Influencia de la concentración inicial de inóculo.

Tabla AP3.20:

Fermentación con *C. guilliermondii* - $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$. *Cg-1,5-5,5*.
Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,48±0,01	35,62±0,04	23,58±0,11	5,61±0,09	n.d.	n.d.	3,77±0,08	5,54±0,01
24	3,96±0,04	29,57±0,60	n.d.	5,51±0,09	12,41±0,21	3,98±0,15	3,59±0,02	5,31±0,03
48	5,06±0,29	17,87±0,16	n.d.	5,24±0,11	13,88±0,01	8,10±0,01	4,15±0,12	5,00±0,05
72	5,43±0,13	5,88±0,28	n.d.	3,11±0,06	12,00±0,16	8,21±0,11	4,62±0,11	4,80±0,03
96	5,80±0,15	2,80±0,14	n.d.	1,99±0,01	10,50±0,08	8,09±0,22	4,73±0,04	4,93±0,03
120	5,90±0,13	n.d.	n.d.	n.d.	6,89±0,13	8,11±0,04	4,06±0,09	5,09±0,05

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.21:

Tabla A3.21: Fermentación con *C. guilliermondii* - $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$. *Cg-2,5-5,5*.
Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	2,48±0,02	34,88±0,15	23,29±0,33	5,56±0,04	n.d.	n.d.	3,67±0,04	5,46±0,05
24	4,12±0,06	24,86±0,27	n.d.	5,80±0,22	13,52±0,16	3,68±0,45	3,87±0,07	5,24±0,04
48	5,08±0,04	17,66±0,66	n.d.	5,00±0,18	14,91±0,12	8,11±0,11	4,71±0,01	5,05±0,07
72	5,19±0,07	9,60±0,17	n.d.	2,62±0,11	11,85±0,31	7,64±0,06	5,17±0,06	5,00±0,08
96	5,67±0,08	2,99±0,13	n.d.	1,55±0,16	8,89±0,15	7,52±0,13	5,67±0,08	5,10±0,05
120	6,25±0,17	n.d.	n.d.	n.d.	6,87±1,12	7,02±0,05	3,97±0,52	5,18±0,04

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.22:
 Fermentación con *C. guilliermondii*, $x_0 = 3,5 \text{ kg m}^{-3}$. Cg-3,5-5,5-
 Condiciones: $x_0 = 3,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, T = 30 °C, pH = 5,5 y A = 200 rpm.

t, h	x, kg m ⁻³	D-xil, kg m ⁻³	D-glu, kg m ⁻³	L-ara, kg m ⁻³	E, kg m ⁻³	Xi, kg m ⁻³	HAc, kg m ⁻³	pH
0	3,47±0,02	35,66±0,23	23,92±0,17	5,66±0,04	n.d.	n.d.	3,72±0,03	5,46±0,04
24	4,22±0,06	22,79±0,16	n.d.	5,93±0,08	11,32±0,12	3,20±0,03	3,84±0,02	5,35±0,06
48	5,22±0,11	15,52±0,24	n.d.	6,19±0,06	14,52±0,11	7,97±0,05	4,27±0,05	5,04±0,07
72	5,56±0,06	8,74±0,12	n.d.	6,05±0,06	13,99±0,06	8,43±0,12	5,00±0,07	5,06±0,11
96	6,08±0,13	2,31±0,05	n.d.	1,94±0,01	10,32±0,17	8,32±0,19	5,06±0,11	5,10±0,04
120	6,72±0,09	n.d.	n.d.	n.d.	7,82±0,11	8,22±0,24	4,00±0,03	5,22±0,08
No detectado (n.d.).								

Tabla AP3.23:
 Fermentación con *C. guilliermondii* - $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$. Cg-1,5-6,0.
 Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, T = 30 °C, pH = 6,0 y A = 200 rpm.

t, h	x, kg m ⁻³	D-xil, kg m ⁻³	D-glu, kg m ⁻³	L-ara, kg m ⁻³	E, kg m ⁻³	Xi, kg m ⁻³	HAc, kg m ⁻³	pH
0	1,43±0,01	35,69±0,04	23,59±0,11	5,82±0,09	n.d.	n.d.	3,64±0,08	6,08±0,01
24	2,26±0,02	35,65±0,11	23,64±0,04	5,62±0,13	n.d.	n.d.	3,36±0,02	6,13±0,04
48	3,03±0,04	34,97±0,16	18,92±1,65	5,79±0,21	1,58±0,61	n.d.	3,51±0,12	6,17±0,05
72	4,51±0,03	29,35±0,08	n.d.	5,42±0,01	10,86±0,04	0,53±0,03	3,27±0,11	6,20±0,04
96	5,91±0,07	16,18±0,11	n.d.	6,16±0,21	11,38±0,49	2,70±0,06	3,00±0,07	6,22±0,03
120	6,52±0,13	9,01±0,81	n.d.	6,04±0,17	11,24±0,58	5,39±0,03	2,18±0,09	6,23±0,05
144	7,32±0,11	1,99±0,44	n.d.	5,41±0,25	11,10±0,35	8,07±0,16	1,29±0,13	6,26±0,05
168	7,54±0,06	n.d.	n.d.	3,05±0,11	10,77±1,25	7,86±0,55	0,38±0,01	6,28±0,04
No detectado (n.d.).								

Tabla AP3.24:
 Fermentación con *C. guilliermondii* - $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$. Cg-2,5-6,0.
 Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, T = 30 °C, pH = 6,0 y A = 200 rpm.

t, h	x, kg m ⁻³	D-xil, kg m ⁻³	D-glu, kg m ⁻³	L-ara, kg m ⁻³	E, kg m ⁻³	Xi, kg m ⁻³	HAc, kg m ⁻³	pH
0	2,51±0,02	35,69±0,25	23,89±0,33	5,77±0,08	n.d.	n.d.	3,69±0,04	5,92±0,04
24	4,56±0,04	19,35±0,21	n.d.	6,13±0,06	12,29±0,16	2,08±0,02	3,87±0,07	5,45±0,03
48	6,31±0,05	7,98±0,14	n.d.	6,29±0,09	14,62±0,22	7,19±0,09	4,73±0,01	5,18±0,02
72	7,00±0,11	3,58±0,09	n.d.	6,38±0,08	14,59±0,32	7,47±0,21	5,18±0,06	5,05±0,06
96	7,29±0,07	0,89±0,03	n.d.	1,84±0,04	11,39±0,15	7,28±0,02	4,97±0,08	5,15±0,03
120	7,91±0,08	n.d.	n.d.	n.d.	7,89±0,05	6,95±0,11	3,89±0,52	5,19±0,02
No detectado (n.d.).								

AP3.1.5. Fermentación en biorreactor tipo tanque agitado

Fermentación realizada en la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de São Paulo (Brasil).

AP3.1.5.1. Tabla de resultados

Medio de cultivo: hidrolizado de poda de olivo sin hoja suplementado con medio propuesto por Lindegren *et al.* (1958) al 50 % Cuevas (2007). Equipo: Fermentador B. Braun, Biostat B (Figura 4.7). Condiciones: concentración inicial de inóculo 2,5 kg m⁻³, pH 5,5, temperatura 30 °C y agitación 350 rpm mediante turbina 'Rushton' con un nivel de 6 palas planas. Caudal de aire suministrado de 0,4 cm³ min⁻¹ y 1 dm⁻³ de volumen de medio de cultivo, resultando por tanto 0,4 vvm y un K_La de 17 h⁻¹. Tabla A3.25

Tabla AP3.25:

Fermentación en biorreactor tipo tanque agitado B. Braun, Biostat B, *C. guilliermondii*.

Condiciones: x₀ = 2,5 kg m⁻³, pH = 5,5, T = 30 °C y A = 350 rpm. Caudal de aire suministrado = 0,4 cm³ min⁻¹ y volumen de medio de cultivo = 1 dm³

t, h	x, kg m ⁻³	D-xil, kg m ⁻³	D-glu, kg m ⁻³	L-ara, kg m ⁻³	E, kg m ⁻³	Xi, kg m ⁻³	HAc, kg m ⁻³	pH
0	2,55±0,02	33,44±0,05	22,14±0,06	5,57±0,08	n.d.	n.d.	3,50±0,02	5,57±0,01
6	3,54±0,01	32,55±0,01	13,77±0,18	6,02±0,03	2,71±0,12	n.d.	3,51±0,14	5,25±0,02
14	3,99±0,02	20,54±0,31	0,30±0,06	5,77±0,04	11,62±0,18	2,28±0,05	3,33±0,01	5,13±0,04
19	4,21±0,06	14,06±0,17	0,33±0,01	5,68±0,03	11,22±0,19	4,46±0,08	3,34±0,03	5,03±0,08
24	4,41±0,02	11,11±0,31	n.d.	5,03±0,04	12,15±0,01	6,01±0,06	3,40±0,17	4,99±0,03
29	5,11±0,03	7,14±0,11	n.d.	5,34±0,03	12,26±0,11	7,34±0,15	3,48±0,06	4,90±0,01
36	5,25±0,11	5,25±0,12	n.d.	5,70±0,16	13,27±0,08	7,88±0,22	3,93±0,05	4,83±0,03
42	5,62±0,05	2,56±0,13	n.d.	5,58±0,03	12,50±0,14	8,72±0,18	4,03±0,01	4,74±0,05
48	5,98±0,07	1,26±0,28	n.d.	5,54±0,12	10,92±0,56	8,80±0,07	4,10±0,04	4,70±0,01
54	6,36±0,07	0,30±0,03	n.d.	5,61±0,03	10,49±0,55	8,93±0,05	4,14±0,03	4,65±0,01
60	6,52±0,03	n.d.	n.d.	5,59±0,14	9,89±0,15	8,84±0,29	4,19±0,01	4,69±0,01
66	6,55±0,07	n.d.	n.d.	5,37±0,05	9,62±0,57	9,13±0,04	4,27±0,08	4,69±0,02

No detectado (n.d.).

