

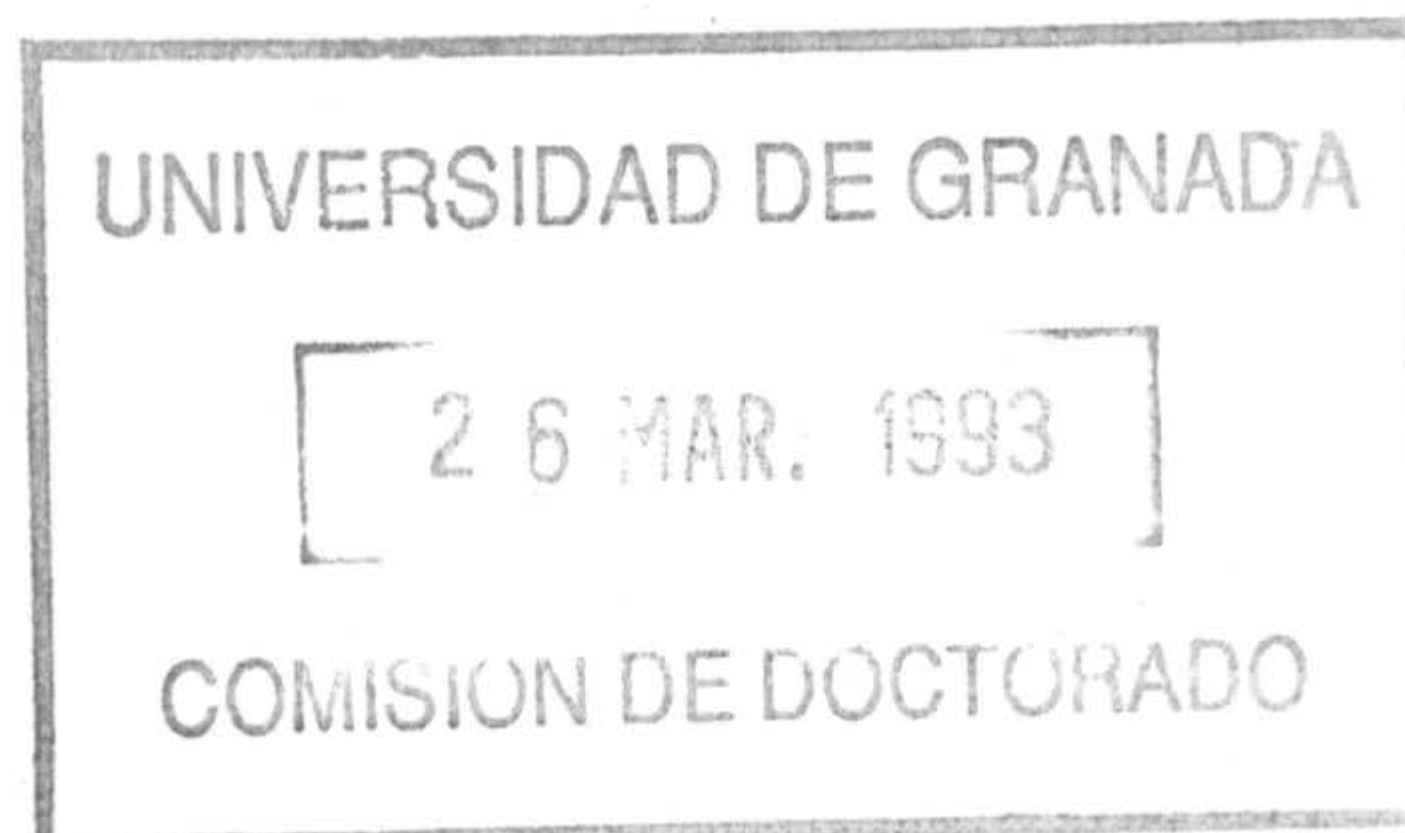
UNIVERSIDAD DE GRANADA

CAMPUS UNIVESITARIO DE JAÉN

Departamento de Ingeniería Química

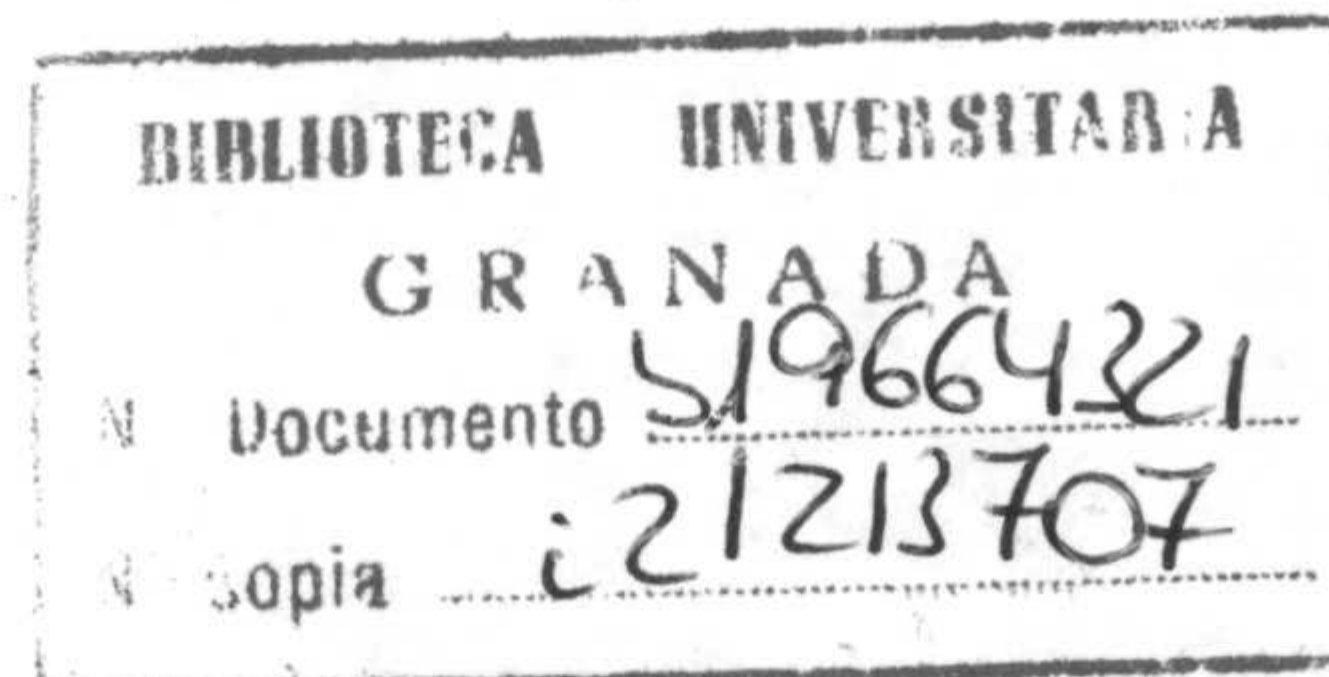
T
12
129

Prof.
8/14-112



*Fermentación de Disoluciones de D-Xilosa y D-Glucosa
con Levaduras*

Tesis Doctoral



Eulogio Castro Galiano

Jaén, 1993

FERMENTACIÓN DE DISOLUCIONES DE D-XILOSA Y D-GLUCOSA
CON LEVADURAS

Trabajo presentado por Eulogio Castro Galiano para optar al grado de Doctor en Ciencias (Sección Químicas), dentro del Programa de Doctorado del Departamento de Ingeniería Química "Tecnología Bioquímica y Agroalimentaria" (bienio 1989-91).

Jaén, 26 de marzo de 1993



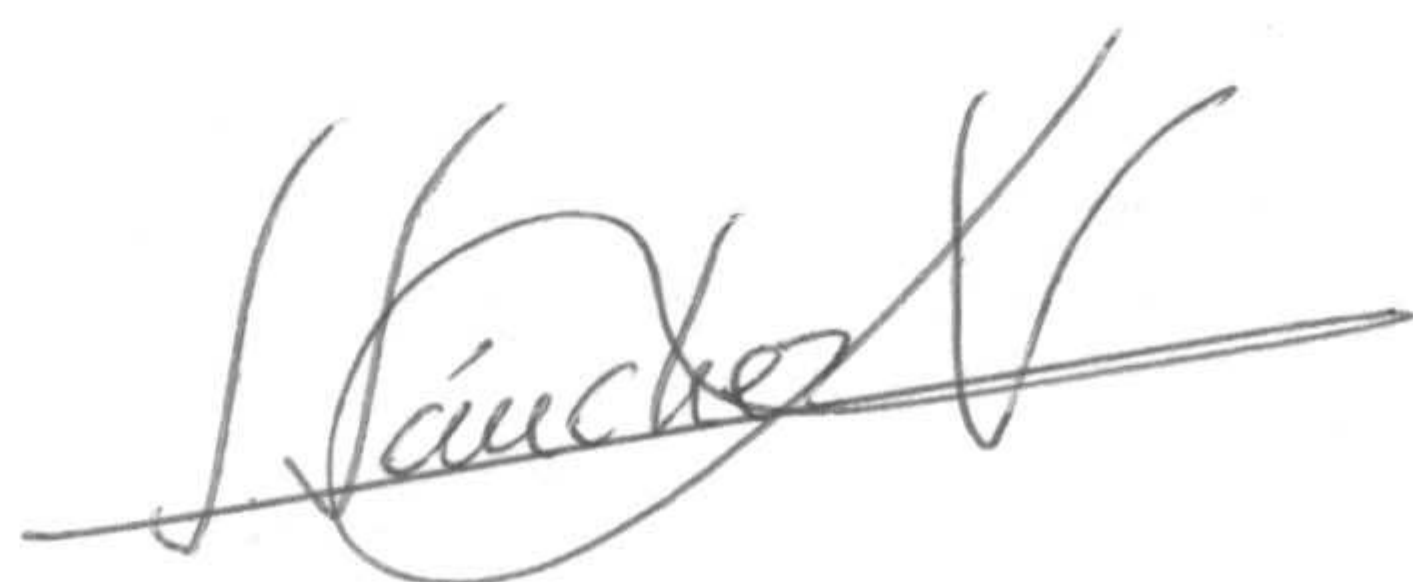
Fdo.: Eulogio Castro Galiano

Vicente Bravo Rodríguez, Catedrático de Ingeniería Química y Director del Departamento del mismo nombre

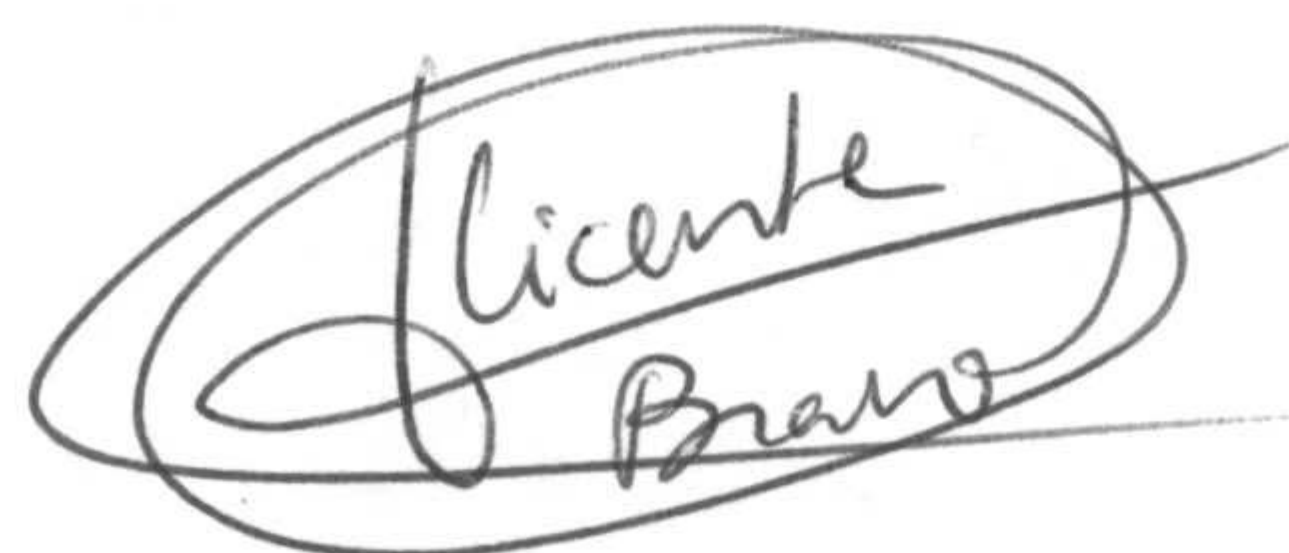


CERTIFICA: Que el presente trabajo sobre "Fermentación de disoluciones de D-Xilosa y D-Xilosa/D-Glucosa con levaduras" ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento, en la Facultad de Ciencias Experimentales de Jaén, bajo mi dirección y la del Profesor Titular de Universidad Dr. D. Sebastián Sánchez Villasclaras.

LOS DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL



Dr. D. S. Sánchez Villasclaras



Dr. D. V. Bravo Rodríguez

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a cuantos han participado, de diferentes formas, en la elaboración de este trabajo. He de mencionar especialmente a las siguientes personas, sin cuya colaboración habría sido imposible el desarrollo y ejecución de este estudio:

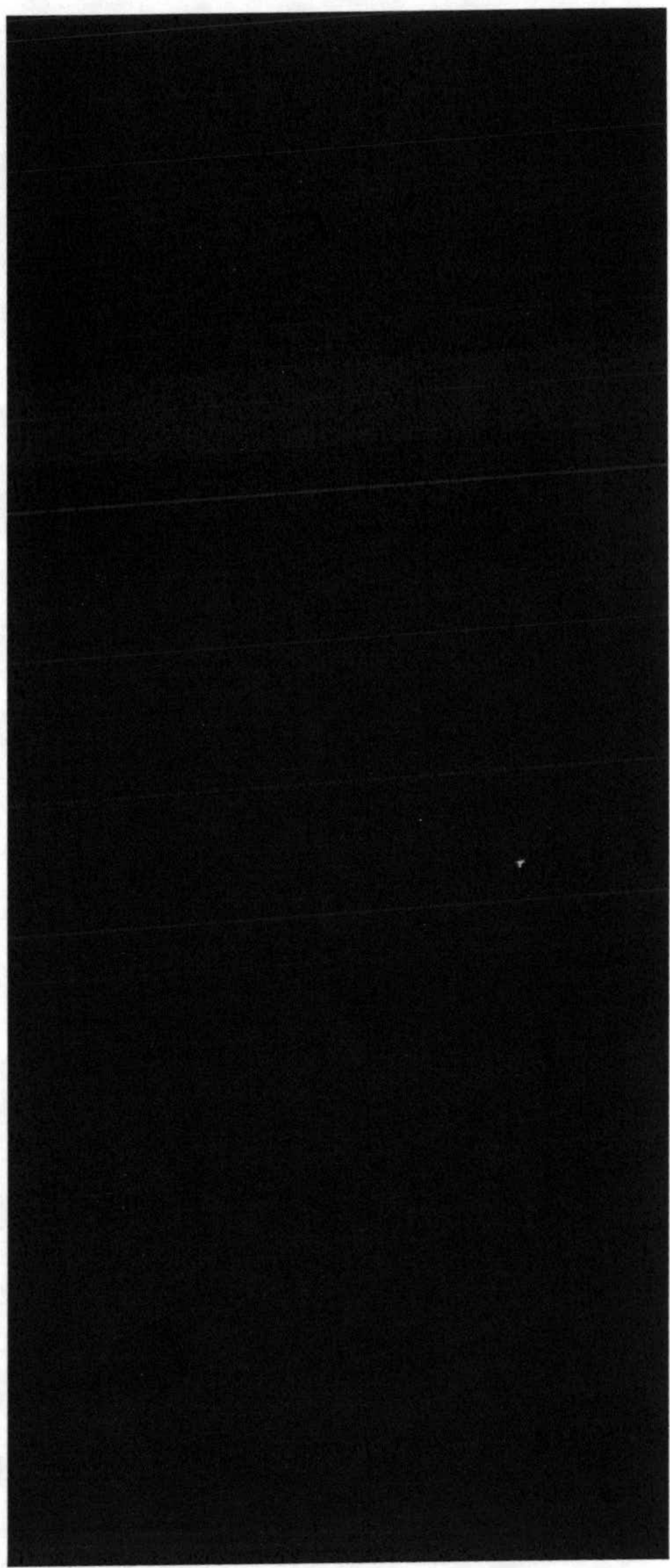
Dr. D. Fernando Camacho Rubio, por su apoyo y constante guía.

Drs. D. Sebastián Sánchez Villasclaras y D. Vicente Bravo Rodríguez, por su acertada dirección y colaboración inestimable en la realización de este trabajo.

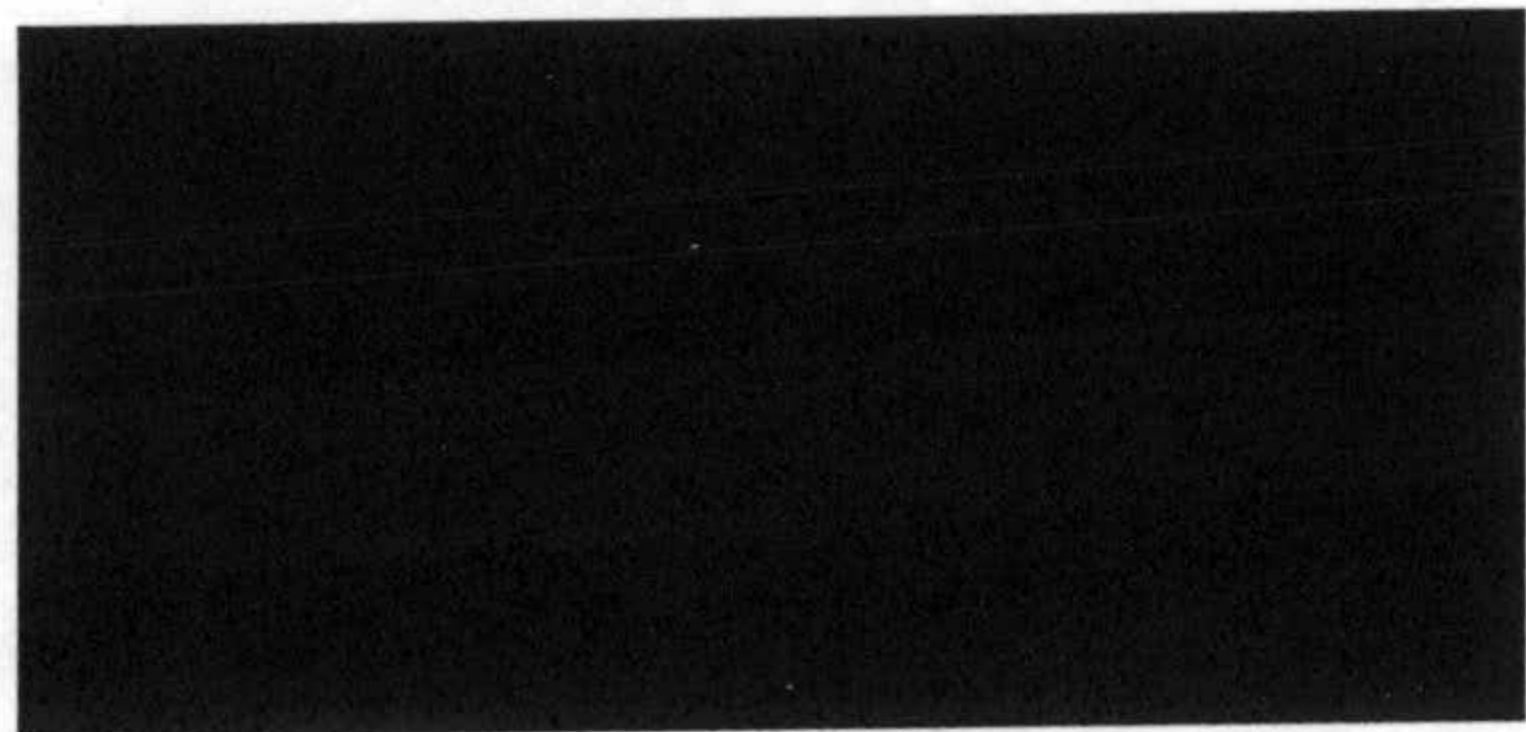
Alberto J. Moya López, por su ayuda en la realización experimental y la cuidadosa elaboración de los trabajos de delineación.