AP3.1.5.2. Cálculo del K_{La}

Condiciones: Fermentador B. Braun, Biostat B (Figura 4.7). Agitación 350 rpm mediante turbina ‘Rushton’ con un nivel de 6 palas planas. Caudal de aire suministrado de $0,4 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ y 1 dm^3 de volumen de medio de cultivo. Resultando $0,4 \text{ vvm}$. Tabla A3.55.

Tabla AP3.26:
Determinación del K_{La} , h^{-1} en la fermentación realizada en biorreactor B Braun, Biostat B.

t, s	Determinación 1		Determinación 2		Determinación 3	
	p O ₂ , %	-K _{La} · t	p O ₂ , %	-K _{La} · t	p O ₂ , %	-K _{La} · t
10	0,0	0,000	0,0	0,000	0,0	0,000
20	0,7	-0,007	1,0	-0,010	3,3	-0,034
30	4,1	-0,042	4,4	-0,045	7,1	-0,074
40	8,0	-0,083	7,9	-0,082	11,1	-0,118
50	12,3	-0,131	12,9	-0,138	14,7	-0,159
60	17,4	-0,191	17,0	-0,186	18,1	-0,200
70	20,4	-0,228	20,6	-0,231	25,7	-0,297
80	24,5	-0,281	24,4	-0,280	28,7	-0,338
90	28,1	-0,330	28,1	-0,330	31,4	-0,377
100	31,8	-0,383	31,4	-0,377	34,0	-0,416
110	35,2	-0,434	34,7	-0,426	36,8	-0,459
120	38,5	-0,486	37,4	-0,468	38,8	-0,491
		r ² = 1		r ² = 1		r ² = 1
K _{La} , h ⁻¹		17,50		17,22		17,33

$K_{La}, \text{h}^{-1} = 17,4 \pm 0,1$

Presión de oxígeno disuelto en el seno del líquido (p O₂, %), Pendiente de la ecuación $\text{Ln} \cdot (1 - p\text{O}_2/\text{O}_{2s})$ que relaciona las presiones de oxígeno disuelto en el seno del líquido y la presión de oxígeno disuelto en equilibrio con el oxígeno de la fase gaseosa (-K_{La} · t).

AP3.2. Selección de la levadura *P stipitis*.

AP3.2.1. Ensayos con diferentes medios de cultivo.

Tabla AP3.27:
Fermentación en Erlenmeyer *Ps-H*. Medio de cultivo: hidrolizado de poda de olivo sin hoja. Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, $\omega = 0,4$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,40±0,03	38,28±0,07	27,26±0,06	5,88±0,02	n.d.	n.d.	3,68±0,01	5,47±0,01
16	2,02±0,09	37,61±0,11	26,83±0,07	5,77±0,03	n.d.	n.d.	3,63±0,01	5,33±0,02
40	2,14±0,01	36,86±0,07	26,22±0,14	5,64±0,05	n.d.	n.d.	3,59±0,02	5,28±0,11
64	2,13±0,01	37,09±0,15	26,63±0,12	5,42±0,14	n.d.	n.d.	3,56±0,01	4,88±0,02
88	2,15±0,02	37,03±0,08	25,67±0,11	5,64±0,02	n.d.	n.d.	3,58±0,02	4,55±0,01
112	2,14±0,02	37,31±0,07	25,57±0,06	5,84±0,03	n.d.	n.d.	3,70±0,04	4,45±0,04

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.28:
Fermentación en Erlenmeyer *Ps-HL*. Medio de cultivo: hidrolizado de poda de olivo sin hoja suplementado con medio propuesto por Lindegren *et al.* (1958), AL 50 %.
Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, $\omega = 0,4$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,41±0,05	38,27±0,06	26,91±0,03	5,91±0,02	n.d.	n.d.	3,70±0,04	5,50±0,02
16	2,30±0,03	38,08±0,05	26,62±0,19	5,78±0,04	n.d.	n.d.	3,65±0,04	4,93±0,04
40	2,48±0,04	37,82±0,05	26,60±0,21	5,71±0,12	n.d.	n.d.	3,62±0,03	4,74±0,19
64	2,47±0,02	37,71±0,23	26,84±0,03	5,27±0,06	n.d.	n.d.	3,38±0,04	4,61±0,04
88	2,44±0,06	37,88±0,14	26,59±0,01	4,96±0,04	n.d.	n.d.	3,26±0,02	4,84±0,12
112	2,46±0,04	37,82±0,07	26,72±0,06	5,68±0,06	n.d.	n.d.	3,40±0,02	4,55±0,09

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.29:
 Fermentación en Erlenmeyer *Ps*-HF. Medio de cultivo: hidrolizado de poda de olivo sin hoja suplementado con medio propuesto por Fonseca (2011).
 Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, $\omega = 0,4$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,38±0,01	35,93±0,06	25,45±0,03	5,45±0,04	n.d.	n.d.	3,30±0,02	5,54±0,01
16	2,00±0,03	35,70±0,03	25,24±0,14	5,37±0,05	n.d.	n.d.	3,25±0,02	5,24±0,04
40	2,02±0,03	35,46±0,01	25,34±0,08	5,34±0,05	n.d.	n.d.	3,25±0,04	5,15±0,04
64	2,04±0,02	35,72±0,11	25,17±0,08	5,25±0,06	n.d.	n.d.	3,29±0,001	4,98±0,03
88	2,13±0,02	35,60±0,25	25,12±0,23	5,40±0,04	n.d.	n.d.	3,31±0,07	4,78±0,06
112	2,14±0,02	35,54±0,11	25,25±0,18	5,54±0,16	n.d.	n.d.	3,33±0,08	4,72±0,01

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.30:
 Fermentación en Erlenmeyer *Ps*-HD. Medio de cultivo: hidrolizado de poda de olivo sin hoja suplementado con extracto de levadura, según propone Debus *et al.* (1983).
 Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, $\omega = 0,4$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,38±0,01	36,17±0,06	25,83±0,09	5,39±0,03	n.d.	n.d.	3,30±0,02	5,43±0,02
16	2,37±0,04	35,97±0,13	25,50±0,11	5,37±0,05	n.d.	n.d.	3,26±0,04	4,81±0,04
40	2,55±0,01	35,27±0,09	25,58±0,13	5,35±0,06	n.d.	n.d.	3,29±0,02	4,71±0,01
64	2,57±0,04	35,75±0,21	25,64±0,33	5,19±0,03	n.d.	n.d.	3,29±0,03	4,68±0,01
88	2,55±0,04	35,73±0,08	25,64±0,13	5,44±0,02	n.d.	n.d.	3,36±0,04	4,60±0,01
112	2,58±0,06	35,64±0,08	25,68±0,15	5,46±0,09	n.d.	n.d.	3,32±0,05	4,76±0,04

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.31:
 Fermentación en Erlenmeyer *Ps*-SL. Medio de cultivo: medio sintético suplementado según propone Lindegren *et al.* (1958) al 50 %. Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, $\omega = 0,4$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	pH
0	1,39±0,03	39,29±0,01	20,38±0,01	5,51±0,01	n.d.	n.d.	5,45±0,01
16	4,61±0,04	20,98±0,83	n.d.	5,18±0,23	17,77±0,56	n.d.	4,82±0,69
40	5,80±0,03	0,22±0,01	n.d.	5,00±0,01	22,79±0,88	n.d.	4,85±0,01
64	5,96±0,04	n.d.	n.d.	4,61±0,04	19,45±0,97	n.d.	4,79±0,01
88	6,11±0,03	n.d.	n.d.	3,48±0,08	16,25±0,32	n.d.	4,71±0,01
112	6,30±0,02	n.d.	n.d.	1,10±0,09	12,04±0,11	3,71±0,21	4,66±0,01