Dr. D. Manuel Moya Vilar, por su generosa colaboración en el procesamiento del texto.

Eulogio Castro Galiano



ÍNDICE



	I
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1 APROVECHAMIENTO DE LA BIOMASA	5
2.1.1 Fuentes de biomasa	5
2.1.2 Aprovechamiento de la biomasa residual	5
2.1.2.1 Aprovechamiento termoquímico	8
2.1.2.2 Aprovechamiento bioquímico	8
2.2 PROCESOS DE FERMENTACIÓN	11
2.2.1 Sustratos utilizados	12
2.2.2 Microorganismos empleados	15
2.2.3 Bioproductos obtenidos	19
2.3 FERMENTACIÓN CON LEVADURAS	23
2.3.1 Características generales de las levaduras	23
2.3.2 Principios básicos en fermentación etanólica	26
2.3.2.1 Vías metabólicas en la degradación de hexosas	28
2.4 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON LEVADURAS	31
2.4.1 Nutrientes, sustratos y levaduras específicas	31
2.4.2 Fermentación con <i>Pachysolen tannophilus</i>	33
2.4.2.1 Características generales	33
2.4.2.2 Vías metabólicas	33
2.4.2.3 Influencia de las condiciones de operación en el crecimiento	35
2.4.2.4 Influencia de la composición del medio en el crecimiento.	37
2.4.3 Fermentación con <i>Candida shehatae</i>	40
2.4.4 Fermentación con <i>Pichia stipitis</i>	42
2.4.5 Fermentación con <i>Hansenula polymorpha</i>	44
2.5 OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN	45

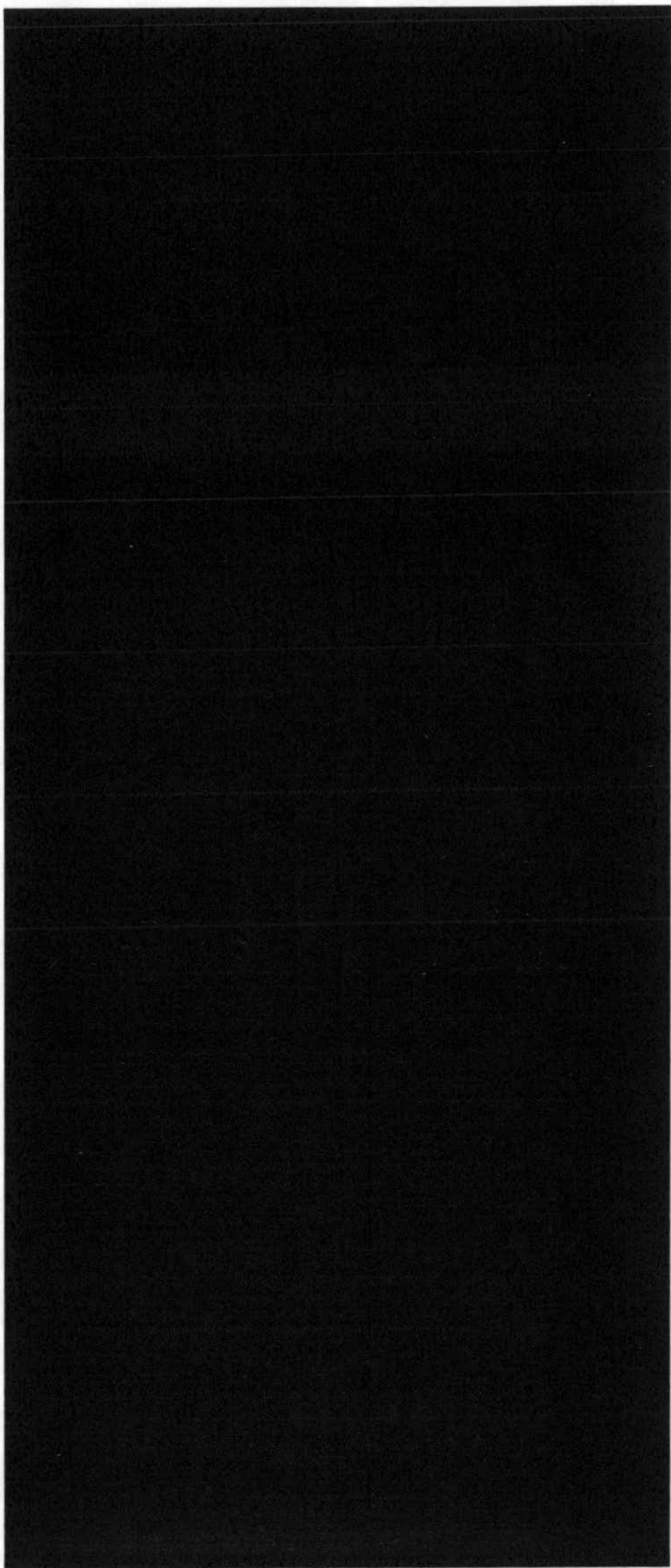
II

3. TÉCNICA EXPERIMENTAL	47
3.1 REACTIVOS QUÍMICOS	49
3.2 DESCRIPCIÓN DE LA INSTALACIÓN EXPERIMENTAL	51
3.3 PROCEDIMIENTO DE TRABAJO	55
3.3.1 Levaduras utilizadas	55
3.3.2 Conservación y mantenimiento de los microorganismos	55
3.3.3 Medio de cultivo	56
3.3.4 Desarrollo de los experimentos	56
3.3.5 Medida de caudales de aire	58
3.3.6 Métodos analíticos	61
3.3.6.1 Determinación del crecimiento celular	61
3.3.6.2 Determinación de azúcares	67
3.3.6.3 Determinación del etanol producido	70
3.3.6.4 Determinación del xilitol producido	71
4. RESULTADOS EXPERIMENTALES	73
4.1 <i>Hansenula polymorpha</i>	77
4.1.1 Influencia del caudal de aireación	77
4.1.2 Influencia del pH inicial	82
4.2 <i>Pachysolen tannophilus</i>	89
4.2.1 Influencia del caudal de aireación	89
4.2.2 Influencia del pH inicial	96
4.2.3 Influencia de la composición del medio. Mezclas xilosa-glucosa	103
4.3 <i>Candida shehatae</i>	113
4.3.1 Influencia del caudal de aireación	113
4.3.2 Influencia del pH inicial	119
4.3.3 Influencia de la composición del medio. Mezclas xilosa-glucosa	126
4.4 <i>Pichia stipitis</i>	133
4.4.1 Influencia del caudal de aireación	133
4.4.2 Influencia del pH inicial	139
4.4.3 Influencia de la composición del medio. Mezclas xilosa-glucosa	145

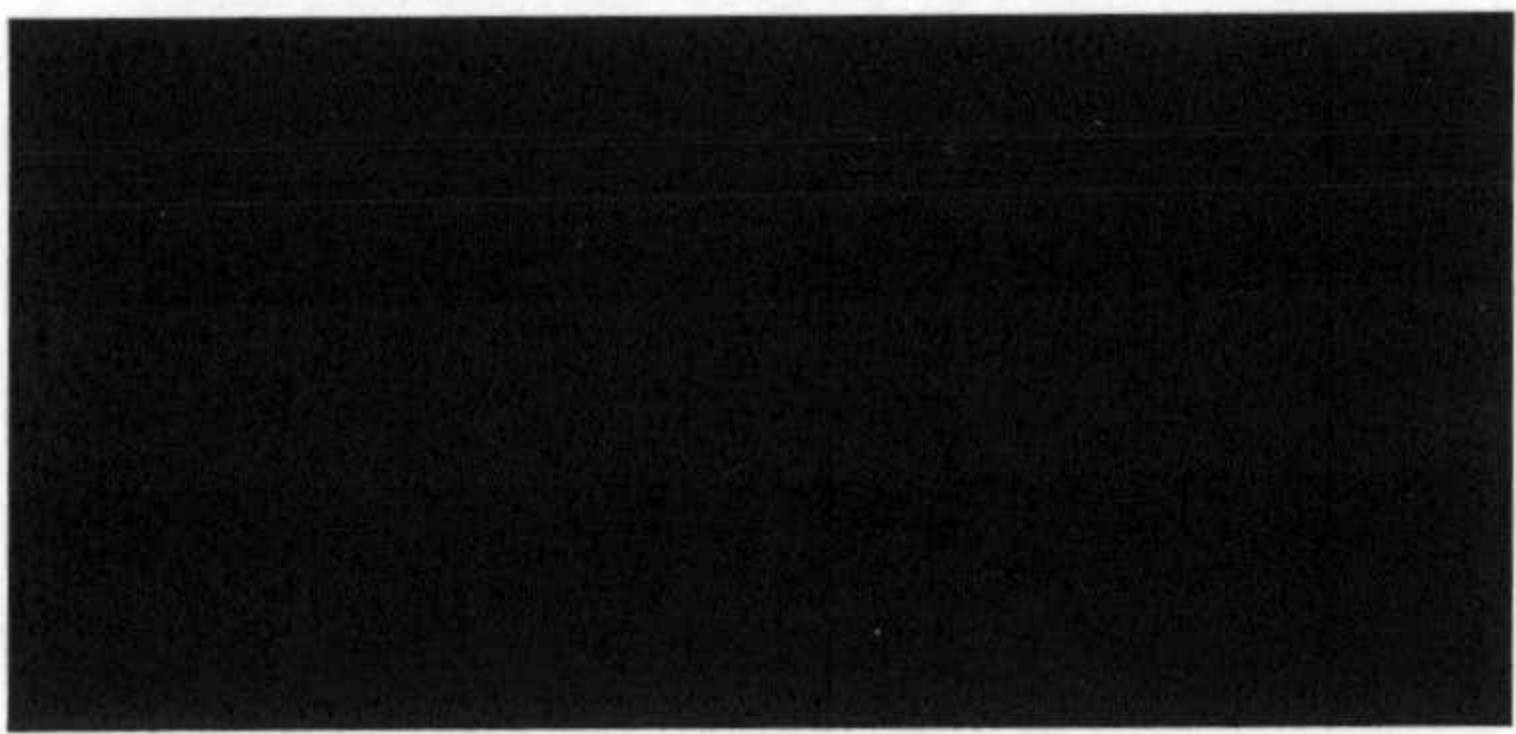
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	155
5.1 PARÁMETROS CINÉTICOS Y DE RENDIMIENTOS	157
5.1.1 Velocidades específicas de crecimiento	157
5.1.2 Velocidad específica de consumo de sustrato	160
5.1.3 Velocidad específica de formación de etanol	160
5.1.4 Rendimientos instantáneos y globales	161
5.2 FERMENTACIÓN CON <i>Hansenula polymorpha</i>	165
5.2.1 Influencia del nivel de aireación	165
5.2.1.1 Formación de biomasa	165
5.2.1.2 Consumo de xilosa	168
5.2.1.3 Formación de bioproductos	173
5.2.2 Influencia del pH inicial	178
5.2.2.1 Formación de biomasa	178
5.2.2.2 Consumo de xilosa	181
5.2.2.3 Formación de bioproductos	185
5.3 FERMENTACIÓN CON <i>Pachysolen tannophilus</i>	191
5.3.1 Influencia del nivel de aireación	191
5.3.1.1 Formación de biomasa	191
5.3.1.2 Consumo de xilosa	194
5.3.1.3 Formación de etanol	199
5.3.2 Influencia del pH inicial	206
5.3.2.1 Formación de biomasa	206
5.3.2.2 Consumo de xilosa	209
5.3.2.3 Formación de etanol	212
5.3.3 Utilización de disoluciones de xilosa y glucosa	217
5.3.3.1 Formación de biomasa	217
5.3.3.2 Consumo de sustrato	220
5.3.1.3 Formación de bioproductos	225
5.4 FERMENTACIÓN CON <i>Candida shehatae</i>	231
5.4.1 Influencia del nivel de aireación	231
5.4.1.1 Formación de biomasa	231
5.4.1.2 Consumo de xilosa	234
5.4.1.3 Formación de bioproductos	239

IV

5.4.2	Influencia del pH inicial	246
5.4.2.1	Formación de biomasa	246
5.4.2.2	Consumo de xilosa	248
5.4.2.3	Formación de bioproductos	253
5.4.3	Utilización de disoluciones de xilosa y glucosa	259
5.4.3.1	Formación de biomasa	259
5.4.3.2	Consumo de sustrato	262
5.4.3.3	Formación de bioproductos	266
5.5	FEMENTACIÓN CON <i>Pichia stipitis</i>	271
5.5.1	Influencia del nivel de aireación	271
5.5.1.1	Formación de biomasa	271
5.5.1.2	Consumo de xilosa	274
5.5.1.3	Formación de bioproductos	277
5.5.2	Influencia del pH inicial	283
5.5.2.1	Formación de biomasa	283
5.5.2.2	Consumo de xilosa	285
5.5.2.3	Formación de bioproductos	288
5.5.3	Utilización de disoluciones de xilosa y glucosa	294
5.5.3.1	Formación de biomasa	294
5.5.3.2	Consumo de sustrato	296
5.5.3.3	Formación de bioproductos	300
5.6	COMPARACIÓN DE RESULTADOS	307
5.6.1	Velocidades específicas máximas de crecimiento	307
5.6.2	Productividades en biomasa	308
5.6.3	Velocidades específicas de consumo de sustrato	308
5.6.4	Rendimientos en biomasa	309
5.6.5	Velocidades específicas de producción de etanol	309
5.6.6	Rendimientos en etanol y xilitol	310
6.	CONCLUSIONES	313
7.	NOMENCLATURA	321
8.	BIBLIOGRAFÍA	329



1. RESUMEN



El trabajo que se describe en esta Memoria forma parte de la línea de investigación aplicada del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada sobre aprovechamiento de residuos lignocelulósicos. La hidrólisis de estos residuos conduce a disoluciones en que los hidratos de carbono mayoritarios son pentosas y hexosas, fundamentalmente xilosa y glucosa respectivamente, por lo que para obtener el máximo rendimiento en etanol de dichas disoluciones es necesario emplear microorganismos capaces de fermentar tanto xilosa como glucosa.

En la presente investigación se ha estudiado la fermentación de disoluciones de xilosa por cuatro levaduras: *Hansenula polymorpha*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* y *Pichia stipitis*. Asimismo, se ha investigado la influencia sobre este proceso del nivel de aireación del medio de cultivo y del pH inicial del mismo. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que *H. polymorpha* no es un microorganismo capaz de convertir xilosa en etanol con elevados rendimientos, si bien presenta prometedoras ventajas en la producción de xilitol. El estudio se completa con la fermentación por las tres levaduras restantes, de disoluciones en las que se ha modificado la proporción inicial de xilosa y glucosa.

En un trabajo anterior, Castro Vico (1987), se estudió la fermentación discontinua de disoluciones de glucosa con *P. tannophilus*, seleccionándose como condiciones de operación más favorables las de pH inicial entre 1,5 y 3,5, temperatura próxima a 30°C y aireación exclusiva por el vórtice de agitación. También se determinó la influencia de las concentraciones de glucosa y extracto de levadura; este componente presentó una acción positiva tanto en los rendimientos en biomasa y etanol como en la velocidad específica de producción de etanol. Por otra parte, en otro trabajo, Castro (1989) se inició el estudio de la fermentación discontinua de disoluciones de xilosa con *P. tannophilus*, analizándose el efecto del pH inicial del medio de cultivo y de la composición del mismo, con respecto a las concentraciones de xilosa y de extracto de levadura.

En todos los experimentos se ha mantenido una temperatura de 30°C habiéndose determinado a lo largo del tiempo las concentraciones de biomasa, xilosa y glucosa residuales y etanol y xilitol producidos. A partir de estos valores se han

determinado los rendimientos en biomasa, etanol y xilitol y las velocidades específicas de consumo de sustrato y de producción de etanol.

Inicialmente se realizaron dos series experimentales para las cuatro levaduras; en la primera, con concentraciones iniciales de xilosa de $s_0=25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ se ha modificado el nivel de aireación del medio de cultivo entre los valores $Q=0,0$ y $Q=0,3$ v/v/min. Los resultados obtenidos muestran que las mejores condiciones de fermentación, en cuanto a la formación de bioproductos, se encuentran en el experimento de aireación exclusiva por el vórtice de agitación. La segunda serie experimental se ha llevado a cabo, por tanto, sin aporte externo de aire (excepto el provocado por la agitación), con igual concentración inicial de xilosa y se ha modificado el pH inicial del medio de cultivo, dependiendo del microorganismo, entre los valores extremos 1,5 y 6,5.

Finalmente, en una tercera serie de experimentos, realizada con *Pachysolen*, *Candida* y *Pichia* se ha estudiado la influencia de la composición del medio de cultivo en cuanto a las proporciones iniciales de los dos azúcares mayoritarios, xilosa y glucosa. La concentración total de sustrato ha sido en todos los casos $25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$, a excepción de los experimentos, uno por levadura, realizados en ausencia tanto de xilosa como de glucosa. En esta serie sólo se ha incorporado el aire debido a la agitación, mientras que el pH inicial de los cultivos ha sido, para cada microorganismo, el más favorable deducido en la segunda serie de experimentos.

De la discusión de los resultados obtenidos se ha deducido fundamentalmente que, de las cuatro levaduras ensayadas, *Pichia stipitis* presenta los mayores valores de las velocidades específicas máximas de crecimiento ($\mu_m=0,67 \text{ h}^{-1}$) para el máximo caudal de aire empleado ($Q=0,3$ v/v/min). Los rendimientos en biomasa menores se han obtenido en *Candida shehatae*, en las condiciones más favorables para esta levadura ($Q=0,0$ v/v/min y $\text{pH}_i=4,5$), $Y_{x/s}^G=0,04 \text{ (Kg biomasa)\cdot(Kg sustrato)}^{-1}$. Los mayores rendimientos en biomasa se obtienen en *Hansenula polymorpha*, alcanzándose un valor de $Y_{x/s}^G=0,44 \text{ Kg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ en el experimento de pH_i más elevado.

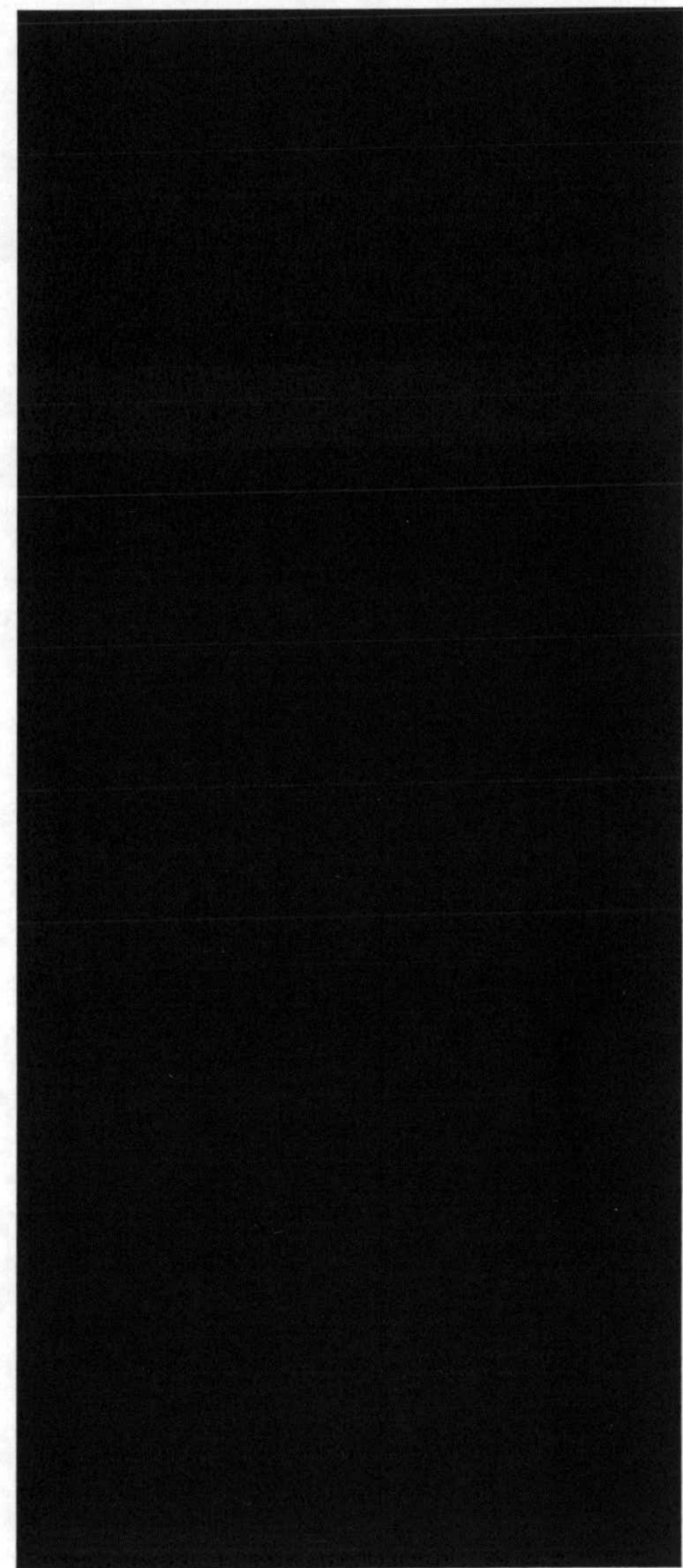
Posterior a la fase exponencial de crecimiento, en las cuatro levaduras se observa un período de crecimiento lineal en la biomasa, de duración variable dependiendo del microorganismo, del sustrato y de las condiciones de operación. Se ha

observado que este período de tiempo es muy amplio en *Hansenula* y muy reducido en *Pichia*. Este comportamiento de la biomasa durante un cierto tiempo de la fermentación puede ser atribuible a una limitación del proceso por la transferencia de oxígeno en la suspensión de células.

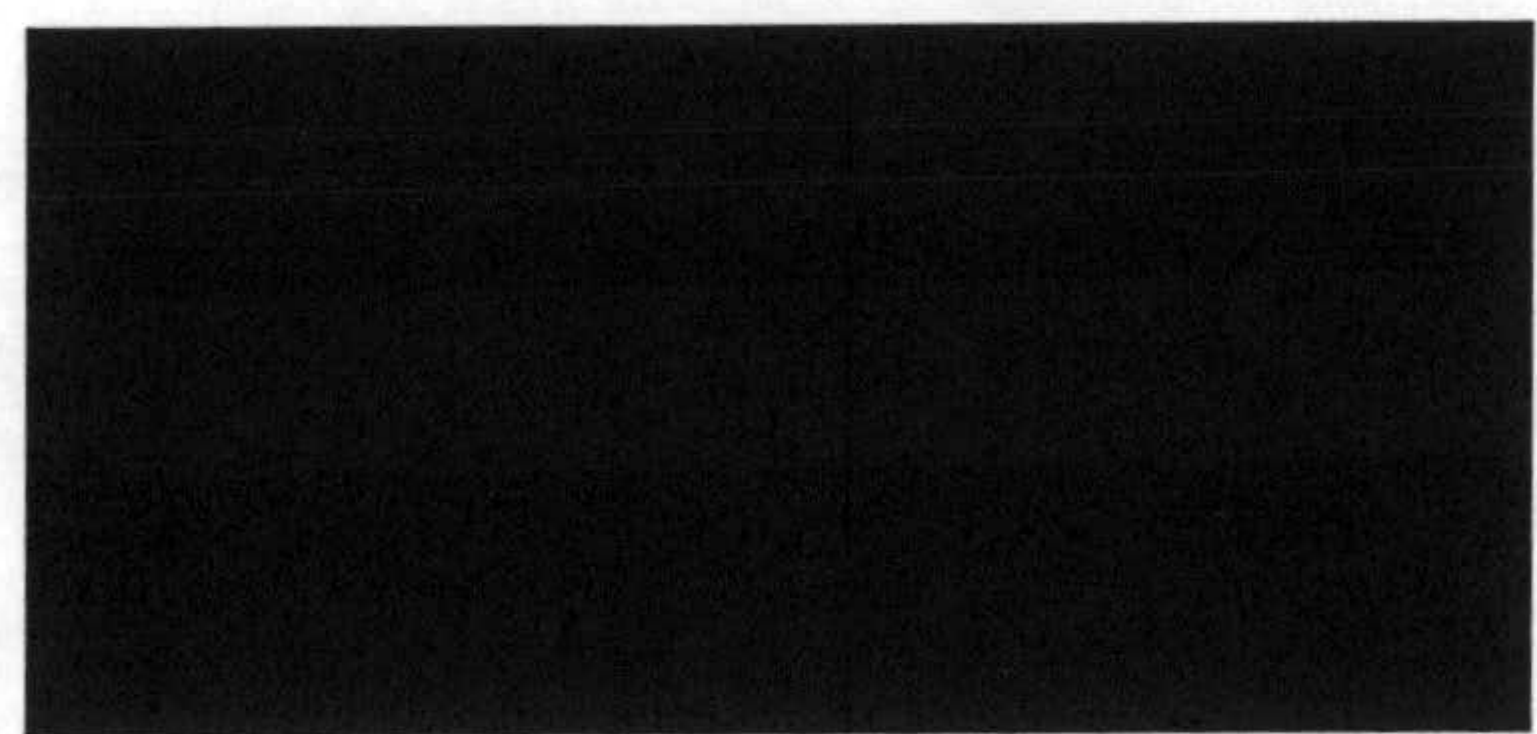
Candida y *Pichia* presentan las mayores velocidades específicas de consumo de sustrato y de formación de etanol así como los mayores rendimientos en este bioproducto, con valores de este último parámetro de $Y_{E/s}^G$ igual a 0,41 y 0,37 (Kg etanol)·(Kg xilosa)⁻¹, respectivamente, y en las condiciones de operación más favorables para ambas levaduras, un caudal de aire de 0,0 v/v/min y un pH_i de 4,5.

De las cuatro levaduras ensayadas, *Hansenula* presenta una mínima respuesta a la formación de etanol; sin embargo, la producción de xilitol es muy elevada, alcanzándose valores de $\bar{Y}_{Xi/s} = 0,64$ (Kg xilitol)·(Kg xilosa)⁻¹ en las condiciones más favorables (Q=0,0 v/v/min y pH_i=5,5). De las restantes levaduras, es *Pichia* la que presenta los mínimos rendimientos en xilitol.

Finalmente, cuando se han utilizado disoluciones con mezcla de xilosa y glucosa en distintas proporciones, se ha observado que las máximas velocidades específicas de formación de etanol se alcanzan en *Candida*, con valores de $q_E = 2,2$ Kg·Kg⁻¹·h⁻¹ cuando la proporción inicial en concentración xilosa/glucosa era 15/10. Sin embargo, los mayores rendimientos en etanol, del orden de 0,42 a 0,47 Kg·Kg⁻¹ se obtienen en *Pichia* cuando la concentración de glucosa en la mezcla es elevada.



2. INTRODUCCIÓN



2.1 APROVECHAMIENTO DE LA BIOMASA RESIDUAL

Tras las sucesivas crisis del petróleo de los años setenta, los países desarrollados iniciaron una política destinada al aprovechamiento racional de la energía y al desarrollo de nuevas fuentes energéticas, entre las cuales la biomasa presenta un gran interés por su carácter renovable.

El término biomasa se aplica a cualquier tipo de materia orgánica que haya tenido su origen como consecuencia de un proceso biológico, Fernández (1980).

2.1.1 Fuentes de biomasa

Generalmente se distingue entre los tipos de biomasa que se indican en la Figura 2.1. La biomasa primaria es la producida por la conversión directa de la energía solar en energía química. La biomasa secundaria incluye los residuos de origen agrícola, forestal y animal; por último, la biomasa terciaria corresponde a los residuos urbanos o industriales. Las biomásas secundaria y terciaria se agrupan comúnmente bajo el nombre de residual y constituyen actualmente un objetivo de gran interés, como materia prima, para la industria de la fermentación.

2.1.2 Aprovechamiento de la biomasa residual

Sobre la biomasa residual conviene hacer las siguientes consideraciones:

- La disponibilidad real de este tipo de biomasa limita su aprovechamiento, estando condicionada por la dispersión, dificultad de acceso y transporte, etc, lo que influye sobre los costes de recogida y transporte.
- Su producción no suele ser regular a lo largo del tiempo.
- La utilización energética de la biomasa no debe provocar un detrimento de la producción de alimentos. El coste de la energía producida no debe ser competitivo, Puerta (1986).

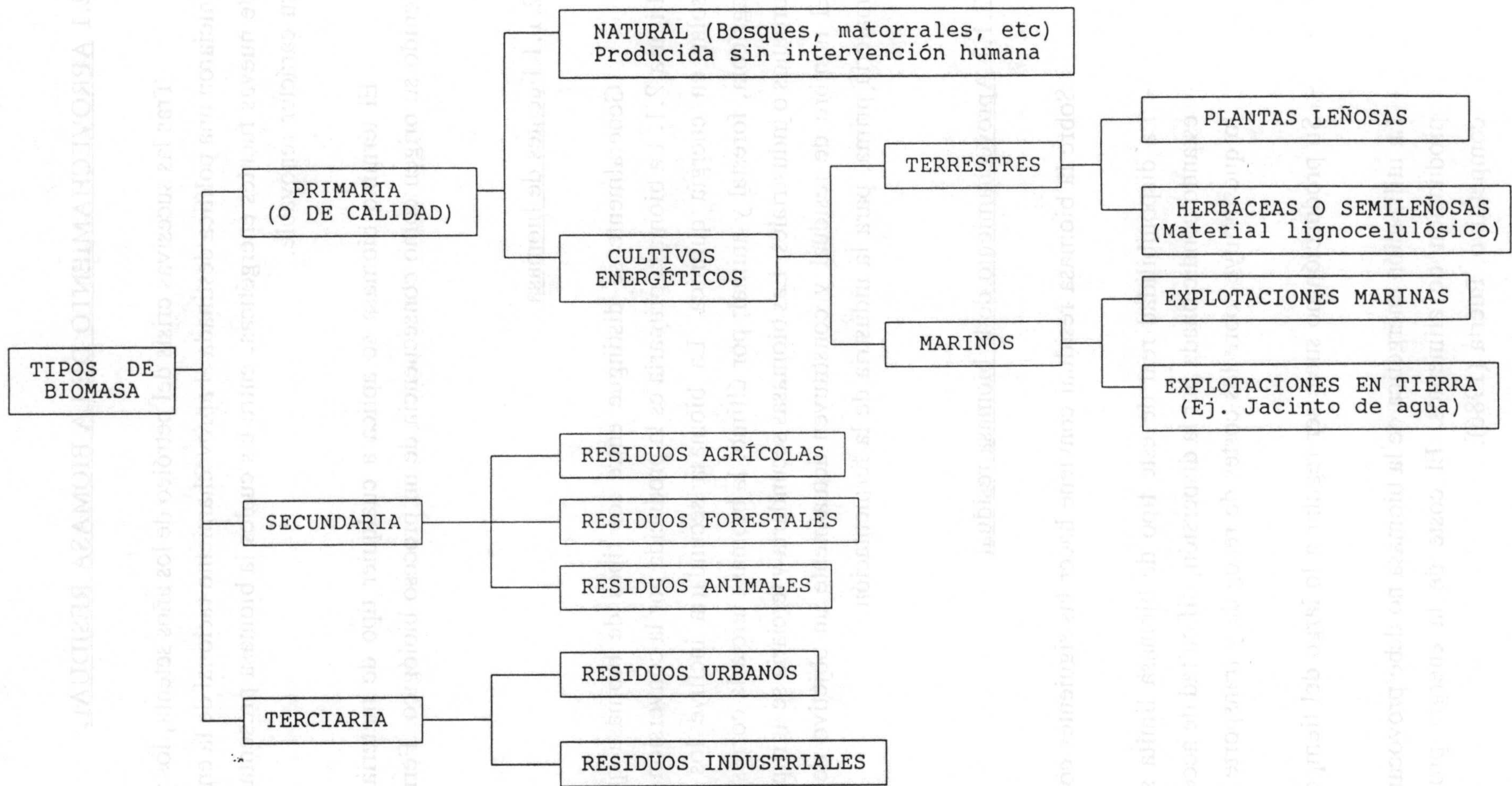


Fig. 2.1

- Existen otros usos alternativos actuales de este tipo de biomasa que hay que tener en cuenta. Por ejemplo, algunos residuos son necesarios en la agricultura como aporte de nutrientes, tanto orgánicos como inorgánicos, Montes (1985).

A pesar de estas limitaciones, la aportación de la biomasa al balance energético nacional ascendía a finales de 1988 a un 3% de la energía primaria, representando un 83% del total de las energías renovables, como se muestra en la Tabla 2.1.

TABLA 2.1

**CONTRIBUCIÓN DE LAS ENERGÍAS RENOVABLES AL
BALANCE ENERGÉTICO ESPAÑOL EN 1988**

Biomasa	2.130.711 tep
Minihidráulica	389.043 tep
Solar	37.105 tep
Geotérmica	3.000 tep
Eólica	1.906 tep

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

En general, dependiendo del contenido en humedad del residuo, estas vías se suelen clasificar en dos grupos:

- a) Termoquímicas, para residuos secos
- b) Bioquímicas, para residuos húmedos.

En la Tabla 2.2 aparecen los procesos de transformación más recomendados para cada tipo de biomasa, así como los bioproductos correspondientes obtenidos.

2.1.2.1 Aprovechamiento termoquímico

Los procesos termoquímicos de aprovechamiento se suelen dividir frecuentemente en combustión, pirólisis, gasificación, carbonización y tarificación, nombres que indican, excepto en el caso de pirólisis, los productos obtenidos.

Dependiendo de las condiciones empleadas (fundamentalmente la temperatura, la relación oxígeno a fuel y el tiempo de residencia), la biomasa puede alterarse ligeramente o ser cambiada por completo. Estas tres variables definen las condiciones para pirólisis, gasificación y combustión, aunque a menudo existe poca distinción entre estos procesos.

Tradicionalmente, la pirólisis se ha identificado con la carbonización, obteniéndose como producto principal un carbón. Actualmente, el término pirólisis se usa para designar en general cualquier proceso en el que los productos de interés son aceites líquidos, Soltes (1988).

2.1.2.2 Aprovechamiento bioquímico

Entre los métodos bioquímicos de aprovechamiento de la biomasa residual son de especial interés los que conducen a la obtención de bioetanol y a la producción de biomasa rica en proteínas (SCP), Camacho y col. (1986). En estos procesos cabe destacar las siguientes ventajas:

- Se reduce el consumo energético y se incrementa la seguridad, debido a que generalmente se opera en condiciones de presión y temperatura próximas a las ambientales.
- Disminuye el riesgo de contaminación, a la vez que se utilizan residuos que, por su naturaleza, son necesarios eliminar.

- Se aumenta la productividad y el aprovechamiento de la materia prima, si se comparan los tiempos de duplicación de los microorganismos con los de las plantas y animales superiores, y la selectividad de una reacción enzimática con la de una reacción química no biológica.

Tabla 1. Procesos de transformación que se han desarrollado para residuos ricos de proteínas

Procesos biotecnológicos	Procesos bioquímicos	Producción química	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> Almidón Glucosa Alcohol Compost 	<ul style="list-style-type: none"> Etanol 	<ul style="list-style-type: none"> Metano Ácido succínico Ácido succínico Metano Compost 	<ul style="list-style-type: none"> 1987 1987 1987 1987 1987
<ul style="list-style-type: none"> Almidón Glucosa Alcohol Compost 	<ul style="list-style-type: none"> Etanol 	<ul style="list-style-type: none"> Metano Ácido succínico Ácido succínico Metano Compost 	<ul style="list-style-type: none"> 1987 1987 1987 1987 1987
<ul style="list-style-type: none"> Almidón Glucosa Alcohol Compost 	<ul style="list-style-type: none"> Etanol 	<ul style="list-style-type: none"> Metano Ácido succínico Ácido succínico Metano Compost 	<ul style="list-style-type: none"> 1987 1987 1987 1987 1987

Tabla 2.2.- Procesos de transformación más adecuados para distintos tipos de biomasa

Tipos de biomasa	Procesos termoquímicos	Procesos bioquímicos	Productos obtenidos	Referencias
Cultivos energéticos acuáticos y terrestres		Biometanación	Metano, metanol	- Chapman (1980)
Residuos agrícolas y forestales; especies leñosas y semileñosas	<ul style="list-style-type: none"> - Combustión - Pirólisis - Gasificación - Licuefacción 		<ul style="list-style-type: none"> - Calor, combustibles - Carbón, aceites - Metanol y gases - Combustibles líquidos 	<ul style="list-style-type: none"> - Jiménez y col. (1987); Litzen y col. (1990) - Bridwater (1980); Rodríguez y col. (1987) - Corella y col. (1990); Elórtégui y col. (1985) - Levy-Lambert (1980); Chaparro (1981)
Residuos animales		Biometanación		- Paris y col (1990)
Residuos sólidos urbanos	<ul style="list-style-type: none"> - Combustión - Gasificación - Licuefacción - Pirólisis 			<ul style="list-style-type: none"> - Hewstock (1978) - Helt y Agrawal (1988); Lago y col.(1987); Chaparro (1989)
Especies herbáceas		Hidrólisis y fermentación		- Fanta y col. (1984)

2.2 PROCESOS DE FERMENTACIÓN

Los procesos de fermentación con diferentes propósitos han sido empleados desde hace miles de años, si bien su desarrollo industrial ha tenido lugar en el primer tercio de este siglo. La producción masiva de productos químicos a partir de derivados del petróleo relegó la industria fermentativa hacia la fabricación de productos farmacéuticos y, finalmente, la crisis energética de los años setenta provocó un nuevo desarrollo de los procesos de fermentación con vistas a la obtención fundamentalmente de productos energéticos, Núñez y Lema (1987).

En la actualidad se denomina fermentación a la transformación de un compuesto orgánico o inorgánico (sustrato) por la acción de enzimas, bien se encuentren éstas en las células (in vivo), o aisladas de las células que las produjeron (in vitro), Camacho y col. (1986).