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.32:

Fermentación en Erlenmeyer *Ps-SF*. Medio de cultivo: medio sintético suplementado según propone Fonseca (2011). Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, $\omega = 0,4$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	pH
0	1,45±0,01	38,89±0,03	19,99±0,03	5,37±0,01	n.d.	n.d.	5,48±0,01
20	4,06±0,04	28,71±0,06	n.d.	5,34±0,01	9,41±0,08	n.d.	4,91±0,01
44	4,98±0,13	18,15±0,09	n.d.	5,24±0,09	9,72±0,03	n.d.	4,66±0,04
68	5,27±0,11	n.d.	n.d.	5,03±0,01	8,49±0,03	n.d.	4,61±0,01
96	5,56±0,18	n.d.	n.d.	4,19±0,02	6,79±0,08	n.d.	4,71±0,02
112	5,70±0,13	n.d.	n.d.	3,49±0,21	6,18±0,05	n.d.	4,72±0,01

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.33:

Fermentación en Erlenmeyer *Ps-SD*. Medio de cultivo: medio sintético suplementado según propone Debus *et al.* (1983). Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, $\omega = 0,4$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	pH
0	1,35±0,02	38,82±0,02	21,75±0,03	5,09±0,03	n.d.	n.d.	5,48±0,01
16	4,86±0,06	17,04±0,37	n.d.	5,05±0,04	13,57±0,02	n.d.	5,29±0,04
40	6,17±0,08	n.d.	n.d.	5,00±0,01	16,86±0,05	n.d.	5,01±0,02
64	6,34±0,08	n.d.	n.d.	4,63±0,02	15,71±0,05	n.d.	4,95±0,05
88	6,49±0,03	n.d.	n.d.	4,51±0,04	13,51±0,06	n.d.	4,91±0,04
112	6,67±0,07	n.d.	n.d.	3,13±0,05	11,47±0,03	n.d.	4,86±0,05

No detectado (n.d.).

AP3.2.2. Plan experimental.

Fermentaciones realizadas en Erlenmeyer con un pH de 5 y agitación de 200 rpm. Las variables a modificar son: concentración inicial de inóculo, aeración y temperatura. Tabla A3.35. El medio de cultivo se compone de hidrolizado de poda sin hoja suplementado según propone Lindegren *et al.* (1958) al 50 %, siguiendo la modificación de Cuevas (2007).

Tabla AP3.34:
Diseño de experimentos proyectado.

Expto.	x_0 , kg m ⁻³	ω	T, °C
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

x_0 (concentración inicial de biomasa: 0,5, 1,5, 2,5 kg m⁻³), ω (aeración, volumen medio/volumen Erlenmeyer: 0,2, 0,4, 0,6), T (temperatura: 25, 30 y 35 °C).

Tabla AP3.35:

Fermentación diseño experimental con *P. stipitis*. Experimento 1.
Condiciones: $x_0 = 0,5$ kg m⁻³, $\omega = 0,2$, T = 25 °C, pH = 5 y A = 200 rpm.

t, h	x, kg m ⁻³	D-xil, kg m ⁻³	D-glu, kg m ⁻³	L-ara, kg m ⁻³	E, kg m ⁻³	Xi, kg m ⁻³	HAc, kg m ⁻³	pH
0	0,50±0,01	30,45±0,18	20,89±0,03	4,53±0,19	n.d.	n.d.	2,06±0,06	4,89±0,03
12	1,70±0,22	29,90±0,18	20,43±0,09	4,74±0,02	n.d.	n.d.	2,10±0,03	4,53±0,03
24	1,88±0,23	29,94±0,11	20,30±0,11	4,72±0,06	n.d.	n.d.	2,08±0,01	4,44±0,13
48	2,37±0,07	30,18±0,53	20,62±0,31	4,69±0,23	n.d.	n.d.	2,02±0,01	4,63±0,11
72	5,03±0,01	27,28±0,11	0,81±0,55	3,60±0,63	7,34±0,23	n.d.	0,96±0,08	4,56±0,02
96	6,53±0,28	10,77±0,37	0,20±0,11	2,86±0,51	15,80±0,19	n.d.	n.d.	4,74±0,02
120	7,18±0,03	0,05±0,06	0,04±0,06	0,78±0,45	13,63±0,34	n.d.	n.d.	4,78±0,12

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.36:
 Fermentación diseño experimental con *P. stipitis*. Experimento 2.
 Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,2$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	2,64±0,07	30,28±0,24	21,15±0,74	4,63±0,17	n.d.	n.d.	1,98±0,07	4,92±0,06
12	3,00±0,03	30,21±0,25	20,94±0,63	4,88±0,13	n.d.	n.d.	2,14±0,11	4,53±0,01
24	3,13±0,01	29,97±0,11	20,83±0,72	4,96±0,08	n.d.	n.d.	2,14±0,14	4,52±0,01
48	3,98±0,02	29,99±0,34	16,66±0,78	4,90±0,01	0,62±0,08	n.d.	2,10±0,14	4,68±0,03
72	5,94±0,05	19,76±1,41	1,09±0,13	5,12±0,16	9,17±0,94	n.d.	0,96±0,06	4,74±0,01
96	6,41±0,05	6,77±1,09	0,09±0,12	2,86±0,51	13,98±0,09	n.d.	nd	4,78±0,02
120	7,58±0,02	0,06±0,08	n.d.	1,02±0,01	12,10±0,49	n.d.	nd	4,88±0,01

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.37:
 Fermentación con *P. stipitis*. Experimento 3.
 Condiciones: $x_0 = 0,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,6$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	0,50±0,01	31,65±0,24	21,69±0,04	5,00±0,01	n.d.	n.d.	2,21±0,08	4,99±0,02
12	1,35±0,03	31,51±0,13	21,51±0,08	5,03±0,02	n.d.	n.d.	2,17±0,06	4,55±0,01
24	1,83±0,13	31,48±0,45	21,46±0,34	5,05±0,07	n.d.	n.d.	2,21±0,06	4,53±0,01
48	2,26±0,08	31,38±0,23	21,07±0,45	5,10±0,03	n.d.	n.d.	2,07±0,09	4,57±0,01
72	2,87±0,03	31,30±0,06	17,56±0,64	5,14±0,05	0,92±0,18	n.d.	1,91±0,03	4,77±0,01
96	3,09±0,01	31,37±0,34	15,50±0,68	5,12±0,11	1,28±0,08	n.d.	1,91±0,04	5,02±0,01
120	3,25±0,01	31,14±0,12	13,24±0,52	5,15±0,08	1,56±0,18	n.d.	1,90±0,04	5,07±0,01
144	3,26±0,08	31,31±0,04	10,20±0,08	5,15±0,04	2,10±0,07	n.d.	1,74±0,06	5,11±0,01

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.38:
 Fermentación con *P. stipitis*. Experimento 4.
 Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,6$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	2,61±0,01	32,25±0,39	22,25±0,15	5,09±0,14	n.d.	n.d.	2,21±0,01	4,83±0,08
12	2,89±0,11	32,15±0,36	22,17±0,06	5,14±0,18	n.d.	n.d.	2,20±0,01	4,56±0,01
24	3,05±0,15	31,81±0,44	21,90±0,32	5,19±0,06	n.d.	n.d.	2,24±0,02	4,54±0,01
48	3,47±0,07	31,89±0,01	21,84±0,12	5,10±0,03	n.d.	n.d.	2,16±0,03	4,68±0,04
72	4,17±0,01	31,50±0,36	18,31±0,36	5,37±0,21	0,92±0,08	n.d.	1,70±0,03	4,80±0,02
96	5,09±0,01	30,33±0,18	7,77±0,34	5,58±0,07	5,80±0,02	n.d.	1,21±0,02	5,02±0,01
120	5,14±0,03	24,09±0,16	n.d.	5,18±0,08	10,93±0,11	n.d.	0,69±0,06	4,91±0,02
144	5,23±0,01	14,78±0,81	n.d.	5,23±0,03	13,51±0,54	n.d.	0,35±0,02	4,98±0,01
168	5,50±0,06	7,00±0,83	n.d.	5,31±0,04	14,31±0,11	n.d.	n.d.	5,07±0,04
192	5,58±0,03	n.d.	n.d.	5,65±0,07	13,89±0,22	n.d.	n.d.	5,05±0,08