Para el primer tipo de fermentación, los microorganismos requieren un medio de cultivo adecuado, en el cual crecen, se reproducen, consumen los sustratos del medio y producen, como consecuencia de su metabolismo, otros productos bioquímicos.

Es conveniente indicar que el término fermentación, estrictamente hablando, es un tipo de catabolismo específico, que se refiere con frecuencia a la degradación de la glucosa para dar etanol y ácido láctico. Sin embargo, ha adquirido la consideración de un término aceptado, de forma que la fermentación "etanólica" se refiere a la producción de etanol. Similarmente, el término "fermentador" se usa frecuentemente para significar un tanque en el que se cultivan los microorganismos, mientras que los "productos de fermentación" se refieren a los materiales acumulados en los cultivos, tales como alcoholes, ácidos, antibióticos y enzimas, Wiseman (1986).

La mayoría de las fermentaciones tienen como finalidad la obtención de biomoléculas específicas, aunque también puede dirigirse el proceso hacia la obtención de biomasa o hacia la eliminación de un sustrato determinado. Ejemplos de estos dos tipos de procesos son la obtención de levaduras de panadería y el tratamiento de aguas residuales, respectivamente.

2.2.1 Sustratos utilizados

Entre los sustratos más utilizados y apropiados para la obtención de productos químicos, empleando como una de las etapas finales un proceso de fermentación se encuentran los distintos tipos de biomásas indicados anteriormente, Figura 2.1.

Estos tipos de biomásas (residuos lignocelulósicos principalmente) necesitarán previamente un pretratamiento y un posterior proceso de hidrólisis, bien ácida o bien enzimática, cuyos resultados serán los sustratos a emplear en la fermentación.

En la hidrólisis se tratará de conseguir degradar las moléculas de celulosa, hemicelulosa y lignina, principales componentes de los residuos lignocelulósicos, a monosacáridos, Figura 2.2 y Tabla 2.3.

TABLA 2.3

**COMPOSICIÓN DE ALGUNOS RESIDUOS
CELULÓSICOS, (%), Mc Ginnis y col. (1983)**

Fuente	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Basuras Urbanas*	61	2	9
Maderas blandas	45-50	25-35	25-35
Maderas duras	40-55	24-40	18-25
Forrajeras, paja de cereales, caña de azúcar, ...	25-40	25-50	10-30

* Después de eliminar plásticos y metales

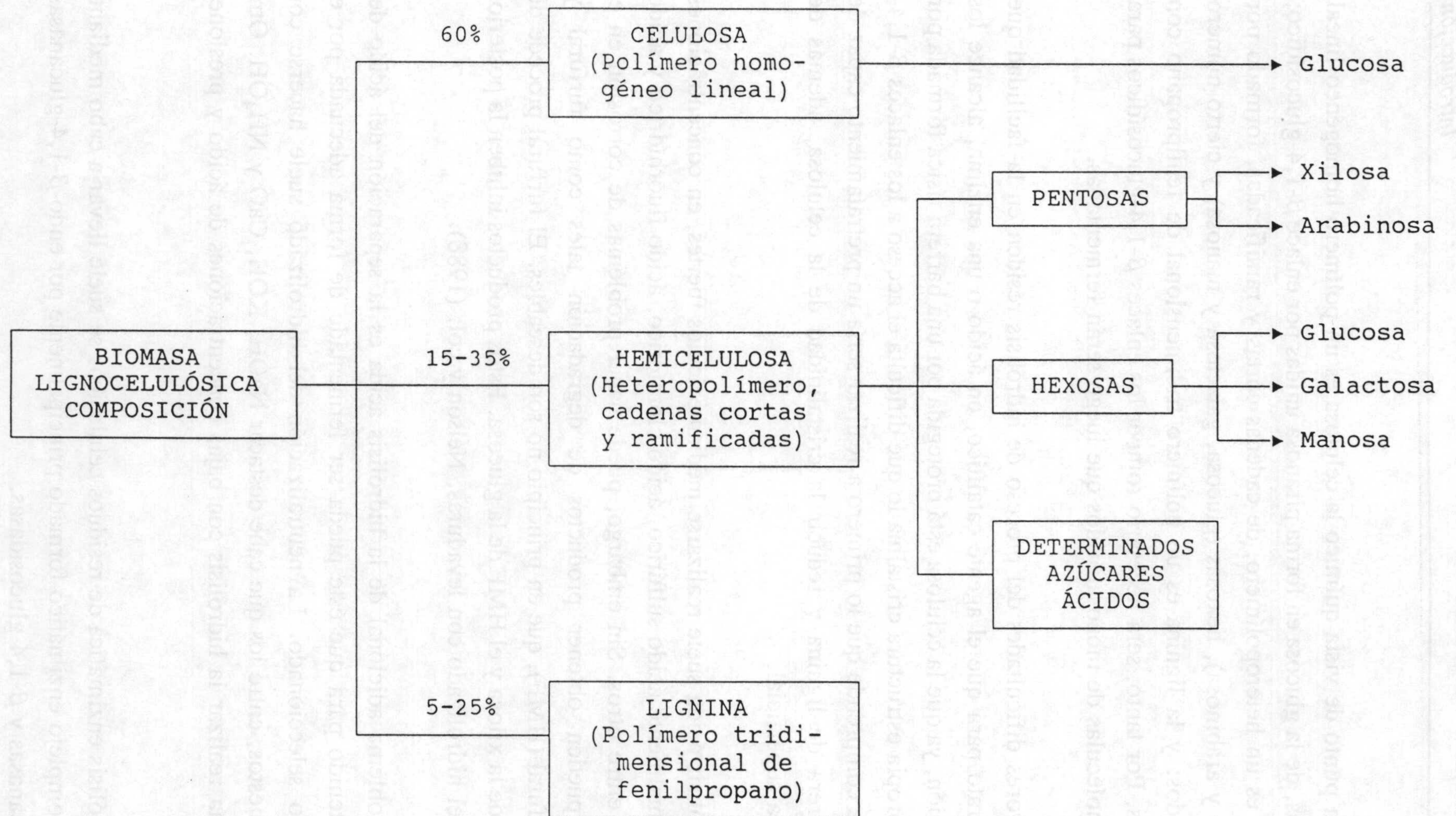


Fig. 2.2

Desde un punto de vista químico la celulosa es un polímero homogéneo lineal de cadenas largas, de la glucosa en forma piranosa unidas por enlace β -1,4-glucosídico; la hemicelulosa es un heteropolímero, de cadenas cortas y ramificadas, formado por pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, galactosa y manosa) y cierto número de azúcares ácidos; y la lignina es un polímero tridimensional de fenilpropano con grupos fenólicos. Por tanto, será necesario romper los enlaces β -1,4-glucosídicos para así liberar las moléculas de monosacáridos que luego serán fermentadas.

Las mayores dificultades del proceso de hidrólisis residen en la facilidad que presente el sustrato para que el agente catalítico, un ácido o una enzima, alcance los lugares de reacción, ya que la celulosa está protegida por una barrera física formada por la lignina y su propia estructura cristalina lo que dificulta el acceso a los enlaces β -1,4-glucosídicos. Se comprende que lo primero a realizar sería un pretratamiento capaz de eliminar la barrera de lignina y reducir la cristalinidad de la celulosa, además de aumentar el área superficial.

La hidrólisis ácida suele realizarse mediante ácidos fuertes, en concentraciones adecuadas, normalmente ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fluorhídrico y ácido trifluoracético, entre otros. Sin embargo, puede haber problemas de corrosión en el reactor y se pueden obtener productos de degradación tales como furfural y hidroximetilfurfural (HMF), que en principio no son deseables. El furfural procede de la degradación de la xilosa y el HMF de la glucosa. Estos productos inhiben la posterior fermentación del hidrolizado con levaduras, Nelson y col. (1988).

Otro problema adicional de la hidrólisis ácida es la separación del ácido del hidrolizado obtenido para que éste pueda ser fermentado de forma adecuada por el microorganismo seleccionado. La neutralización del hidrolizado suele hacerse con distintos compuestos, entre los que cabe destacar NaOH, KOH, CaO y NH_4OH . Otra posibilidad sería realizar la hidrólisis con bajas concentraciones de ácido y presiones elevadas.

La hidrólisis enzimática de residuos celulósicos se suele llevar a cabo mediante celulasas, un complejo enzimático formado principalmente por endo- β -1,4-glucanasas, exo- β -1,4-glucanasas y β -1,4-glucosidasas.

Dada la naturaleza insoluble del sustrato, la hidrólisis es una reacción heterogénea en donde las enzimas (glucanasas) habrán de desplazarse desde el seno de la fase acuosa hasta la superficie del sustrato, en donde se adsorben y reaccionan. En consecuencia habrá que considerar los siguientes factores:

- La naturaleza y producción de las celulasas.
- La naturaleza del sustrato.
- Las interacciones enzima-sustrato.

Una vez realizada la hidrólisis, los sustratos mayoritarios son glucosa y xilosa, en la fracción celulósica y hemicelulósica respectivamente. Cabe destacar que la composición total en xilosa es muy importante y en su aprovechamiento radica el interés de este tipo de procesos; como ejemplo, la xilosa en el hidrolizado de paja de trigo representa el 31%.

Así pues, como conclusión se puede decir que independientemente del tipo de hidrólisis, la composición del hidrolizado va a depender en cierta medida de la naturaleza de la biomasa y de las condiciones del proceso. Como ejemplo, en la hidrólisis ácida de la paja de trigo en condiciones muy parecidas y variando exclusivamente la naturaleza del ácido, los rendimientos en monosacáridos son los siguientes: usando ácido clorhídrico 1N, 21% de xilosa, 3% de arabinosa y 3% de glucosa; usando ácido trifluoracético 1N, 23% de xilosa, 3% de arabinosa y 1% de glucosa.

2.2.2 Microorganismos empleados

Primeramente hay que indicar que bastantes reacciones hidrolíticas y muchas reacciones redox enzimáticas pueden llevarse a cabo con ayuda de preparados enzimáticos libres de células. Sin embargo, las reacciones enzimáticas complejas que llevan hasta el producto químico deseado necesitan en la mayoría de los casos el empleo de microorganismos vivos.

Los microorganismos de mayor importancia técnica se encuentran distribuidos entre bacterias, hongos, levaduras (hongos unicelulares) y microalgas. La mayor parte

de los organismos utilizados actualmente son mesófilos (crecen en un rango de temperatura entre 25 y 40°C) y se han aislado de ambientes gastrointestinales o sedimentos; su metabolismo completo suele ser desconocido, Vega y col. (1983).

En general, son anaerobios no estrictos, muy sensibles al oxígeno, aunque esta propiedad no presenta problemas en las fermentaciones industriales, ya que el oxígeno se elimina fácilmente y es poco soluble, especialmente a las temperaturas usuales de la fermentación.

De los diez órdenes de bacterias admitidos, (clasificación Bergey, Collins (1969)), los de mayor interés industrial se encuentran en los seis órdenes indicados en la Tabla 2.4, siendo los Eubacteriales, Pseudomonales y Actinomycetales los más importantes en cuanto a su aplicación a procesos fermentativos.

La gran variedad de hongos y levaduras de interés industrial hace difícil realizar una clasificación. Entre las existentes cabe destacar la realizada por Simon y Meunier (1970). Esta clasificación, ampliada y actualizada con los criterios taxonómicos de Alexopoulos y Mims (1979), se muestra en la Tabla 2.5.

	<u>ORDEN</u>	<u>GÉNERO</u>	<u>ESPECIE</u>
BACTERIAS	Actinomycetales	<i>Actinomycetes</i>	<i>sp.</i>
		<i>Streptomyces</i>	<i>aureofaciens</i>
		"	<i>thioxidans</i>
	Beggiatoales (sulfurosas)	<i>Thiobacillus</i>	<i>oxidans</i>
	Eurobacteriales	<i>Acetobacter</i>	<i>aceti</i>
		<i>Bacillus</i>	<i>stearothermophilus</i>
		"	<i>subtilis</i>
		<i>Clostridium</i>	<i>acetobutylicum</i>
		"	<i>butyricum</i>
		"	<i>indolis</i>
		"	<i>sordelli</i>
		"	<i>sphenoides</i>
		"	<i>sporogenes</i>
		"	<i>thermocellum</i>
		"	<i>thermohydrosulfuricum</i>
		"	<i>thermosaccharolyticum</i>
		<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>
		<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
		<i>Gluconobacter</i>	<i>oxidans</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>aerogenes</i>		
<i>Lactobacillus</i>	(10 especies)		
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>		
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>lactis</i>		
Micoplasmatales (o Mollientes)	<i>Arthrobacter</i>	<i>sp.</i>	
Pesudomonales	<i>Hydrogenomonas</i>	<i>sp.</i>	
	<i>Methanomonas</i>	<i>sp.</i>	
	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	
	"	<i>ovalis</i>	
	"	<i>pyocyanea</i>	
	<i>Zymomonas</i>	<i>mobilis</i>	
Spirochaetales	<i>Spirochaeta</i>	<i>aurantia</i>	
	"	<i>litoralis</i>	
	"	<i>stenostrepa</i>	

Tabla 2.4.- Bacterias de interés industrial en procesos de fermentación

	<u>DIVISIÓN</u>	<u>SUBDIVISIÓN</u>	<u>CLASE</u>	<u>FAMILIA</u>	<u>GÉNERO</u>	<u>ESPECIE</u>		
HONGOS	Gymnomycota	Acrasiogymnomycotina	Acrasiomycetes					
		Plasmodiogymnomycota	{ Protosteliomycetes Myxomycetes					
	Mastigomycota	Haplomastigomycotina	{ Chytridiomycetes Hyphochytridiomycetes Plasmodiophoromycetes					
		Diplomastigomycotina	Oomycetes					
	Amastigomycota	Zygomycotina		{ Zygomycetes Trichomycetes		{ Absidia Choanesphora Cunninghamella Mucor Rhizopusoryzae Zygorhynchus		
				Saccharomycetae			{ Saccharomyces cerevisiae Schizosacchar. pombe Hansenula polymorpha Kluyveromyces marxianus Pichia stipitis Pachysolen tannophilus Candida shehatae	
		Ascomycotina	Ascomycetes		{ Eurotiaceae		{ Aspergillus niger " terrens " flavus " oryzae Penicillium chrysogenum " notatum " griseofulvum	
		Basidiomycotina	Basidiomycetes					
		Deuteromycetina	Deuteromycetes (Fungiimperfecti)			{ Alternaria Botrytis Cladosporium Curvularia Fusarium Geotrichum Neurospora Trichoderma Trichothecium	sp viride	

Tabla 2.5.- Hongos de interés industrial en procesos de fermentación

2.2.3 Bioproductos químicos obtenidos

Las industrias de procesos bioquímicos están principalmente interesadas en la explotación controlada de la bioquímica de materiales biológicos (microorganismos, plantas y tejidos animales, fracciones microbianas y enzimas libres de células). Los procesos actuales desarrollados están relacionados fundamentalmente con microorganismos y enzimas libres de células, Atkinson (1986).

Los principales productos bioquímicos obtenidos por un proceso de fermentación industrial son:

- Ácidos orgánicos y alcoholes
- Antibióticos
- Enzimas
- Vitaminas y aminoácidos
- Esteroides

Las principales aplicaciones de los productos químicos obtenidos por fermentación industrial se muestran en la Tabla 2.6 y en la Figura 2.3.

Entre los ácidos orgánicos más importantes obtenidos por fermentación industrial cabe destacar los ácidos acético, cítrico, glucónico, glutámico, fumárico, isoascórbico y láctico; entre los alcoholes, etanol, butanol, butanodiol, glicerol y determinados alcoholes superiores.

Conviene indicar brevemente que las enzimas pueden ser recuperadas de los microorganismos, consiguiendo mediante un estímulo químico apropiado que dejen la célula y entren en el medio nutriente; o bien recuperarlas directamente del material celular por una combinación de procedimientos químicos y mecánicos. Entre las enzimas de mayor importancia industrial se encuentran: proteasa, L-amilasa, glucosa-isomerasa, lactasa, glucosa-oxidasa y celulasa.

En cuanto a las vitaminas, B₂ (riboflavina) y B₁₂ se obtienen directamente por fermentación. Todos los aminoácidos, excepto metionina, pueden ser producidos por procesos fermentativos (lipsina y triptófano son obtenidos en gran cantidad).

BIOPRODUCTOS OBTENIDOS EN PROCESOS DE FERMENTACIÓN INDUSTRIAL	Aplicación en sanidad humana	<ul style="list-style-type: none"> • Antibióticos • Vacunas • Hormonas • Esteroides • Productos farmacéuticos especiales
	Aplicación en sanidad animal	<ul style="list-style-type: none"> • Antibióticos • Vacunas • Hormonas
	Aplicación en la elaboración de alimentos y bebidas	<ul style="list-style-type: none"> • Alcoholes • Ácidos orgánicos • Biomasa rica en proteínas (SCP)
	Agroquímicos	<ul style="list-style-type: none"> • Pesticidas • Fungicidas • Herbicidas
	Productos especiales	<ul style="list-style-type: none"> • Vitaminas • Aminoácidos • Enzimas

Tabla 2.6.- Aplicaciones de productos obtenidos por fermentación industrial

Por último, la masa microbiana producida simultáneamente con los productos bioquímicos es con frecuencia un producto residual, pero a veces puede ser empleado como suplemento en piensos, dado su alto contenido en proteínas. En ocasiones la producción de biomasa puede ser objetivo primordial, como ocurre con la levadura para panificación.