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.39:
 Fermentación con *P. stipitis*. Experimento 5.
 Condiciones: $x_0 = 0,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,2$, $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	0,60±0,02	30,61±0,25	20,43±0,42	4,78±0,09	n.d.	n.d.	2,10±0,04	5,16±0,04
12	2,01±0,05	30,79±0,32	20,28±0,11	4,95±0,11	n.d.	n.d.	2,12±0,03	5,23±0,05
24	2,35±0,04	30,87±0,16	20,50±0,07	4,90±0,06	n.d.	n.d.	2,09±0,01	5,18±0,04
48	2,58±0,14	31,03±0,04	21,18±0,23	5,00±0,02	n.d.	n.d.	2,16±0,06	4,97±0,04
72	2,82±0,07	30,72±0,23	20,47±0,04	4,81±0,21	n.d.	n.d.	2,14±0,02	4,89±0,01
96	3,00±0,05	30,70±0,19	20,79±0,14	4,87±0,18	n.d.	n.d.	2,12±0,13	4,78±0,02
120	3,25±0,02	30,86±0,11	20,68±0,18	4,86±0,01	n.d.	n.d.	2,10±0,01	4,80±0,06

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.40:
Fermentación con *P. stipitis*. Experimento 6.
Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,2$, $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	2,60±0,01	30,31±0,18	20,61±0,16	4,83±0,01	n.d.	n.d.	2,11±0,03	5,15±0,02
12	3,72±0,01	30,56±0,13	21,00±0,02	4,78±0,01	n.d.	n.d.	2,08±0,04	5,14±0,02
24	4,05±0,04	30,88±0,01	20,77±0,14	5,00±0,01	n.d.	n.d.	2,10±0,01	5,17±0,04
48	4,29±0,02	31,01±0,01	21,17±0,23	4,94±0,08	n.d.	n.d.	2,09±0,08	5,02±0,01
72	4,43±0,01	30,66±0,14	20,73±0,08	4,83±0,09	n.d.	n.d.	2,10±0,01	4,93±0,08
96	4,68±0,01	30,89±0,01	21,49±0,71	4,96±0,11	n.d.	n.d.	2,17±0,04	4,91±0,02
120	4,72±0,01	30,92±0,07	21,30±0,65	5,01±0,01	n.d.	n.d.	2,12±0,01	4,88±0,02

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.41:
Fermentación con *P. stipitis*. Experimento 7.
Condiciones: $x_0 = 0,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,6$, $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	0,61±0,01	31,47±0,32	21,40±0,18	5,03±0,05	n.d.	n.d.	2,21±0,01	5,16±0,01
12	1,23±0,09	31,33±0,18	21,64±0,04	5,02±0,01	n.d.	n.d.	2,16±0,03	5,13±0,03
24	1,49±0,06	31,31±0,01	21,51±0,08	4,94±0,09	n.d.	n.d.	2,19±0,08	5,20±0,01
48	1,85±0,05	31,65±0,11	21,97±0,03	4,95±0,08	n.d.	n.d.	2,23±0,11	5,22±0,01
72	2,16±0,02	31,71±0,06	21,95±0,08	5,01±0,01	n.d.	n.d.	2,24±0,09	5,18±0,01
96	2,27±0,03	31,38±0,12	21,67±0,31	5,05±0,03	n.d.	n.d.	2,20±0,01	5,22±0,06
120	2,31±0,01	31,38±0,04	21,73±0,08	4,99±0,01	n.d.	n.d.	2,19±0,04	5,13±0,01

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.42:
Fermentación con *P. stipitis*. Experimento 8.
Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,6$, $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	2,57±0,05	31,79±0,83	21,65±0,42	5,09±0,13	n.d.	n.d.	2,22±0,11	5,17±0,02
12	3,00±0,02	31,78±0,49	21,49±0,41	5,07±0,08	n.d.	n.d.	2,22±0,13	5,14±0,01
24	3,24±0,09	31,74±0,34	21,36±0,25	5,06±0,04	n.d.	n.d.	2,28±0,01	5,09±0,11
48	3,52±0,01	31,86±0,06	21,87±0,16	5,08±0,04	n.d.	n.d.	2,34±0,01	5,12±0,01
72	3,85±0,01	31,35±0,02	21,52±0,06	5,02±0,05	n.d.	n.d.	2,34±0,04	5,18±0,01
96	4,00±0,01	31,48±0,33	21,39±0,06	5,09±0,11	n.d.	n.d.	2,26±0,11	5,15±0,01
120	4,00±0,01	31,78±0,15	21,68±0,13	5,07±0,09	n.d.	n.d.	2,31±0,04	5,18±0,01

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.43:
 Fermentación con *P. stipitis*. Experimentos 9, 10 y 11
 Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,47±0,07	33,67±0,31	23,55±0,08	5,50±0,03	n.d.	n.d.	2,42±0,09	4,90±0,09
24	2,42±0,09	33,60±0,38	22,60±0,64	5,56±0,04	n.d.	n.d.	2,42±0,02	4,45±0,02
48	2,98±0,16	32,79±0,73	18,59±0,32	5,69±0,74	1,76±0,33	n.d.	2,42±0,04	4,44±0,04
72	3,68±0,05	24,97±0,96	n.d.	5,45±0,07	12,28±0,36	n.d.	2,43±0,04	4,37±0,04
96	5,08±0,14	7,86±0,31	n.d.	5,59±0,09	12,99±0,17	n.d.	2,19±0,06	4,39±0,06
120	5,93±0,14	2,78±0,34	n.d.	5,56±0,04	12,70±0,15	n.d.	1,76±0,23	4,37±0,23
144	6,24±0,11	n.d.	n.d.	5,70±0,02	10,16±0,64	n.d.	1,05±0,08	4,39±0,03

No detectado (n.d.).

AP3.2.3. Influencia del pH

Tabla AP3.44:
Fermentación con *P. stipitis* - pH 3.
Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 3$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,49±0,01	34,31±0,27	23,57±0,21	5,08±0,05	n.d.	n.d.	2,31±0,02	3,03±0,02
24	1,85±0,03	34,57±0,48	23,86±0,25	5,50±0,08	n.d.	n.d.	2,45±0,13	3,14±0,04
48	1,95±0,02	34,29±0,29	23,44±0,18	5,24±0,04	n.d.	n.d.	2,29±0,22	3,06±0,03
72	2,16±0,02	34,40±0,36	23,30±0,21	5,16±0,05	n.d.	n.d.	2,38±0,06	3,17±0,03
96	2,55±0,02	34,17±0,26	23,24±0,21	5,11±0,05	n.d.	n.d.	2,45±0,05	3,14±0,02
120	2,87±0,03	34,29±0,31	23,47±0,21	5,17±0,05	n.d.	n.d.	2,29±0,02	3,04±0,03
144	2,99±0,03	34,40±0,29	23,34±0,23	5,15±0,04	n.d.	n.d.	2,34±0,03	3,09±0,03

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.45:
Fermentación con *P. stipitis* - pH 4.
Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 4$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,49±0,01	34,31±0,27	23,62±0,21	5,15±0,05	n.d.	n.d.	2,33±0,02	4,05±0,03
24	1,84±0,03	34,62±0,48	23,71±0,25	5,22±0,07	n.d.	n.d.	2,45±0,03	4,15±0,06
48	1,94±0,02	34,57±0,29	23,60±0,18	5,12±0,04	n.d.	n.d.	2,49±0,02	4,14±0,03
72	2,05±0,03	34,45±0,36	23,26±0,21	5,26±0,06	n.d.	n.d.	2,35±0,05	4,18±0,04
96	2,41±0,11	34,41±0,27	23,49±0,37	5,22±0,05	n.d.	n.d.	2,51±0,11	4,14±0,03
120	2,53±0,06	34,71±0,32	23,61±0,22	5,12±0,05	n.d.	n.d.	2,44±0,05	4,14±0,04
144	2,88±0,09	34,48±0,29	23,55±0,21	5,30±0,04	n.d.	n.d.	2,49±0,18	4,09±0,03

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.46:

Tabla A3.40: Fermentación con *P. stipitis* - pH 5.
Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,47±0,07	33,67±0,31	23,55±0,08	5,50±0,03	n.d.	n.d.	2,42±0,09	4,90±0,09
24	2,42±0,09	33,60±0,38	22,60±0,64	5,56±0,04	n.d.	n.d.	2,42±0,02	4,45±0,02
48	2,98±0,16	32,79±0,73	18,59±0,32	5,69±0,74	1,76±0,33	n.d.	2,42±0,04	4,44±0,04
72	3,68±0,05	24,97±0,96	n.d.	5,45±0,07	12,28±0,36	n.d.	2,43±0,04	4,37±0,04
96	5,08±0,14	7,86±0,31	n.d.	5,59±0,09	12,99±0,17	n.d.	2,19±0,06	4,39±0,06
120	5,93±0,14	2,78±0,34	n.d.	5,56±0,04	12,70±0,15	n.d.	1,76±0,23	4,37±0,23
144	6,24±0,11	n.d.	n.d.	5,70±0,02	10,16±0,64	n.d.	1,05±0,08	4,39±0,03

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.47:

Tabla A3.40: Fermentación con *P. stipitis* - pH 5,5.
Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,50±0,01	34,49±0,27	23,72±0,17	5,14±0,04	n.d.	n.d.	2,36±0,02	5,45±0,03
24	1,97±0,03	34,81±0,51	22,48±0,25	5,43±0,12	n.d.	n.d.	2,53±0,04	5,24±0,04
48	2,65±0,03	33,85±0,73	18,81±0,13	5,37±0,12	1,11±0,01	n.d.	2,66±0,12	5,08±0,06
72	5,12±0,08	26,62±0,45	n.d.	5,74±0,16	10,80±0,17	n.d.	1,79±0,02	5,34±0,05
96	6,06±0,05	7,69±0,12	n.d.	5,55±0,31	11,74±0,37	n.d.	0,91±0,02	5,90±0,09
120	6,23±0,06	2,47±0,02	n.d.	5,84±0,39	13,08±0,62	n.d.	0,22±0,01	6,28±0,14
144	6,41±0,08	n.d.	n.d.	5,64±0,17	8,70±0,13	n.d.	n.d.	6,05±0,05

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.48:

Tabla A3.41: Fermentación con *P. stipitis* - pH 6.
Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,51±0,02	34,40±0,29	23,70±0,35	5,91±0,08	n.d.	n.d.	2,38±0,02	6,07±0,05
24	2,31±0,07	34,43±0,77	23,34±0,51	5,75±0,12	n.d.	n.d.	2,28±0,04	6,19±0,11
48	3,72±0,05	32,76±0,51	15,08±0,63	5,73±0,04	2,48±0,04	n.d.	2,07±0,03	6,36±0,09
72	5,95±0,13	28,58±0,64	n.d.	6,25±0,22	9,29±0,21	n.d.	1,77±0,02	6,47±0,05
96	6,48±0,11	11,70±0,16	n.d.	6,03±0,05	11,77±0,12	n.d.	0,71±0,02	6,78±0,15
120	7,04±0,15	n.d.	n.d.	5,96±0,13	15,73±0,13	n.d.	n.d.	6,97±0,21
144	7,29±0,11	n.d.	n.d.	5,99±0,29	11,68±0,18	n.d.	n.d.	7,02±0,06

No detectado (n.d.).

AP3.2.4. Influencia de la concentración inicial de inóculo.

Tabla AP3.49:
 Fermentación con *P. stipitis* - $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$.
 Condiciones: $x_0 = 1,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$ y agitación 200 rpm.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	1,50±0,01	34,49±0,27	23,72±0,17	5,14±0,04	n.d.	n.d.	2,36±0,02	5,45±0,03
24	1,97±0,03	34,81±0,51	22,48±0,25	5,43±0,12	n.d.	n.d.	2,53±0,04	5,24±0,04
48	2,65±0,03	33,85±0,73	18,81±0,13	5,37±0,14	1,10±0,01	n.d.	2,66±0,12	5,08±0,06
72	5,12±0,08	25,60±0,43	n.d.	5,74±0,17	10,80±0,17	n.d.	1,79±0,02	5,34±0,05
96	6,06±0,05	7,69±0,12	n.d.	5,55±0,31	11,74±0,37	n.d.	0,91±0,02	5,90±0,09
120	6,11±0,06	2,47±0,02	n.d.	5,84±0,39	13,08±0,62	n.d.	0,22±0,01	6,28±0,14
144	6,41±0,08	n.d.	n.d.	5,64±0,17	8,70±0,13	n.d.	n.d.	6,05±0,05

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.50:
 Fermentación con *P. stipitis* - $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$.
 Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$ y A = 200 rpm.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	2,52±0,04	34,09±0,17	23,10±0,05	5,35±0,04	n.d.	n.d.	2,38±0,02	5,51±0,03
24	3,11±0,01	33,97±0,12	22,34±0,32	5,68±0,02	0,21±0,11	n.d.	2,35±0,08	5,17±0,04
48	4,03±0,06	32,27±0,41	14,24±0,45	5,72±0,38	4,92±0,13	n.d.	2,00±0,01	5,32±0,06
72	5,80±0,02	16,73±0,58	n.d.	5,78±0,02	14,21±0,31	n.d.	1,64±0,11	5,78±0,04
96	6,07±0,04	5,55±0,81	n.d.	5,68±0,27	15,95±0,11	n.d.	0,79±0,04	5,99±0,09
120	6,39±0,03	n.d.	n.d.	5,84±0,04	13,65±0,12	n.d.	n.d.	6,18±0,23
144	6,43±0,05	n.d.	n.d.	5,95±0,04	10,60±0,86	n.d.	n.d.	6,35±0,55

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.51:
 Fermentación con *P. stipitis*, $x_0 = 3,5 \text{ kg m}^{-3}$.
 Condiciones: $x_0 = 3,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	3,52±0,04	34,37±0,23	23,37±0,17	5,53±0,04	n.d.	n.d.	2,33±0,01	5,32±0,02
24	4,88±0,04	34,00±0,07	22,21±0,13	5,60±0,03	0,87±0,12	n.d.	2,44±0,01	5,23±0,28
48	5,67±0,06	29,43±0,57	16,26±0,83	6,14±0,57	9,13±0,21	n.d.	1,60±0,04	5,25±0,31
72	6,19±0,06	8,29±0,23	n.d.	5,91±0,06	15,62±0,21	n.d.	0,62±0,05	5,39±0,34
96	6,28±0,09	n.d.	n.d.	5,31±0,43	16,64±0,14	n.d.	n.d.	5,17±0,01
120	6,37±0,14	n.d.	n.d.	5,58±0,21	14,53±0,02	n.d.	n.d.	5,44±0,33
144	6,51±0,06	n.d.	n.d.	4,77±0,31	10,22±0,14	n.d.	n.d.	5,65±0,31

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.52:
 Fermentación con *P. stipitis*, $x_0 = 5 \text{ kg m}^{-3}$.
 Condiciones: $x_0 = 5 \text{ kg m}^{-3}$, $\omega = 0,4$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$ y $A = 200 \text{ rpm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	5,00±0,03	34,43±0,13	23,45±0,12	5,42±0,01	n.d.	n.d.	2,34±0,01	5,36±0,08
24	5,59±0,03	33,74±0,18	18,82±0,41	5,69±0,02	1,21±0,04	n.d.	1,77±0,06	5,53±0,04
48	6,06±0,04	25,41±1,29	n.d.	5,91±0,21	10,67±0,52	n.d.	1,09±0,07	5,64±0,03
72	6,22±0,02	1,52±0,18	n.d.	5,75±0,22	16,88±0,07	n.d.	0,18±0,04	6,15±0,24
96	6,29±0,03	n.d.	n.d.	6,01±0,28	15,34±0,11	n.d.	n.d.	6,58±0,18
120	6,37±0,03	n.d.	n.d.	5,98±0,06	14,63±0,08	n.d.	n.d.	6,71±0,02
144	6,48±0,05	n.d.	n.d.	6,05±0,23	10,03±0,12	n.d.	n.d.	6,51±0,05

No detectado (n.d.).

AP3.3. Fermentaciones en condiciones controladas con *C. guilliermondii*.

Fermentaciones realizadas en el Dpto. de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén. Equipo utilizado: Fermentador tipo tanque agitado (Figura 4.5).

AP3.3.1. Utilizando hidrolizado de poda de olivar sin hoja

Fermentaciones con hidrolizado de poda de olivar sin hoja, suplementado según propone Lindegren *et al.* (1958) al 50 % Cuevas (2007).

Tabla AP3.53:

Fermentación en biorreactor tipo tanque agitado con *C. guilliermondii*.
Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, pH = 5,5, T = 30 °C y A = 350 rpm. AE = 0,0 vvm.

t, h	x, kg m ⁻³	D-xil, kg m ⁻³	D-glu, kg m ⁻³	L-ara, kg m ⁻³	E, kg m ⁻³	Xi, kg m ⁻³	HAc, kg m ⁻³	pH
0	2,47	31,96	24,20	8,46	n.d.	n.d.	3,58	5,57
2	2,71	31,72	23,08	8,48	n.d.	n.d.	3,56	5,54
5	2,85	31,82	19,98	8,80	0,32	n.d.	3,66	5,52
10	2,99	31,74	15,34	8,60	1,38	n.d.	3,74	5,52
15	3,11	31,66	9,67	8,14	3,84	n.d.	3,84	5,51
20	3,22	29,82	4,89	8,18	6,72	0,64	3,94	5,52
25	3,33	26,06	0,56	8,52	10,44	2,18	3,66	5,50
29	3,37	24,60	n.d.	8,82	12,85	3,24	3,62	5,54
34	3,42	22,80	n.d.	8,40	12,84	4,33	3,82	5,56
39	3,47	19,82	n.d.	8,64	12,29	6,35	3,80	5,54
44	3,54	18,68	n.d.	8,80	11,78	6,97	3,62	5,53
51	3,57	18,64	n.d.	8,56	11,60	7,78	3,74	5,52
65	3,63	18,42	n.d.	8,58	11,54	7,82	3,90	5,53
75	3,65	18,40	n.d.	8,14	11,23	7,94	3,48	5,57
89	3,73	18,00	n.d.	8,44	11,12	8,63	4,30	5,58
99	3,70	17,18	n.d.	8,38	11,50	9,46	4,30	5,55
112	3,72	16,68	n.d.	8,44	11,40	9,67	4,26	5,55
141	3,70	14,88	n.d.	8,54	11,10	9,94	4,36	5,53
165	3,69	14,02	n.d.	8,68	10,90	10,42	4,36	5,54
188	3,69	12,86	n.d.	8,72	10,26	11,06	4,62	5,55

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.54:
 Fermentación en biorreactor tipo tanque agitado con *C. guilliermondii*.
 Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, pH = 5,5, T = 30 °C y A = 350 rpm. AE = 0,15 vvm.

t, h	x, kg m ⁻³	D-xil, kg m ⁻³	D-glu, kg m ⁻³	L-ara, kg m ⁻³	E, kg m ⁻³	Xi, kg m ⁻³	HAc, kg m ⁻³	pH
0,0	2,48	32,86	24,39	8,54	n.d.	n.d.	3,68	5,63
2,0	2,78	32,58	23,12	8,47	n.d.	n.d.	3,73	5,57
4,0	3,02	32,82	21,46	8,51	0,87	n.d.	3,78	5,48
6,0	3,26	32,71	18,32	8,19	2,04	n.d.	3,81	5,42
12,5	3,74	29,53	4,98	8,32	9,96	1,23	3,91	5,37
20,0	3,91	24,78	0,76	8,46	14,42	3,34	3,99	5,26
23,0	4,14	21,86	0,44	8,28	14,37	5,47	4,12	5,13
29,0	4,33	16,43	0,18	7,98	13,89	8,32	4,19	5,08
32,0	4,47	15,21	n.d.	8,36	13,92	9,59	4,29	5,16
36,0	4,57	13,97	n.d.	8,19	13,83	10,91	4,37	5,21
44,0	4,72	12,43	n.d.	8,21	13,49	12,13	4,44	5,28
48,0	4,79	10,15	n.d.	8,57	12,87	14,12	4,52	5,36
52,0	4,74	9,67	n.d.	8,42	12,45	14,57	4,67	5,36
55,5	4,69	8,32	n.d.	8,32	11,23	15,34	4,73	5,36
61,0	4,78	6,19	n.d.	7,99	10,64	16,02	4,87	5,45
69,5	4,69	4,31	n.d.	8,43	9,81	16,93	4,96	5,47
80,0	4,73	1,76	n.d.	8,24	8,43	17,79	5,09	5,55
95,5	4,81	0,90	n.d.	8,12	8,24	18,27	5,14	5,49
105,0	4,76	0,45	n.d.	8,37	7,93	18,32	5,21	5,45

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.55:
 Fermentación en biorreactor tipo tanque agitado con *C. guilliermondii*.
 Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH} = 5,5$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ y $A = 350 \text{ rpm}$. $\text{AE} = 0,30 \text{ vvm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	2,49	32,43	24,43	8,47	n.d.	n.d.	3,54	5,53
2	2,82	32,36	22,17	8,39	0,46	n.d.	3,59	5,48
4	3,14	31,02	18,79	8,43	2,48	n.d.	3,64	5,33
6	3,32	30,32	14,45	8,55	4,33	0,88	3,69	5,27
12,5	3,78	26,34	2,34	8,32	10,32	2,72	3,73	5,13
20	4,29	23,68	0,34	8,46	12,35	4,26	3,81	5,02
23	4,38	22,62	n.d.	8,48	12,56	4,94	3,84	5,05
29	4,83	13,34	n.d.	8,39	12,32	9,13	3,92	5,07
32	5,06	13,02	n.d.	8,57	11,88	9,34	3,99	5,04
36	5,14	11,27	n.d.	8,24	11,24	10,47	4,12	5,02
44	5,18	9,72	n.d.	8,62	10,93	11,62	4,24	5,10
48	5,16	7,23	n.d.	8,39	10,37	12,76	4,36	5,18
52	5,13	5,17	n.d.	8,65	10,03	13,79	4,49	5,31
55,5	5,19	4,39	n.d.	8,47	9,71	14,76	4,56	5,38
61	5,16	2,67	n.d.	8,32	9,04	15,93	4,63	5,44
69,5	5,18	1,46	n.d.	8,76	7,45	16,68	4,74	5,45
80	5,22	0,98	n.d.	8,83	6,32	16,84	4,86	5,43
95,5	5,17	0,43	n.d.	8,65	5,84	17,09	4,97	5,48
105	5,19	0,32	n.d.	8,73	5,46	16,94	5,06	5,52

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.56:
 Fermentación en biorreactor tipo tanque agitado con *C. guilliermondii*.
 Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, pH = 5,5, T = 30 °C y A = 350 rpm. AE = 0,60 vvm.

t, h	x, kg m ⁻³	D-xil, kg m ⁻³	D-glu, kg m ⁻³	L-ara, kg m ⁻³	E, kg m ⁻³	Xi, kg m ⁻³	HAc, kg m ⁻³	pH
0	2,47	31,98	24,18	8,42	n.d.	n.d.	3,62	5,65
2	3,19	30,28	21,14	8,56	0,66	n.d.	3,60	5,48
5	4,09	28,52	16,38	8,38	2,54	n.d.	3,06	5,43
10	5,14	26,42	3,72	8,86	7,03	0,00	3,10	5,32
15	5,59	21,94	0,12	8,24	9,96	2,04	3,38	5,28
20	5,61	18,18	n.d.	7,46	9,93	3,60	3,64	5,22
25	5,66	13,84	n.d.	7,60	9,70	5,84	3,52	5,12
29	5,70	12,12	n.d.	7,46	9,10	7,10	3,68	5,06
34	5,72	9,64	n.d.	7,18	8,28	8,61	4,42	5,02
39	5,74	8,24	n.d.	7,24	8,38	9,01	5,42	5,00
44	5,81	5,92	n.d.	7,04	8,28	9,46	4,72	5,07
51	5,96	4,32	n.d.	7,04	7,54	9,74	5,10	5,17
65	6,12	2,08	n.d.	7,60	6,06	9,79	4,70	5,14
75	6,47	1,02	n.d.	7,22	5,10	9,83	4,42	5,22
89	6,80	0,10	n.d.	7,56	4,34	9,82	4,58	5,14

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.57:
 Fermentación en biorreactor tipo tanque agitado con *C. guilliermondii*.
 Condiciones: $x_0 = 0,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH} = 5,5$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ y $A = 350 \text{ rpm}$. $\text{AE} = 0,00 \text{ vvm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	0,48	32,43	23,97	8,39	n.d.	n.d.	3,52	5,59
2	0,55	32,17	23,49	8,53	n.d.	n.d.	3,58	5,53
5	0,84	32,41	20,52	8,24	0,32	n.d.	3,59	5,49
10	1,39	32,35	16,03	8,46	2,34	n.d.	3,64	5,52
15	2,04	32,29	10,23	8,27	4,54	n.d.	3,68	5,58
20	2,51	30,56	5,11	8,32	6,76	0,43	3,75	5,54
25	2,67	28,14	1,98	8,24	8,87	2,02	3,74	5,51
29	2,73	26,31	0,54	8,23	11,09	3,23	3,79	5,57
34	2,84	23,98	n.d.	8,36	13,35	4,71	3,81	5,55
39	2,89	22,32	n.d.	8,41	13,22	5,63	3,86	5,58
44	2,92	20,76	n.d.	8,38	12,94	6,73	3,78	5,56
51	2,94	19,54	n.d.	8,41	12,56	7,34	3,82	5,55
65	2,93	18,98	n.d.	8,34	11,83	7,78	3,86	5,58
75	2,96	18,46	n.d.	8,52	11,76	8,04	3,93	5,61
89	3,02	18,03	n.d.	8,26	11,54	8,45	3,97	5,54
99	3,08	17,65	n.d.	8,32	11,69	8,78	4,04	5,59
112	3,09	17,12	n.d.	8,29	11,34	9,01	4,12	5,52
141	3,14	15,36	n.d.	8,31	11,67	10,37	4,09	5,56
165	3,16	14,76	n.d.	8,26	11,39	10,65	4,14	5,52
188	3,15	14,31	n.d.	8,35	11,42	10,78	4,17	5,57

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.58:
 Fermentación en biorreactor tipo tanque agitado con *C. guilliermondii*.
 Condiciones: $x_0 = 0,5 \text{ kg m}^{-3}$, pH = 5,5, T = 30 °C y A = 350 rpm. AE = 0,15 vvm.