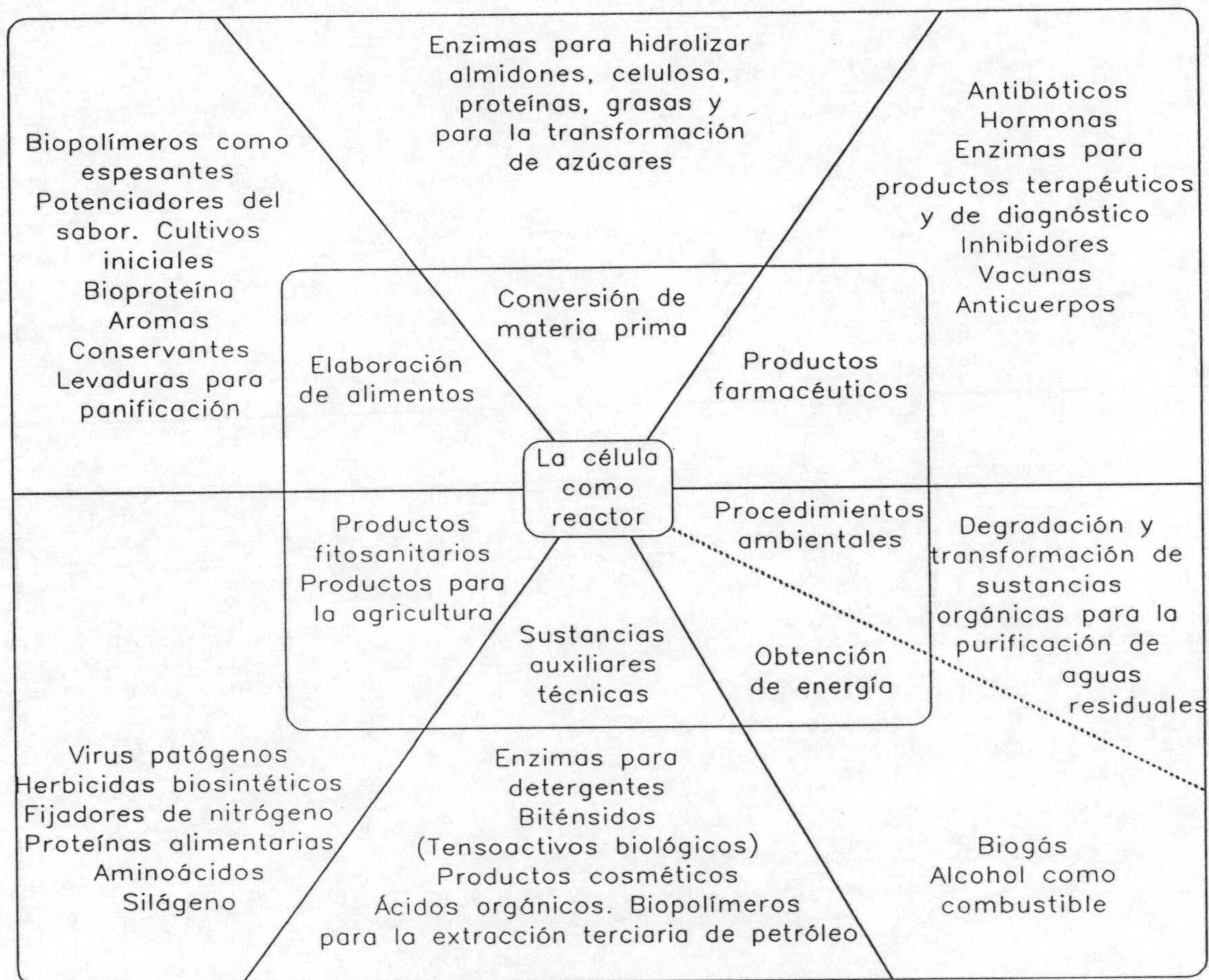
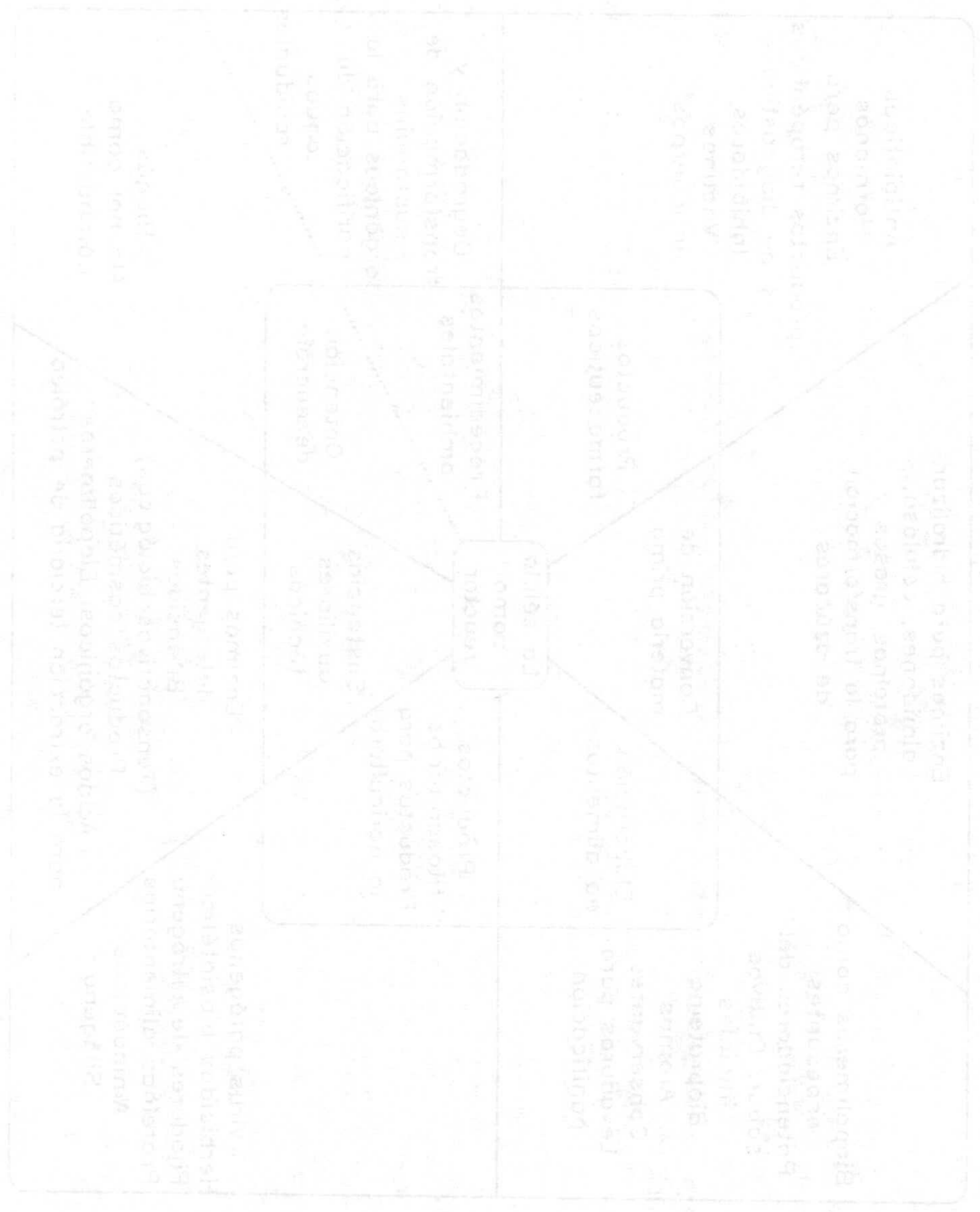


Fig. 2.3.- Aplicaciones de los principales bioproductos obtenidos por fermentación industrial

Fig. 3.3 - Yhteenvetoja ja luokittelua eri tyyppisistä koulutusjärjestelmistä



2.3 FERMENTACIÓN CON LEVADURAS

2.3.1 Características generales de las levaduras

Con el término "levadura" se suele incluir a las verdaderas levaduras esporógenas (*Ascomycetes*), las levaduras asporógenas (hongos imperfectos) y algunos hongos dimórficos que adoptan forma de levadura bajo ciertas condiciones, Collins (1969).

Desde el punto de vista industrial existen varios géneros de bastante interés; el amplio campo de *Saccharomyces* y el más reducido de las levaduras *Candida* o *Toruplosis*. Dentro de estas existen varias especies conteniendo a su vez distintas cepas. La selección de cepas a lo largo de décadas, principalmente en determinados lugares industriales ha conducido a un gran número de ellas, análogas en sus características morfológicas y bioquímicas, pero cada una con condiciones óptimas para determinada aplicación. Se ha llegado, incluso, a clasificar a las levaduras industriales en seis grupos: levaduras de cerveza ordinaria, "lager", de panificación, del vino, de alimentos y piensos y de destilación, Webb (1966).

Las levaduras de cerveza ordinaria son distintas variantes de *S. cerevisiae*, conocidas también como levaduras de "fermentación alta" para indicar su comportamiento durante una operación típica.

Las levaduras "lager" se emplean en el proceso tradicional de producción de cerveza "lager" que se realiza a una temperatura mucho más baja que el de la cerveza ordinaria y durante un período de tiempo más largo; por ello las levaduras deben resistir estas condiciones y asimismo sedimentarse en el fondo del fermentador al final del proceso. En esta aplicación se emplea la levadura *S. carlsbergensis* (*S. uvarum*).

Actualmente las "levaduras de panificación" son cepas cuidadosamente seleccionadas de *S. cerevisiae*. En décadas anteriores la levadura para esponjar el pan era sencillamente el exceso producido en la fermentación de la cerveza.

Las "levaduras que fermentan los vinos" son, en gran parte, propias de una determinada región y han sido conservadas de un año a otro, posiblemente durante siglos sin intervención alguna. Por lo general, son cepas mixtas que se clasifican como *S. ellipsoideces*.

Como es conocido, buena parte de la "levadura de alimentos y piensos" se obtiene en el proceso usual de fabricación de cerveza. En este proceso, la cantidad de levadura utilizada para iniciar la fermentación se recupera en una proporción cinco veces mayor. Mayoritariamente se emplea como levadura seca para piensos o como extracto de levadura para consumo humano. En este último caso, se provoca una autólisis de la masa húmeda con NaCl, para producir una mezcla parda viscosa conteniendo un porcentaje elevado de vitaminas del grupo B y otros factores esenciales del crecimiento. Para este uso también se utilizan, incluso con mejores resultados, cepas de *Candida*.

Hasta épocas recientes las "levaduras de destilación" han incluido casi exclusivamente cepas de *S. cerevisiae* con una tolerancia para cantidades altas de azúcar y etanol y que mostraban una elevada relación de transformación del sustrato empleado. Con menor frecuencia se han utilizado las levaduras *Schizosaccharomyces pombe*, *S. uvarum (carlsbergensis)* y *Kluyveromyces sp.* Además, una gran cantidad de especies distintas de estas levaduras se ha obtenido por manipulación genética, Stewart (1981). Actualmente existen gran número de géneros y especies capaces de realizar el proceso con rendimientos en etanol elevados.

Las levaduras del género *Saccharomyces* se reproducen por gemación y ascosporas (1-4 ascas). Las colonias son húmedas, blandas, de color crema o blancas en agar. Las levaduras del género *Candida* poseen yemas y micelio. Los cultivos en agar muestran colonias elevadas, cremosas, algunas de ellas forman proyecciones puntiagudas.

Las células individuales de levadura suelen ser esféricas, ovaladas o elipsoideas. Las levaduras no poseen flagelo por lo que las células son inmóviles de por sí.

En cuanto al tamaño, varía considerablemente en dimensiones según la especie, nutrición, edad y otros factores. En general, puede oscilar de 1 a 5 μ en anchura y de

1 a 10 μ en longitud. Las células esféricas de levaduras industriales tienen un diámetro medio de 4 a 6 μ ; pero puede haber grandes diferencias aun en un mismo cultivo, Prescott y Duun (1959).

Una pared transparente y permeable rodea cada célula. La membrana de la pared celulósica puede ser inapreciable o muy fina en las células jóvenes, pero se hace más gruesa en las células viejas.

Las levaduras tienen de un 68 a un 83% de humedad frente a un 73-98% que contienen las bacterias. El contenido en proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas varía considerablemente según la clase de levadura y las condiciones en que se han desarrollado. En general, se puede decir que las levaduras son ricas en proteínas y carbohidratos, Tabla 2.7.

TABLA 2.7

COMPOSICIÓN DE LAS LEVADURAS
(*Candida lipolytica*, *Candida utilis*)

	Contenido, % en peso
Proteínas	42-68
Carbohidratos	20-28
Lípidos	1,0-1,7
Cenizas	4-8
Ácidos nucleicos	6-11

Los compuestos de fósforo y potasio constituyen el 90% de las cenizas, desempeñando los fosfatos un importante papel en la fermentación.

Las proteínas de las levaduras son del tipo albúmina, globulina, fosfoproteínas, nucleoproteínas, glucoproteínas, etc. Derivados proteínicos solubles (peptonas, polipéptidos y aminoácidos) son constituyentes normales de las células. La composición en aminoácidos esenciales de las proteínas es también muy variable dependiendo del tipo de levadura y de las condiciones del proceso, Tabla 2.8, Shacklady (1969) y Jones (1974).

TABLA 2.8

AMINOÁCIDOS ESENCIALES EN PROTEÍNAS DE LEVADURAS

g en 100 g de proteínas

Aminoácidos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida lipolytica</i>	<i>Candida utilis</i>
Ile	4,6	5,3	3,8
Leu	7,4	7,8	7,6
Lys	7,7	7,8	4,8
Met	1,7	1,6	1,1
Phe	4,1	4,8	8,6
Thr	4,8	5,4	5,4
Trp	1,0	1,3	2,4

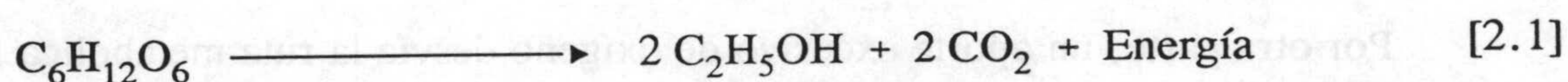
En general, las levaduras contienen todos los aminoácidos esenciales en una proporción aceptable. Cabe destacar los altos contenidos en lisina y treonina.

2.3.2 Principios básicos en fermentación etanólica

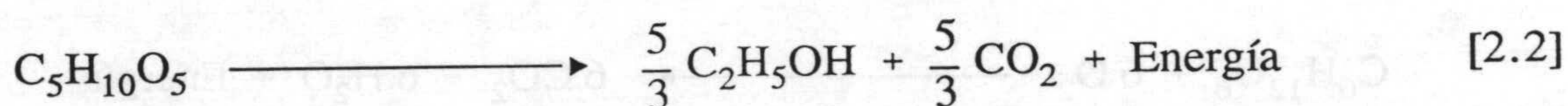
Cuando se cultivan microorganismos sobre azúcares en presencia de oxígeno, éstos obtienen material celular y energía por oxidación de dichos azúcares. Los electrones en exceso procedentes de la oxidación son cedidos a un sistema transportador hacia el oxígeno, aceptor final, y se forma agua. Sin embargo, existen microorganismos

capaces de crecer sobre azúcares en ausencia de oxígeno; durante este crecimiento anaeróbico, los electrones procedentes de la oxidación son cedidos a un sistema transportador que tiene como aceptor final un compuesto orgánico, formándose etanol en lugar de agua.

La reacción de fermentación etanólica cuando el sustrato, fuente de carbono, es la glucosa puede representarse por:



mientras que si el sustrato es xilosa:



Estas reacciones ocurren en ausencia de oxígeno y también a altas concentraciones de azúcar. Son llevadas a cabo por microorganismos anaerobios estrictos o facultativos.

El rendimiento teórico en ambas reacciones, (denominado frecuentemente coeficiente de Gay-Lussac, GL), es del 51,1% y representa la máxima eficiencia en la conversión. Este valor nunca se alcanza en la práctica, ya que los microorganismos emplean al menos un 5% de azúcar para producir material celular y productos minoritarios como xilitol, glicerol, ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, 2,3-butanodiol y determinados alcoholes superiores, Amin y col. (1983).

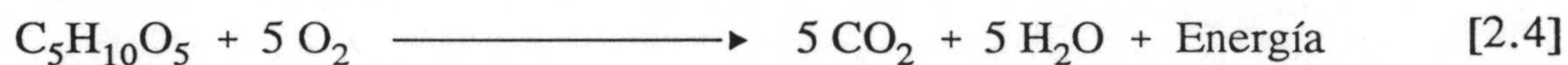
En la práctica industrial, cuando se utilizan sustratos no ideales, se mantienen conversiones próximas al 90% (del rendimiento teórico de GL) durante un razonable período de tiempo.

En el transcurso de la fermentación pueden producirse alteraciones que suelen ser debidas a la acción sobre los microorganismos de diversos factores, produciendo inhibición en el proceso. Los principales tipos de inhibición son:

a) Por sustrato: originada por efecto de la presión osmótica, que hace que las células sufran plasmólisis a concentraciones de azúcares superiores al 20%.

b) Por no disponibilidad adecuada de oxígeno: en ausencia de oxígeno, las células ven limitada su capacidad de crecimiento, ya que este elemento es indispensable en la producción de ácidos grasos poliinsaturados que juegan un importante papel en la síntesis celular.

Por otra parte, un aporte excesivo de oxígeno desvía la ruta metabólica hacia la respiración, con producción de dióxido de carbono y agua. Las reacciones en el caso de la oxidación completa de los sustratos, glucosa y xilosa respectivamente son las siguientes, Waehrer y Roehr (1981).



c) Por producto: es debido a que el etanol producido en la fermentación es tóxico para las levaduras, fundamentalmente a altas concentraciones, influyendo en la viabilidad y en las velocidades de crecimiento celular, consumo de sustrato y formación de producto.

Existen otras sustancias que ejercen influencia en la fermentación, como el dióxido de carbono que se desprende en el transcurso de la misma, aunque su mecanismo de actuación sobre los sistemas enzimáticos y la membrana celular no se conoce con precisión, Jones y Greenfield (1982).

2.3.2.1 Vías metabólicas en la degradación de hexosas

La vía metabólica de transformación de una hexosa en etanol en una levadura ha sido muy estudiada y actualmente es bien conocida. En principio, nos vamos a referir a D-glucosa, uno de los sustratos de partida utilizado en esta investigación.

En general, la fermentación etanólica de D-glucosa discurre por la vía de la fructosa bisfosfato (FBP), también denominada ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), aunque con frecuencia se nombra según su primer producto intermedio característico, la fructosa-1,6-bisfosfato.

La degradación de D-glucosa transcurre en las células fermentativas y en aquéllas que utilizan este monosacárido hasta CO₂, de forma común hasta el ácido pirúvico, Figura 2.4.

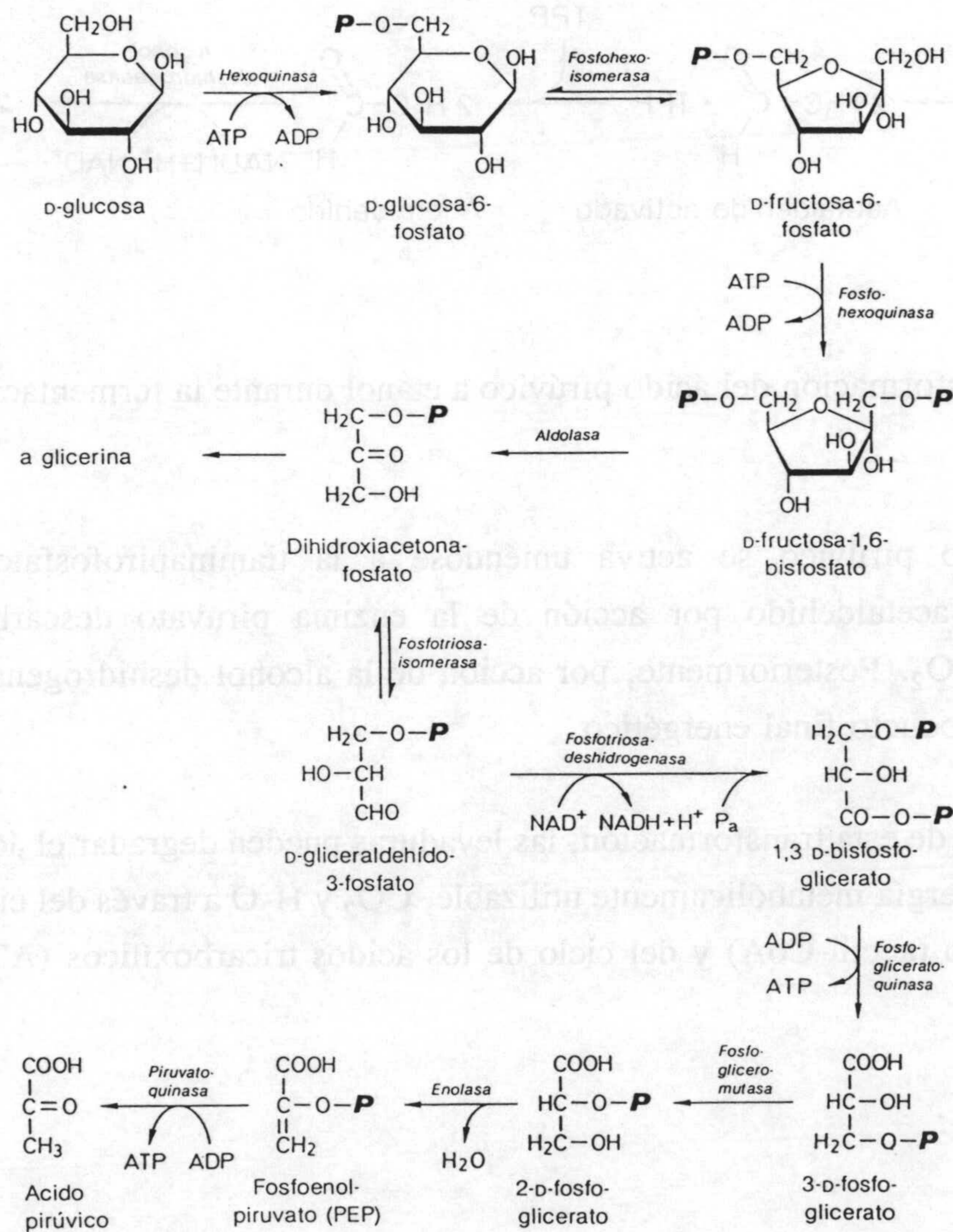


Fig. 2.4.- Vía de Embden-Meyerhof-Parnas degradativa de D-glucosa hasta ácido pirúvico.