t, h	x, kg m ⁻³	D-xil, kg m ⁻³	D-glu, kg m ⁻³	L-ara, kg m ⁻³	E, kg m ⁻³	Xi, kg m ⁻³	HAc, kg m ⁻³	pH
0,0	0,49	35,08	24,52	8,82	n.d.	n.d.	4,36	5,69
2,0	0,62	34,76	24,40	8,86	n.d.	n.d.	4,42	5,63
4,0	1,12	34,26	22,78	8,76	0,70	n.d.	4,48	5,58
6,0	1,43	34,06	20,64	8,94	1,97	n.d.	4,66	5,51
12,5	3,18	30,44	4,44	8,90	10,32	n.d.	4,76	5,43
20,0	3,87	25,48	1,04	8,10	14,06	2,56	4,86	5,32
23,0	4,12	22,62	0,32	7,98	13,83	3,50	4,94	5,21
29,0	4,27	17,16	n.d.	8,52	13,01	6,00	4,78	5,14
32,0	4,35	16,44	n.d.	8,18	12,65	6,38	4,80	5,08
36,0	4,38	15,18	n.d.	8,14	12,20	8,02	4,88	5,05
44,0	4,41	13,62	n.d.	7,92	11,32	9,67	5,08	5,02
48,0	4,39	12,43	n.d.	7,98	11,10	10,52	5,10	5,12
52,0	4,44	11,48	n.d.	7,94	10,90	11,98	5,40	5,27
55,5	4,47	10,03	n.d.	7,84	10,12	12,66	5,14	5,33
61,0	4,44	8,93	n.d.	7,80	10,10	13,83	5,36	5,29
69,5	4,48	5,94	n.d.	7,92	9,38	15,53	5,64	5,42
80,0	4,46	2,70	n.d.	7,64	7,86	17,31	5,66	5,35
95,5	4,43	1,60	n.d.	8,20	7,14	17,82	6,52	5,33
105,0	4,47	1,00	n.d.	8,16	7,00	17,97	6,52	5,46

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.59:
 Fermentación en biorreactor tipo tanque agitado con *C. guilliermondii*.
 Condiciones: $x_0 = 0,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH} = 5,5$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ y $A = 350 \text{ rpm}$. $\text{AE} = 0,30 \text{ vvm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0,0	0,48	35,62	24,36	8,86	n.d.	n.d.	4,00	5,62
2,0	0,66	35,54	23,76	8,82	n.d.	n.d.	4,40	5,54
4,0	1,09	34,52	19,96	8,90	1,80	n.d.	4,52	5,49
6,0	1,69	33,40	14,78	8,84	4,14	n.d.	4,56	5,50
8,0	2,49	31,30	7,20	8,82	7,33	0,26	4,72	5,48
12,5	3,49	26,98	1,28	8,24	10,61	1,16	4,74	5,43
20,0	4,07	23,03	0,24	8,28	12,67	3,45	4,84	5,51
23,0	4,24	19,74	n.d.	8,02	12,85	5,12	4,88	5,57
26,0	4,46	15,14	n.d.	8,32	12,82	6,80	4,64	5,61
29,0	4,54	13,54	n.d.	8,24	12,58	7,72	4,70	5,69
32,0	4,69	13,00	n.d.	8,14	12,42	8,98	4,78	5,74
36,0	4,93	11,40	n.d.	7,92	12,38	9,85	4,74	5,77
44,0	5,15	9,48	n.d.	7,80	12,28	11,12	5,04	5,79
48,0	5,29	7,50	n.d.	7,70	12,04	12,56	5,08	5,81
52,0	5,33	7,26	n.d.	7,80	12,02	13,41	5,34	5,79
55,5	5,36	5,78	n.d.	7,78	11,98	13,72	5,46	5,82
61,0	5,38	4,28	n.d.	7,72	11,94	14,86	5,38	5,76
69,5	5,37	2,86	n.d.	7,98	11,38	15,63	5,80	5,73
80,0	5,39	1,16	n.d.	7,80	10,68	15,98	5,90	5,77

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.60:
 Fermentación en biorreactor tipo tanque agitado con *C. guilliermondii*.
 Condiciones: $x_0 = 0,5 \text{ kg m}^{-3}$, pH = 5,5, T = 30 °C y A = 350 rpm. AE = 0,60 vvm.

t, h	x, kg m ⁻³	D-xil, kg m ⁻³	D-glu, kg m ⁻³	L-ara, kg m ⁻³	E, kg m ⁻³	Xi, kg m ⁻³	HAc, kg m ⁻³	pH
0	0,49	32,47	24,41	8,42	n.d.	n.d.	3,62	5,65
2	0,99	31,04	22,34	8,56	n.d.	n.d.	3,60	5,48
5	2,12	29,33	18,42	8,38	1,61	n.d.	3,06	5,43
10	4,93	26,67	6,12	8,86	6,65	1,49	3,10	5,32
15	5,43	22,53	2,33	8,24	8,94	3,02	3,38	5,28
20	5,67	19,89	n.d.	7,46	10,14	4,26	3,64	5,22
25	5,81	15,63	n.d.	7,60	10,18	5,82	3,52	5,12
29	6,03	11,32	n.d.	7,46	10,07	7,51	3,68	5,06
34	6,27	10,04	n.d.	7,18	9,27	8,32	4,42	5,02
39	6,41	9,23	n.d.	7,24	8,73	8,76	5,42	5,00
44	6,43	7,69	n.d.	7,04	8,04	9,11	4,72	5,07
51	6,44	6,07	n.d.	7,04	7,52	9,92	5,10	5,17
65	6,42	3,52	n.d.	7,60	6,31	10,63	4,70	5,14
75	6,39	1,64	n.d.	7,22	5,02	11,04	4,42	5,12
89	6,43	0,10	n.d.	7,56	3,99	11,27	4,58	5,17

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.61:
 Fermentación en biorreactor tipo tanque agitado con *C. guilliermondii*.
 Condiciones: $x_0 = 0,025 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH} = 5,5$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ y $A = 350 \text{ rpm}$. $\text{AE} = 0,15 \text{ vvm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0,0	0,02	32,30	26,94	7,72	n.d.	n.d.	3,80	5,66
2,5	0,11	32,16	26,92	7,80	n.d.	n.d.	3,86	5,64
5,0	0,37	32,22	26,08	7,78	n.d.	n.d.	3,88	5,59
7,5	0,78	32,24	24,18	8,04	0,54	n.d.	3,94	5,58
12,5	1,83	31,40	12,36	8,12	5,04	n.d.	3,92	5,50
19,0	2,91	26,80	0,24	7,94	10,98	1,33	3,96	5,43
21,0	3,25	26,74	0,26	7,82	10,86	1,43	4,00	5,36
24,0	3,59	25,80	n.d.	7,80	10,56	2,09	4,12	5,34
26,0	3,67	25,20	n.d.	7,70	10,22	2,31	4,08	5,33
28,5	3,69	25,04	n.d.	7,72	9,86	2,42	4,20	5,30
31,0	3,69	24,12	n.d.	7,86	9,74	2,99	4,44	5,29
42,0	3,81	22,30	n.d.	7,86	8,88	4,18	4,62	5,17
48,0	3,82	21,70	n.d.	8,04	8,56	4,62	4,92	5,06
50,0	3,87	21,40	n.d.	8,01	8,50	4,59	4,95	5,05
55,0	3,99	21,00	n.d.	7,98	8,34	4,68	4,80	5,04
65,0	4,10	17,60	n.d.	8,30	8,40	6,31	5,12	5,03
71,0	4,23	15,86	n.d.	8,38	8,46	6,65	5,48	5,02
78,0	4,41	15,18	n.d.	8,66	8,24	7,33	5,92	5,03
90,5	4,62	13,38	n.d.	8,40	7,12	7,62	5,60	5,01
93,0	4,64	12,74	n.d.	8,64	6,86	7,74	5,90	5,03
103,0	4,85	11,70	n.d.	8,84	6,16	8,36	6,18	5,02
123,0	4,80	8,72	n.d.	8,98	4,82	9,86	6,30	5,04
142,0	4,87	6,62	n.d.	9,20	4,56	11,04	7,06	5,03
166,0	4,82	4,50	n.d.	9,58	3,70	11,17	7,48	5,03