La decarboxilación del ácido pirúvico a acetaldehído y la reducción de este hasta etanol (fermentación etanólica), es sin embargo exclusiva de las levaduras y de algunos hongos actinomicetos, Figura 2.5.

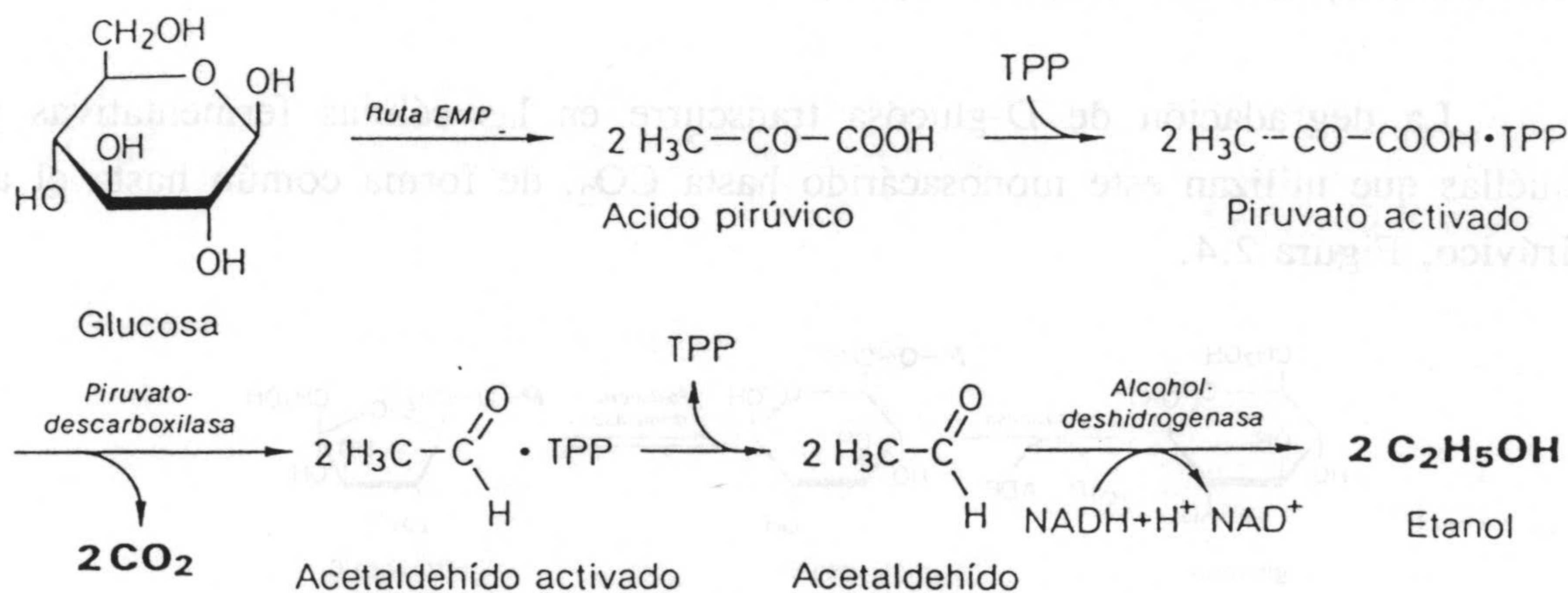


Fig. 2.5.- Transformación del ácido pirúvico a etanol durante la fermentación etanólica

El ácido pirúvico se activa uniéndose a la tiaminapirófosfato (TPP), se transforma en acetaldehído por acción de la enzima piruvato descarboxilasa con liberación de CO_2 . Posteriormente, por acción de la alcohol deshidrogenasa se forma etanol como producto final energético.

Además de esta transformación, las levaduras pueden degradar el ácido pirúvico para obtener energía metabólicamente utilizable, CO_2 y H_2O a través del ciclo del ácido acético activado (acetil-CoA) y del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ATC), Jagnow y col. (1991).

2.4 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS CON LEVADURAS

Las levaduras empleadas tradicionalmente en los procesos fermentativos, principalmente de los géneros *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces*, son capaces de fermentar una amplia gama de azúcares, aunque no xilosa, por lo que el aprovechamiento integral de los residuos lignocelulósicos, en los que la xilosa es la pentosa mayoritaria de la fracción hemicelulósica, debe contemplar la transformación de ésta en etanol. La fracción hemicelulósica puede suponer de un 15 a un 35% del total, Clausen y Garddy (1983).

2.4.1 Nutrientes, sustratos y levaduras específicas

Los requerimientos de nutrientes, utilizados en la síntesis de etanol, se corresponden con los componentes mayoritarios de la composición de las levaduras. Éstos incluyen carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno. En menor proporción se requieren cantidades de fósforo, azufre, potasio y magnesio, elementos que deben ser suministrados para la síntesis de componentes minoritarios. Sales minerales conteniendo Mn, Co, Cu, Zn ... y factores de crecimiento (aminoácidos, ácidos nucleicos y vitaminas) son también requeridos en cantidades trazas.

Con vistas a la producción de etanol a gran escala, algunas materias de origen agroalimentario pueden suministrar todos los nutrientes para el crecimiento de las levaduras, además de los carbohidratos para realizar la bioconversión. Es el caso de las melazas de la caña de azúcar (a veces diferenciadas entre melazas tipo A y C). En otros casos se requeriría un suplemento adicional de nutrientes. En general, estos nutrientes adicionales se pueden suministrar individualmente, como sales de amonio y/o fosfato potásico o bien por adición de otras materias de bajo coste.

Además de las melazas se suelen incluir como sustratos específicos los siguientes:

- Cereales. En base seca los granos de maíz, trigo y sorgo contienen aproximadamente el 60-75% (en peso) de almidón hidrolizable a hexosas, lográndose con estas materias primas un alto rendimiento en etanol. Igualmente, la hidrólisis de estos sustratos no presenta problemas importantes.
- Tubérculos. Entre ellos cabe destacar la mandioca, extensamente cultivada en países tropicales. Su composición media es: humedad 61%, almidón 30%, azúcares totales libres 3%, fibra 3%, cenizas 1% y otros 2%. Otro tubérculo de interés es la patata, Carrasco y col. (1985).

Después de estos tres tipos de sustratos específicos se incluirían los residuos celulósicos. La celulosa es la fuente potencial más abundante para su conversión a etanol. Su dificultad inicial estriba en la hidrólisis que es necesario realizar y que siempre va acompañada de hemicelulosas y ligninas. En general se ha indicado, Beck (1986), que el contenido total de carbohidratos en cualquier hidrolizado de residuo celulósico (biomasa) se podría distribuir como sigue: 60 % de glucosa, 25 % de xilosa y 15 % de mezcla de galactosa, manosa y arabinosa.

La caracterización a principios de los ochenta de levaduras capaces de producir, directamente y en concentraciones significativas, etanol a partir de xilosa, Du Preez y van der Walt (1983), Bruinenberg y col. (1983), ha suscitado un interés creciente por los residuos lignocelulósicos en la producción industrial de etanol. Así, la conversión de la fracción hemicelulósica junto con la de la celulósica, elevará los rendimientos globales de la transformación.

2.4.2 Fermentación con *Pachysolen tannophilus*

2.4.2.1 Características generales

Pachysolen tannophilus es conocida y estudiada para determinadas aplicaciones desde hace aproximadamente unos 30 años. Taxonómicamente se incluye en la subdivisión ascomycotina, clase ascomycetes, aunque su relación con otras levaduras de esta clase es incierta, Slininger y col. (1987). Sin embargo, parece tener algunos rasgos comunes en cuanto a su evolución con otras levaduras de esta clase y de los géneros *Pichia* y *Hansenula*. Actualmente son conocidas de forma natural cinco especies de *Pachysolen tannophilus* (Y-2460, Y-2461, Y-2462, Y-2463, Y-6704, denominación empleada por ARS Culture Collection, Northern Regional Research Center, NRRL, Peoria, Illinois, USA).

Como característica fisiológica más importante, se ha indicado que, excepto la especie Y-2460 que es predominantemente diploide, las restantes son haploides.

2.4.2.2 Vías metabólicas

En general, las fermentaciones de hexosas son bien conocidas y el metabolismo implicado se ha estudiado con profundidad. Sin embargo, las fermentaciones de pentosas con levaduras son un aspecto que se puede considerar reciente y en fase de estudio.

Entre las primeras aportaciones sobre este tema cabe destacar las realizadas por Chiang y Knight (1960), que encontraron que el hongo *Penicillium chisogenum* disponía de una secuencia de enzimas, en los primeros pasos del metabolismo de las pentosas, que difería de lo que sucedía en las bacterias, donde para el caso de la xilosa únicamente tenía lugar la isomerización de este azúcar. El hongo producía un compuesto intermedio, xilitol, y este hecho indujo a los autores a pensar que la xilosa se metabolizaba vía las enzimas xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, Figura 2.6. Asimismo, Chiang y Knight encontraron que estas enzimas eran comunes a levaduras y hongos filamentosos.

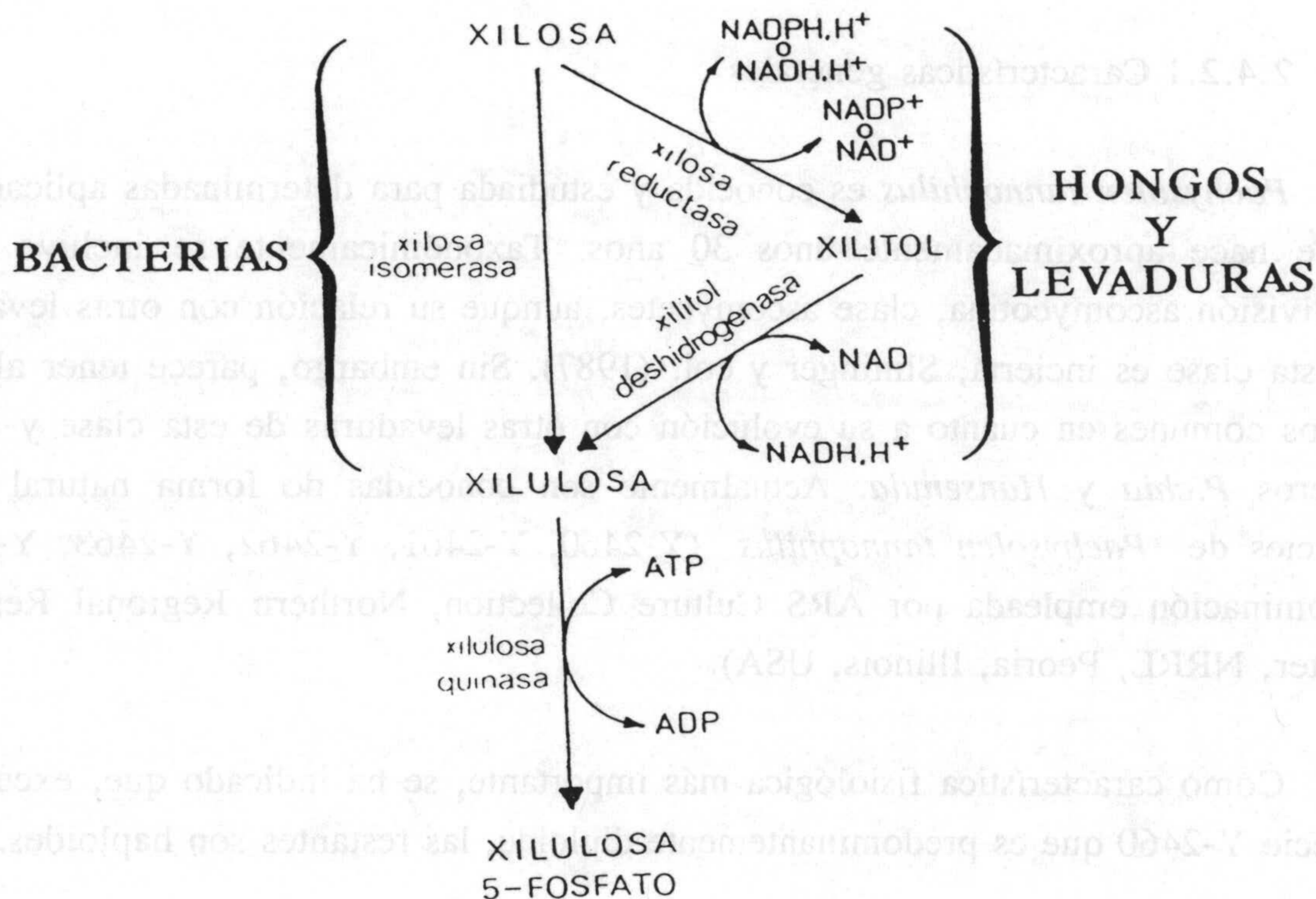


Fig. 2.6.- Conversión de xilosa a xilulosa-5-fosfato

En el caso de *Pachysolen tannophilus*, quizá por ser una levadura caracterizada por su gran capacidad de fermentar xilosa, estos estudios han tenido mayor interés y durante los últimos años se están realizando aportaciones importantes.

En este sentido, Dellweg y col. (1982) sugieren que la vía de la pentosa fosfato, junto con la glucólisis y la vía del fosfogluconato son sistemas utilizados en *Pachysolen tannophilus* para la producción de etanol y xilitol utilizando xilosa como sustrato.

Por otra parte, se ha comprobado que la xilosa es requerida para la propia síntesis de las enzimas xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, puesto que estas enzimas casi no están presentes en la fermentación con glucosa, Bruinenberg y col. (1983).

Más recientemente, Slininger (1987) trabajando con una especie concreta, Y-2460 (NRRL), ha propuesto que una vez formada la xilulosa-5-fosfato su metabolismo involucra tres sistemas enzimáticos: vía de la pentosa fosfato (PP), vía de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (ATC), Figura 2.7. Sin embargo, sugiere que otros caminos o vías alternativas más oscuras y menos estudiadas podrían tener un papel importante.

2.4.2.3 Influencia de las condiciones de operación en el crecimiento

Pachysolen tannophilus ha sido descrita como capaz de transformar glucosa y xilosa en etanol, Slininger (1982), así como otros monosacáridos: D-manosa y D-galactosa e incluso D-celobiosa y L-arabinosa, Neirinck y col. (1982). Igualmente, Schneider y col. (1981) y Jeffries (1982) comprobaron que esta transformación puede realizarse también en determinadas condiciones aerobias.

Entre las variables de operación que más pueden influir en un proceso de fermentación discontinua con levaduras se encuentran la temperatura, el nivel de aireación y el pH del medio de cultivo.

La temperatura afecta a la naturaleza y mecanismos de regulación del metabolismo, a la permeabilidad celular, a las necesidades nutritivas y va a incidir de forma importante en las velocidades de las reacciones celulares. A diferencia de otros parámetros, como el pH, la temperatura de las células y del medio de cultivo coinciden. En el estudio realizado, esta variable se ha mantenido constante a un valor adecuado, previamente seleccionado.

La aireación en una fermentación va a aportar el pequeño suministro de oxígeno necesario para que la levadura realice su actividad metabólica. Al mismo tiempo, la aireación junto con la agitación mecánica va a mantener una distribución uniforme de células en el biorreactor. En ausencia de agitación mecánica, la aireación podría desempeñar ambas funciones. Fundamentalmente, el oxígeno es requerido por la levadura para la biosíntesis de grasas poliinsaturadas. El contenido normal de oxígeno en el medio de cultivo debe ser equivalente a una presión de 0,05-0,10 mm de Hg, Kosaric y col. (1983). Presiones superiores pueden favorecer la formación de biomasa

a costa de disminuir la productividad en etanol, fenómeno conocido como efecto Pasteur.

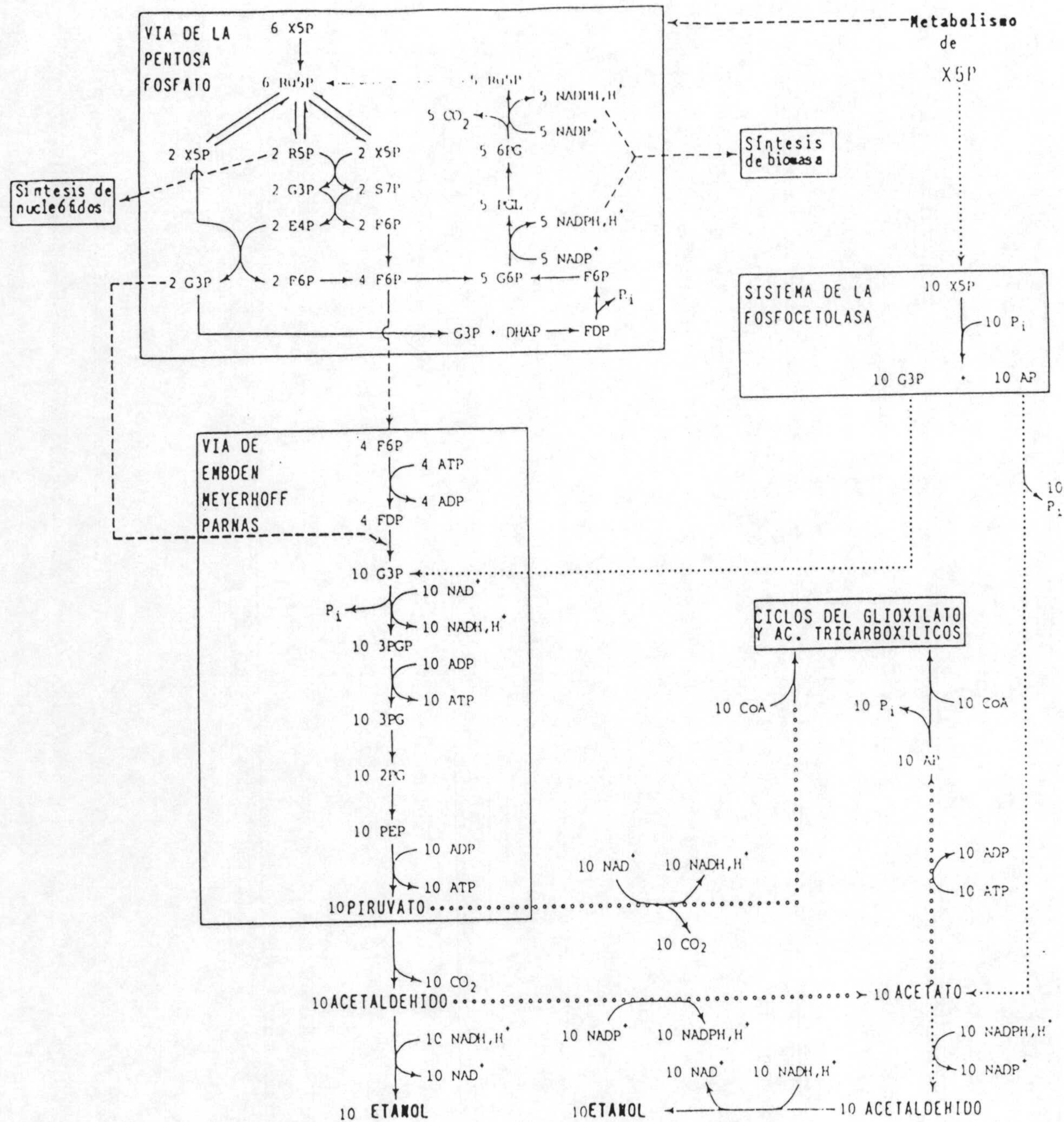
En general, para cualquier microorganismo existe un rango amplio de pH en el que la velocidad de crecimiento varía muy poco. Para las levaduras, este rango suele estar centrado en torno a pH 4-6, intervalo en el que se encontrará el pH óptimo, Quintero (1981).

En un trabajo anterior, Castro Vico (1987), con *P. tannophilus* y D-glucosa como fuente de carbono, se determinaron las condiciones de temperatura, pH y caudal de aire más adecuadas de crecimiento del microorganismo para la producción de etanol.

En cuanto a la temperatura como variable de operación, los mayores valores con respecto a las velocidades específicas máximas se encuentran entre 30 y 35°C para el crecimiento, en 25°C para el consumo de sustrato y en 30°C para la producción de etanol, mientras que los rendimientos en biomasa y en etanol son prácticamente constantes. La aireación exclusiva por el vórtice de agitación, sin aporte externo de oxígeno, proporciona el valor más elevado en cuanto a velocidad máxima de producción de etanol. Con respecto al pH inicial, se comprobó que los valores entre 1,5 y 3,5 son los más adecuados, atendiendo a la velocidad máxima de producción de etanol.

Estas condiciones de operación son prácticamente coincidentes con las recomendadas por Slininger y col. (1982a) para la fermentación etanólica de xilosa con *P. tannophilus*.

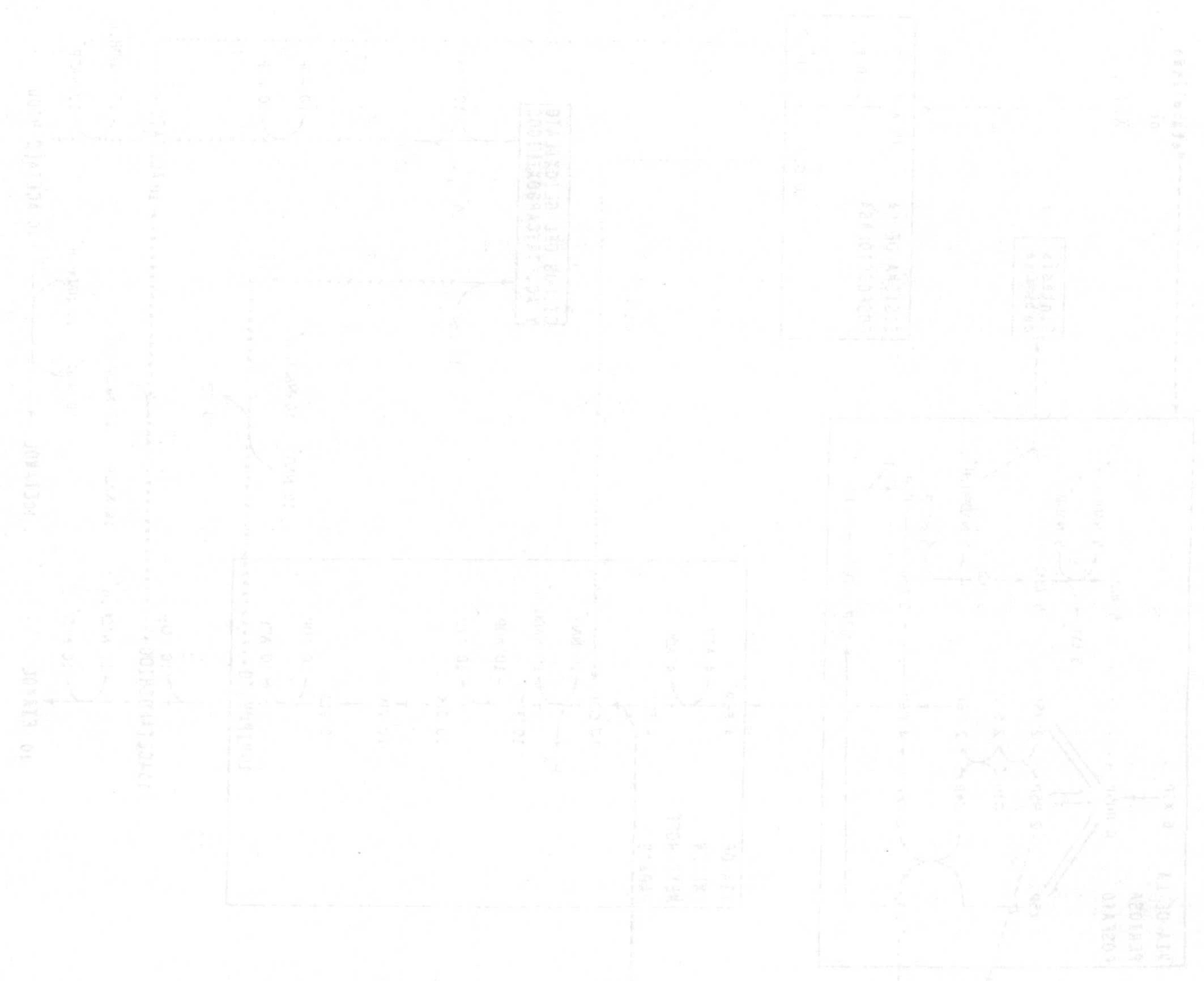
Empleando D-xilosa como sustrato a una concentración inicial de 50 Kg·m⁻³, Slininger y col. (1982), usando la especie *P. tannophilus* (NRRL Y-2460), encuentran que las condiciones óptimas en cuanto al rendimiento y velocidad específica de producción de etanol son: temperatura 32°C y pH 2,5; observaron, además, que no era necesario aporte de oxígeno para la producción de etanol, pero sí cuando se trataba de formación de biomasa, sobre todo en los primeros momentos del crecimiento. El caudal de aire utilizado en todos sus experimentos fue de 0,075 v/v/min. En las condiciones t^a=32°C y pH=2,5, el rendimiento en etanol fue 0,28 (Kg etanol)·(Kg xilosa)⁻¹, la velocidad específica de crecimiento de 0,24 h⁻¹ y las velocidades específicas de consumo de D-xilosa y formación de etanol de 0,49 y 0,12 Kg·Kg⁻¹·h⁻¹, respectivamente. Es



- AP = Acetilfosfato
- DHAP = Dihidroxi-acetona fosfato
- E4P = Eritrosa 4-fosfato
- FDP = Fructosa difosfato
- F6P = Fructosa 6-fosfato
- G3P = Gliceraldehído 3-fosfato
- G6P = Glucosa 6-fosfato
- PEP = Fosfoenolpiruvato
- 2PG = 2-fosfoglicerato
- 6PG = 6-fosfoglucononato
- PGL = 6-fosfogluconolactona
- 3PGP = Fosfoglicerol fosfato
- R5P = Ribosa 5-fosfato
- Ru5P = Ribulosa 5-fosfato
- S7P = Sedoheptulosa 7-fosfato
- X5P = Xilulosa 5-fosfato

Fig. 2.7.- Vías alternativas para el metabolismo de xilosa 5-fosfato para *Pachysolen tannophilus*

Handwritten text at the top of the page, possibly a title or header, oriented vertically.



Handwritten text on the right side of the page, oriented vertically, possibly a list of items or a table of contents.

necesario señalar que utilizan un medio de cultivo bastante enriquecido en micronutrientes. Asimismo, se observa que para la elección del pH su estudio podría ser realizado con mayor profundidad, sobre todo en la zona de mayor interés, entre 2,5 y 5,5.

Tal como se indicó anteriormente, las condiciones de aireación son de gran importancia cuando se fermentan azúcares con *P. tannophilus*. La influencia de este parámetro sobre el crecimiento y la producción de etanol es objeto de estudio por algunos grupos de investigación, Schneider y col. (1981), Delgenes y col (1985), Slininger y col. (1987). Se observa que un caudal elevado de aire (condiciones plenamente aeróbicas) desplaza el crecimiento hacia la formación de biomasa, en detrimento de la formación de etanol. Sin embargo, es necesario un nivel mínimo de aireación para una conversión eficiente de D-xilosa en etanol.

2.4.2.4 Influencia de la composición del medio sobre el crecimiento.

Distintos medios de cultivo han sido usados para el estudio de la fermentación con *Pachysolen tannophilus*. Los sustratos más utilizados como fuente de carbono han sido xilosa y glucosa, en un rango de concentraciones de 0 a 255 Kg·m⁻³. Las fuentes de nitrógeno empleadas son muy distintas, siendo las más frecuentes urea, Slininger y col. (1982) y (NH₄)₂SO₄, Jeffries (1982). Las fuentes de carbono e hidrógeno van a influir de forma importante en la actividad de las enzimas de la vía de la pentosa fosfato y consecuentemente en los rendimientos en biomasa y en etanol obtenidos.

Una característica común en todos los casos ha sido el utilizar medios ricos en extracto de levadura. Este componente va a suministrar las vitaminas necesarias (fundamentalmente tiamina y biotina) para el crecimiento de esta levadura, Neirinck y col. (1982).

En un trabajo anterior, Castro Vico (1987), utilizando glucosa como sustrato a concentraciones iniciales en el rango de 1 a 200 Kg·m⁻³ se dedujo que la velocidad específica de crecimiento, μ_m , era prácticamente constante entre 1 y 100 Kg·m⁻³, para disminuir a 200 Kg·m⁻³; la velocidad específica de consumo de sustrato, q_s , decrecía

entre 1 y 200 $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$, mientras que la velocidad específica de producción de etanol, q_E , aumentaba entre 5 y 25 $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ y ya de forma poco significativa entre 100 y 200 $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$. El rendimiento en biomasa disminuía continuamente con la concentración inicial de glucosa, g_o , y el rendimiento en etanol, $Y_{E/s}$, se mantenía prácticamente constante hasta consumos del orden de 35 $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$; a valores superiores, para $g_o=100$ y 200 $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$, $Y_{E/s}$ disminuía, lo que indicaba una posible inhibición por glucosa a estas concentraciones más elevadas.

Resultados similares se han obtenido cuando la xilosa se ha utilizado a concentraciones comprendidas entre 55 y 255 $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$. En este rango de concentraciones μ_m , q_s , q_E y $Y_{E/s}$ disminuyen al aumentar la concentración inicial de xilosa, Slininger y col. (1982).

Cuando el sustrato era glucosa ($g_o=25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$) y la concentración de extracto de levadura, l_o , se modificó entre 0 y 6 $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$, se observó que μ_m permanecía prácticamente constante, mientras que q_s , q_E y $Y_{x/s}$ aumentaban con la concentración inicial de extracto de levadura hasta $l_o=4 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$. El rendimiento en etanol no se afectó por la reducción de l_o , salvo cuando ésta es nula, en cuyo caso descendió fuertemente hasta un valor de 0,1 ($\text{Kg etanol}\cdot(\text{Kg glucosa})^{-1}$), Bravo y col. (1989).

Los bioproductos excretados por *Pachysolen tannophilus* y los nutrientes consumidos por éste van modificando la composición del medio de cultivo con respecto al comienzo del experimento cuando se trata de un cultivo discontinuo. Al igual que en otras levaduras, el producto mayoritario, etanol, va a ejercer un efecto tóxico importante cuando en el medio se alcancen determinadas concentraciones. El máximo pico de etanol observado en *Pachysolen tannophilus*, 38 $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$, fue obtenido a 25°C, pH=4,5 y una concentración inicial de xilosa de 250 $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$, Slininger y col. (1982). Estos autores observaron que la velocidad específica de crecimiento disminuía de 0,31 a 0,08 h^{-1} cuando la concentración en etanol aumentaba de 0 a 34 $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$, indicando que a partir de 20 $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ de etanol comienzan a afectarse las velocidades específicas de producción de etanol y de consumo de xilosa, Slininger y col. (1987).

Una de las mayores contrapartidas frente a las ventajas indicadas en la fermentación etanólica con *Pachysolen tannophilus* es el hecho de que, paralelamente a la producción de etanol, se forma xilitol en concentraciones que pueden variar

dependiendo de las condiciones de operación y de la composición del medio de cultivo, pudiéndose alcanzar rendimientos de hasta $0,3 \text{ (Kg xilitol)·(Kg xilosa)}^{-1}$ en las condiciones más desfavorables, Alexander (1986).

Finalmente, en relación con la composición del medio de cultivo hay que indicar que en la fermentación con medios no definidos, sino en medios reales en los que participan componentes procedentes de la hidrólisis de residuos lignocelulósicos, aparecen determinados compuestos que parecen inhibir el crecimiento de *Pachysolen tannophilus* y por tanto el desarrollo de la fermentación. McCaskey y col. (1986), empleando H_2SO_4 al 0,5% y una presión de 4,3 MPa durante 3 minutos, obtuvieron una disolución que contenía: 35 Kg·m^{-3} de D-xilosa, 4 Kg·m^{-3} de D-glucosa y otros azúcares en menor proporción; pero además existían 2 Kg·m^{-3} de furfural, 12 Kg·m^{-3} de ácido acético y 6 Kg·m^{-3} de compuestos fenólicos. Estos dos últimos componentes, en la proporción indicada, provocaban una inhibición total de *Pachysolen tannophilus*, mientras que el furfural no provocaba inhibición alguna.

Estos hechos han dado lugar a numerosos trabajos que tratan de separar del hidrolizado estos inhibidores, como paso previo a la fermentación con *Pachysolen tannophilus*. En este sentido, sería conveniente la puesta a punto de procesos de hidrólisis que no provocasen la aparición de estos inhibidores o que su proporción fuese mínima. En esta línea, el uso de ácido trifluoroacético a una concentración entre 0,1 y 1 N, en el proceso de hidrólisis, rinde una disolución con alto contenido en xilosa y mínima degradación de la lignina, lo cual evita la aparición de inhibidores. Este proceso es seguido por un tratamiento con celulasas que completa la conversión de celulosa en glucosa, Fanta y col. (1984). Posteriormente, el hidrolizado obtenido fue fermentado con *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460 y los resultados fueron similares a los obtenidos por Detroy y col. (1981) en la fermentación de xilosa pura, alcanzándose un rendimiento de $0,24 \text{ (Kg etanol)·(Kg pentosa)}^{-1}$ consumido al cuarto día del comienzo del experimento.

2.4.3 Fermentación con *Candida shehatae*

Entre las distintas especies de *Candida*, la más frecuentemente empleada es la cepa C.s.-22984, procedente de la colección americana ATCC. Además, las distintas especies que suelen encontrarse en la bibliografía se muestran en la Tabla 2.9.

Especie (cepa)	Colección/ Procedencia	Referencias
C.s.- 22984	ATCC	Wayman y Parekh (1985); Alexander y col (1987); Prior y col. (1988); Girio y col. (1989)
C.s.- 5813	CBS	Slininger y col. (1985); Bruinenberg y col. (1984)
C.s.- 2779	CBS/CSIR Y-492	Ligthelm y col. (1988)
C.s.- 7126	CBS/CSIR Y-633	Ligthelm y col. (1988)
C.s.- Y981 (117A/1)	CSIR	Du Preez y col. (1989)
C.s.- Y978 (57D)	CSIR	Du Preez y col. (1989)

Los resultados obtenidos por Alexander y col. (1988) en *Candida shehatae*, empleando como fuente de carbono xilosa en unos experimentos y glucosa en otros, indican que las enzimas xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa son inducidas por la xilosa y están prácticamente ausentes en células que crecen sobre glucosa. En cambio, los niveles de alcohol deshidrogenasa son más altos en células creciendo sobre glucosa que en células cuya fuente de carbono es xilosa.

Candida shehatae parece mostrar diferente capacidad fermentativa cuando crece bajo distintas condiciones de aireación. La mayor o menor presencia de estas enzimas también está directamente relacionada con el carácter fermentativo del metabolismo, existiendo un bajo nivel de enzimas en condiciones completamente aerobias, un alto valor en condiciones anaerobias y niveles intermedios bajo condiciones semi-anaerobias.

Una vez formada la xilulosa-5-fosfato, en *Candida shehatae*, al igual que en *Pachysolen tannophilus*, el metabolismo podría involucrar los tres sistemas enzimáticos comentados: vía de la pentosa fosfato, vía de Embden-Meyerhof-Parnas y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC).

Para *Candida shehatae* la temperatura óptima encontrada por Skoog y Hahn-Hägerdal (1988) está entre 30-32°C.

El efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre el metabolismo de D-xilosa y D-glucosa en *Candida shehatae*, ha sido estudiado siendo su suministro innecesario, en principio; sin embargo se estimula la producción de etanol cuando se suministra oxígeno y se emplean estos azúcares, Ligthelm y col. (1988). En este mismo sentido, Delgenes y col. (1986) muestran que en condiciones limitadas de suministro de oxígeno existe algún crecimiento pero no se observa producción de etanol, indicando que el mínimo nivel de aireación para una conversión eficiente de D-xilosa en etanol debe ser superior a 0,02 v/v/min.

Por otra parte, a niveles de aireación altos Sreenath y Jeffries (1987) trabajando con *Candida shehatae*, en un fermentador continuo y a velocidades de dilución elevadas, obtienen valores bajos para la productividad y el rendimiento en etanol.

Estos trabajos muestran la necesidad de llegar a un valor óptimo en el caudal de aire que es necesario suministrar para alcanzar la máxima productividad y rendimiento en etanol; además es necesario considerar que el oxígeno disuelto procede no sólo del caudal de aire suministrado como tal, sino también del que entra por el propio vórtice creado por la agitación mecánica.

El pH más adecuado para el crecimiento de *Candida shehatae* sobre xilosa está entre 3,5-4,5, du Preez y col. (1984).

2.4.4 Fermentación con *Pichia stipitis*

Esta levadura parece proceder de una de las supuestas etapas teliomórficas (finales en la reproducción) de *Candida shehatae*, con prometedoras ventajas para la producción de bioetanol a partir de xilosa, Bruinenberg y col. (1984), Toivola y col. (1984), Dellweg y col. (1989).

En la bibliografía reciente es usual encontrarse con distintas mutantes, variedades o procedencias de *Pichia stipitis*. Entre las más frecuentes cabe destacar las que se muestran en la Tabla 2.10.

Especie (cepa)	Colección/ Procedencia	Referencias
P.s.- Y7124	NRRL	Slininger y col. (1985); Linko y col. (1986); Delgenes y col. (1989)
P.s.- 5773	CBS	Dellweg y col. (1989); Grootjen y col. (1990)
P.s.- Y633	CBS/CSIR (CBS 7126)	Ligthelm y col. (1988); Du Preez y col. (1989)
P.s.- 4374	IGC	Kilian y col. (1988)
P.s.- 5776	CBS	Wayman y col. (1987)

En esta levadura, al igual que en *Pachysolen tannophilus*, para la degradación de D-xilosa no se requiere necesariamente oxígeno; sin embargo, unas condiciones semiaeróbicas (utilizando una aireación limitada y controlada) podría dar lugar a unos valores altos de velocidad específica de producción y del rendimiento en etanol, Bruinenberg y col. (1983), Chung y Lee (1986).