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.62:
 Fermentación en biorreactor tipo tanque agitado con *C. guilliermondii*.
 Condiciones: $x_0 = 0,05 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH} = 5,5$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ y $A = 350 \text{ rpm}$. $\text{AE} = 0,30 \text{ vvm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0,0	0,06	32,40	27,00	7,60	n.d.	n.d.	3,82	5,59
2,5	0,21	32,38	26,98	7,58	n.d.	n.d.	3,88	5,57
5,0	0,47	32,36	26,30	7,88	n.d.	n.d.	3,94	5,54
7,5	0,89	32,31	23,00	7,78	1,22	n.d.	3,96	5,51
12,5	1,76	31,96	8,72	8,12	6,45	n.d.	3,92	5,47
19,0	2,83	27,84	0,24	7,94	10,80	1,24	3,96	5,46
21,0	3,06	27,12	n.d.	7,64	10,58	1,56	4,18	5,41
24,0	3,41	26,22	n.d.	7,62	10,49	1,96	4,26	5,37
26,0	3,51	25,80	n.d.	7,66	10,32	2,34	4,36	5,26
28,5	3,61	25,14	n.d.	7,66	9,97	2,60	4,44	5,24
31,0	3,69	23,72	n.d.	7,70	9,64	2,94	4,56	5,21
42,0	3,78	21,06	n.d.	7,88	8,68	4,06	4,92	5,19
48,0	3,80	19,77	n.d.	8,00	8,12	4,60	5,12	5,17
50,0	3,85	19,15	n.d.	8,00	7,99	4,74	5,19	5,12
55,0	3,95	17,54	n.d.	7,88	8,00	5,22	5,30	5,06
65,0	4,22	14,86	n.d.	8,24	8,00	5,42	5,70	5,05
71,0	4,42	13,34	n.d.	8,34	7,80	5,87	5,78	5,06
78,0	4,56	12,06	n.d.	8,36	7,70	6,34	5,88	5,06
90,5	4,64	10,34	n.d.	8,50	6,78	7,28	6,24	5,08
93,0	4,69	10,02	n.d.	8,52	6,72	7,41	6,24	5,07
103,0	4,80	8,78	n.d.	8,78	6,00	8,44	6,54	5,03
123,0	4,82	6,48	n.d.	9,00	4,96	9,46	7,16	5,09
142,0	4,88	5,26	n.d.	8,92	4,04	9,89	7,66	5,04
166,0	4,86	3,66	n.d.	9,54	2,94	10,36	8,14	5,06

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.63:
 Fermentación en biorreactor tipo tanque agitado con *C. guilliermondii*.
 Condiciones: $x_0 = 0,1 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH} = 5,5$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ y $A = 350 \text{ rpm}$. $\text{AE} = 0,00 \text{ vvm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0,0	0,11	34,00	24,60	10,50	n.d.	n.d.	4,42	5,62
2,0	0,51	33,84	24,40	9,16	n.d.	n.d.	4,50	5,58
4,0	0,78	33,96	23,08	8,58	n.d.	n.d.	4,08	5,59
6,0	1,20	33,80	22,12	8,80	0,35	n.d.	4,28	5,58
12,5	1,91	33,78	19,90	8,44	1,92	n.d.	4,82	5,56
20,0	2,15	32,28	13,10	8,12	5,23	0,77	4,92	5,55
23,0	2,18	31,68	10,22	8,40	6,02	1,24	4,92	5,56
26,0	2,23	31,06	4,98	9,90	8,91	1,58	4,70	5,55
29,0	2,39	28,86	3,25	9,56	10,17	2,63	4,68	5,53
32,0	2,48	27,34	1,78	9,18	11,62	3,67	4,78	5,54
36,0	2,56	26,12	0,56	8,76	12,75	4,56	4,66	5,52
44,0	2,59	25,06	n.d.	8,96	13,59	5,62	4,76	5,53
48,0	2,63	24,68	n.d.	8,88	13,52	6,14	4,74	5,55
52,0	2,66	24,26	n.d.	8,72	13,64	6,39	5,12	5,53
55,5	2,70	24,04	n.d.	8,58	13,58	6,53	4,94	5,56
95,0	2,72	22,44	n.d.	9,08	13,02	7,49	5,22	5,55
119,0	2,75	20,28	n.d.	9,24	12,56	9,18	5,26	5,56
142,0	2,73	18,86	n.d.	9,38	12,08	9,94	5,38	5,54
168,0	2,70	18,70	n.d.	9,74	12,40	10,27	5,82	5,57
192,0	2,74	15,24	n.d.	9,82	11,56	12,66	5,94	5,53
214,5	2,76	14,34	n.d.	9,96	11,50	13,28	6,12	5,56
269,5	2,73	11,02	n.d.	10,52	11,28	14,46	6,64	5,52
288,0	2,72	9,44	n.d.	10,52	10,60	14,92	6,72	5,54
310,0	2,74	8,90	n.d.	10,92	10,48	15,36	7,06	5,53

No detectado (n.d.).

AP3.3.2. Utilizando hidrolizado de poda de olivar completa

Fermentaciones con hidrolizado de poda de olivar completa, suplementado según propone Lindegren *et al.* (1958) al 50 % Cuevas (2007).

Tabla AP3.64:
 Fermentación en biorreactor tipo tanque agitado con *C. guilliermondii*.
 Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH} = 5,5$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ y $A = 350 \text{ rpm}$. $\text{AE} = 0,0 \text{ vvm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0,0	2,41	25,64	27,54	14,24	n.d.	n.d.	3,94	5,59
2,0	2,75	25,56	27,34	14,14	n.d.	n.d.	4,10	5,54
4,0	2,90	25,12	23,24	14,12	1,76	n.d.	4,22	5,51
6,0	3,08	24,36	18,38	14,06	4,30	0,45	4,20	5,52
8,0	3,22	23,96	13,08	14,22	6,64	0,85	4,42	5,50
12,5	3,36	21,32	1,12	14,10	12,67	2,34	4,42	5,49
20,0	3,51	17,16	0,45	14,05	15,06	4,56	4,56	5,50
23,0	3,51	15,72	0,32	14,08	15,36	5,48	4,48	5,48
26,0	3,57	13,48	n.d.	14,24	15,30	6,32	4,36	5,47
29,0	3,59	13,28	n.d.	14,21	15,25	6,72	4,24	5,45
32,0	3,65	13,22	n.d.	13,86	15,10	6,82	4,28	5,43
36,0	3,74	13,12	n.d.	14,21	15,22	6,94	4,30	5,42
44,0	3,85	13,08	n.d.	14,54	15,04	6,83	4,46	5,34
48,0	3,88	13,00	n.d.	14,42	14,84	7,09	4,36	5,35
52,0	3,89	12,94	n.d.	14,23	15,20	6,89	4,72	5,36
55,5	3,89	12,24	n.d.	14,45	15,04	7,05	4,60	5,39
95,0	3,90	10,02	n.d.	14,23	14,82	8,43	4,66	5,43
119,0	3,89	7,60	n.d.	14,54	14,56	9,87	4,76	5,48
142,0	3,89	5,94	n.d.	14,31	14,96	11,02	4,94	5,49
168,0	3,91	5,90	n.d.	14,21	15,16	11,24	5,34	5,48
192,0	3,90	4,08	n.d.	14,02	14,54	12,22	5,26	5,47
214,5	3,89	3,96	n.d.	14,26	14,38	11,94	5,52	5,46
269,5	3,88	2,62	n.d.	14,46	14,32	12,98	5,80	5,48
288,0	3,90	2,28	n.d.	14,50	13,90	13,26	5,78	5,45
310,0	3,89	2,12	n.d.	14,68	13,66	13,08	6,02	5,44

No detectado (n.d.).

Tabla AP3.65:
 Fermentación en biorreactor tipo tanque agitado con *C. guilliermondii*.
 Condiciones: $x_0 = 2,5 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH} = 5,5$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ y $A = 350 \text{ rpm}$. $\text{AE} = 0,30 \text{ vvm}$.

t, h	x, kg m^{-3}	D-xil, kg m^{-3}	D-glu, kg m^{-3}	L-ara, kg m^{-3}	E, kg m^{-3}	Xi, kg m^{-3}	HAc, kg m^{-3}	pH
0	2,40	24,60	27,58	14,02	n.d.	n.d.	3,76	5,56
2	2,87	24,40	25,22	14,00	n.d.	n.d.	3,80	5,50
5	3,36	24,24	20,44	14,06	1,82	n.d.	3,94	5,33
10	4,04	21,00	1,70	14,10	11,54	1,39	3,86	5,30
15	4,37	17,34	0,70	12,54	14,87	3,56	4,02	5,23
20	4,52	13,00	0,23	11,36	14,94	5,92	4,74	5,14
25	4,60	10,86	n.d.	11,30	13,37	7,08	4,48	5,08
29	4,72	10,08	n.d.	11,24	12,24	7,62	4,72	5,00
34	4,86	8,98	n.d.	11,40	11,06	8,34	4,72	5,00
39	5,05	6,72	n.d.	11,10	10,62	9,27	5,42	4,96
44	5,13	4,48	n.d.	10,68	10,46	10,02	5,44	4,91
51	5,14	3,10	n.d.	10,42	9,86	11,20	5,74	5,02
65	5,18	1,76	n.d.	10,94	9,10	11,41	6,38	5,01
75	5,29	0,88	n.d.	10,50	7,92	12,28	6,38	4,99
89	5,44	0,00	n.d.	10,94	6,74	13,00	5,92	5,02

No detectado (n.d.).