En los últimos años distintos grupos de investigación han tratado de conocer o aclarar ciertos aspectos de la vía metabólica por la cual D-xilosa se transforma en etanol. Entre estos grupos cabe destacar el de Dellweg y col. (1989), que aíslan y

purifican dos de las enzimas claves involucradas en esta transformación, xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa. Estos autores determinan los parámetros cinéticos de dichas enzimas bajo condiciones de equilibrio, Rizzi y col. (1989b).

El proceso de transformación parece ser muy similar al descrito con *Pachysolen tannophilus*. Es decir, que la degradación de D-xilosa hasta xilulosa-5-fosfato implicaría a estas dos enzimas claves, de acuerdo con lo indicado en la Figura 2.6, que también se podría poner de la forma:

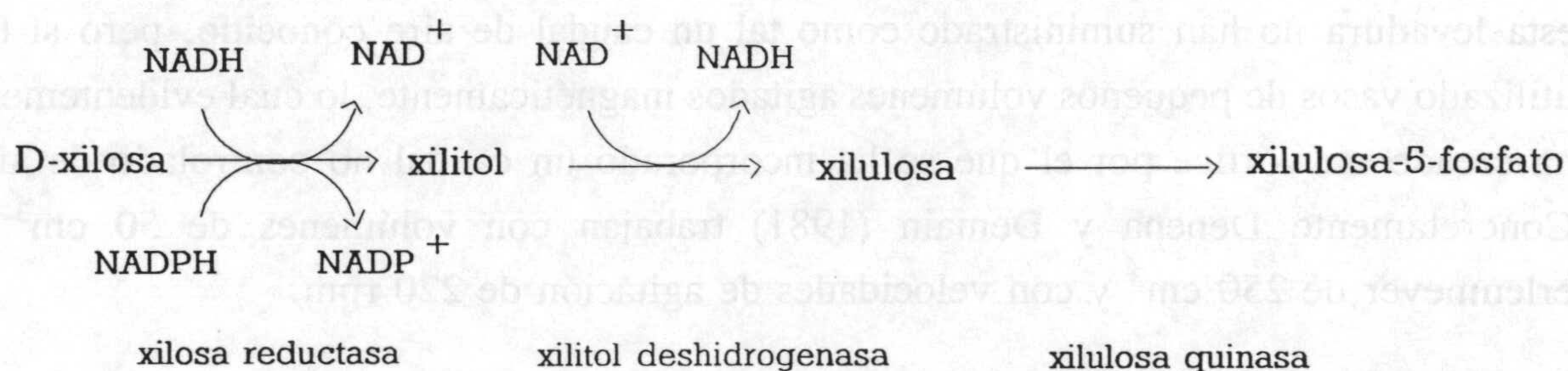


Fig. 2.8.- Vía metabólica de la degradación de D-xilosa hasta xilulosa-5-fosfato en *Pichia stipitis*.

Además, Dellweg y col. confirman que la deshidrogenación de xilitol a xilulosa es la etapa controlante en cuanto a la velocidad del proceso, observando que en condiciones completamente aerobias, D-xilosa es metabolizada casi exclusivamente por reducción empleando NADPH como donante electrónico, mientras que en ausencia de oxígeno, el 85% de D-xilosa es reducido con NADH como coenzima.

Al igual que en *Pachysolen tannophilus*, la formación de las enzimas xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa es inducida por el propio consumo de D-xilosa.

2.4.5 Fermentación con *Hansenula polymorpha*

En *Hansenula polymorpha* la información relacionada con el metabolismo de las pentosas es muy escasa. En principio, cabe pensar en la vía propuesta por Chiang y Knight para el caso general de las levaduras, y en el tramo correspondiente hasta la formación de la xilulosa-5-fosfato.

En cuanto a la influencia del nivel de aireación, los autores que han trabajado con esta levadura no han suministrado como tal un caudal de aire conocido, pero sí han utilizado vasos de pequeños volúmenes agitados magnéticamente, lo cual evidentemente ha creado un vórtice por el que se ha incorporado un caudal no controlado de aire. Concretamente Denena y Demain (1981) trabajan con volúmenes de 50 cm³ en erlenmeyer de 250 cm³ y con velocidades de agitación de 220 rpm.

Sobre el crecimiento de *Hansenula polymorpha*, en general existe poca información. Algunos autores que han utilizado esta especie sobre glucosa han seleccionado como valor más adecuado un pH de 5,5, Levine y Cooney (1973), Denena y Demain (1981).

2.5 OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN

Este trabajo constituye una contribución al estudio de la fermentación de disoluciones de azúcares utilizando levaduras que han sido descritas como capaces de fermentar tanto glucosa como xilosa.

En un primer trabajo, Castro Vico (1987) se trató la fermentación de disoluciones de glucosa con *Pachysolen tannophilus*, y como continuación de aquella investigación, se ha realizado el estudio de disoluciones de xilosa, azúcar mayoritario una vez que se ha realizado la hidrólisis de un residuo lignocelulósico, y de disoluciones de xilosa+glucosa, por *Hansenula polymorpha*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* y *Pichia stipitis*.

Al igual que en la fermentación de glucosa, se decidió utilizar el cultivo discontinuo y seguir el proceso mediante la determinación experimental de las siguientes variables:

- Concentración de biomasa.
- Concentración de etanol producido.
- Concentración de xilosa residual en el medio de cultivo.
- Concentración de glucosa residual en el medio de cultivo.
- Concentración de xilitol producido.
- pH en el transcurso del experimento.

El plan de trabajo se ha llevado a cabo con la realización de dos series de experimentos con cada una de las cuatro levaduras en las que se han abordado:

- La influencia del pH inicial en el intervalo de 1,5 a 6,5.
- El efecto de la aireación en el intervalo 0,0 a 0,3 v/v/min.

Y de una tercera serie experimental, desarrollada con *Candida*, *Pachysolen* y *Pichia*, en la que se ha estudiado la influencia de la composición del medio de cultivo en cuanto a la proporción inicial de xilosa y glucosa, empleándose una concentración

total de sustrato de $25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$, excepto en los experimentos realizados en ausencia de azúcares.

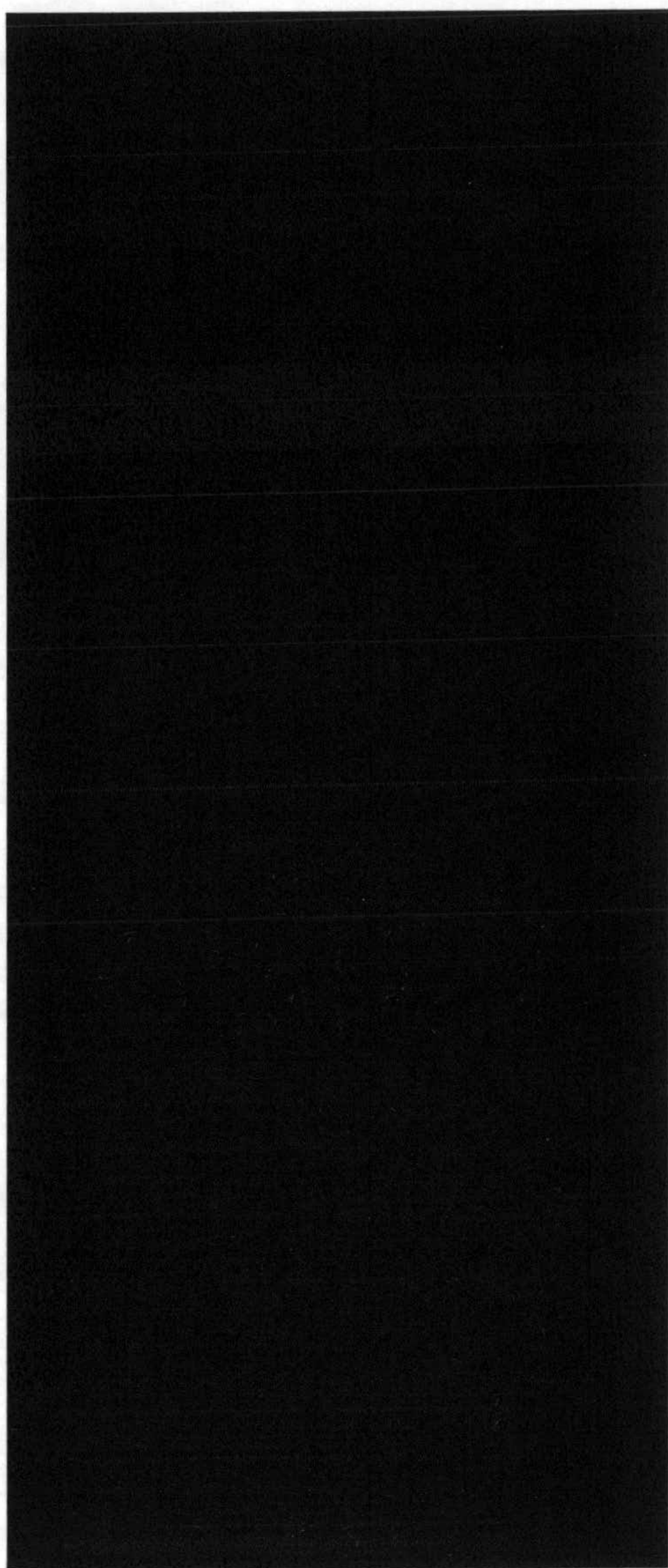
Previamente, y también en otro trabajo anterior, Bravo y col. (1987), se había determinado 30°C como la temperatura más adecuada para la fermentación de disoluciones de xilosa con *Pachysolen tannophilus*.

En las tres series de experimentos se ha utilizado el medio de cultivo descrito por Lindegren y col. (1958), una temperatura de 30°C y una agitación en el fermentador de 500 rpm.

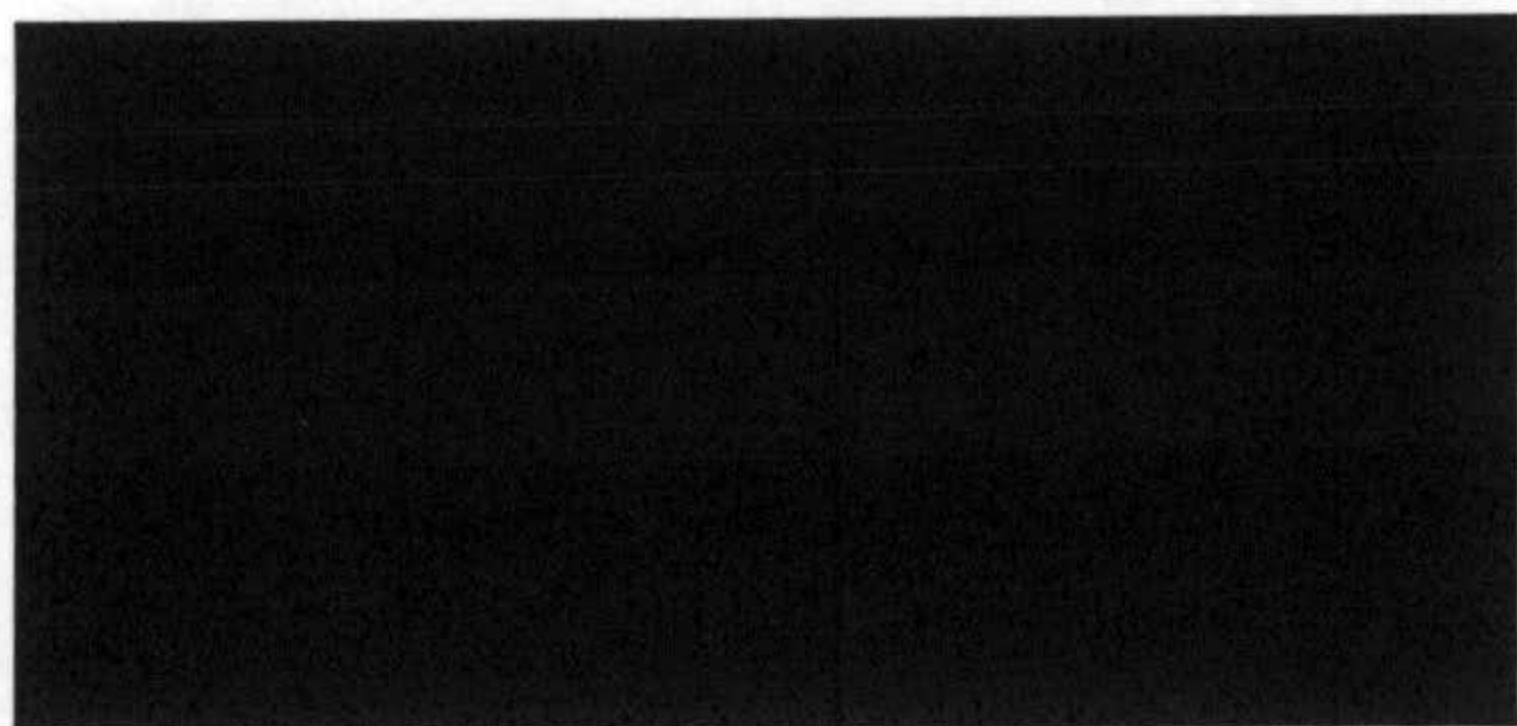
A partir de los resultados experimentales se calculan los parámetros: velocidades específicas de crecimiento, de consumo de sustrato y de producción de etanol, productividades en biomasa y los rendimientos en biomasa, etanol y xilitol.

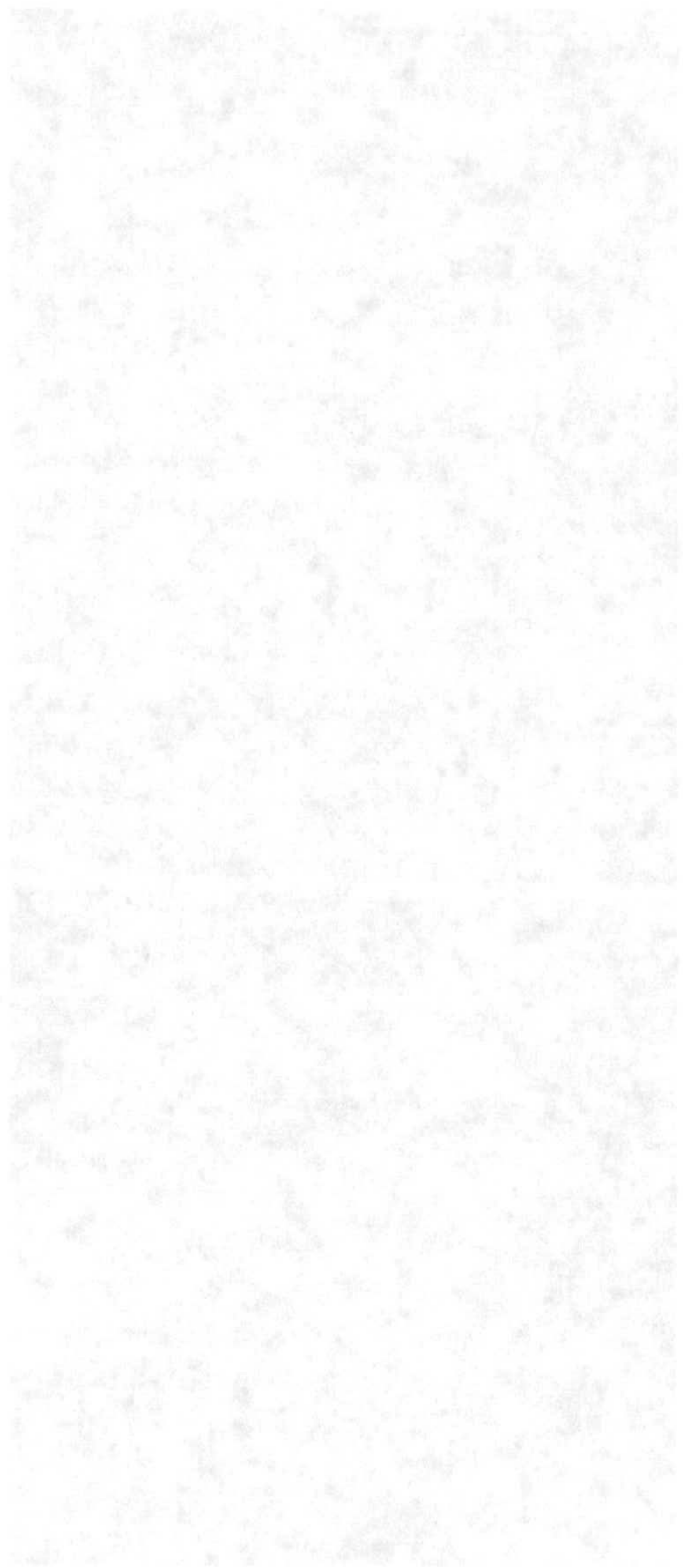
Los resultados obtenidos permiten establecer las condiciones más favorables de operación (pH inicial y nivel de aireación) y de composición del medio de cultivo (proporción inicial de sustratos) para la fermentación de disoluciones de xilosa y de xilosa+glucosa, para cada una de las levaduras ensayadas, fundamentalmente en base a los valores más elevados de la velocidad específica de formación de producto y del rendimiento en etanol.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
[26 MAR. 1993]
COMISION DE DOCTORADO



3. TÉCNICA EXPERIMENTAL





17/11/2020

17/11/2020



3.1 REACTIVOS QUÍMICOS

Los reactivos utilizados y sus características se indican a continuación:

1. Ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoico, P.A., ($C_7H_4N_2O_7$), Merck.
2. Ácido sulfúrico, P.A., (H_2SO_4), 96%, Carlo Erba.
3. Agar-Agar, purísimo, Panreac.
4. Alcohol n-amílico, purísimo, ($C_5H_{11}OH$), Panreac.
5. Amonio sulfato, P.A., ($(NH_4)_2SO_4$), Probus.
6. Azul de metileno, D.C., ($C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot xH_2O$), Panreac.
7. Cobre sulfato pentahidratado, purísimo, ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), Carlo Erba.
8. Extracto de levadura, BBL.
9. Extracto de malta, Merck.
10. Fenol, P.A., (C_6H_5OH), Carlo Erba.
11. D-Glucosa, anhidra, P.A., ($C_6H_{12}O_6$), Panreac.
12. Iodo, P.A., (I_2), Panreac.
13. Magnesio sulfato heptahidratado, P.A., ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 99,5%, Carlo Erba.
14. Peptona universal M66, Merck.

15. Reactivo enzimático de determinación de etanol, N° Cat. 176290, Boehringer Mannheim.
16. Reactivo enzimático de determinación de glucosa, N° Cat. 716251, Boehringer Mannheim.
17. Reactivo enzimático de determinación de xilitol/ sorbitol, N° Cat. 670057, Boehringer Mannheim.
18. Silicona líquida antiespumante, Panreac.
19. Sodio hidróxido, P.A., (NaOH), 99%, Merck.
20. Sodio sulfito heptahidratado, P.A., (Na₂SO₃·7H₂O), Carlo Erba.
21. Sodio y potasio tartrato tetrahidratado, P.A., 99%, (COOK(CHOH)₂COONa·4H₂O), Carlo Erba.
22. D-Xilosa anhidra, purísima, (C₅H₁₀O₅), Panreac.
23. Xilitol anhidro, (C₅H₁₂O₅), Sigma.

3.2 DESCRIPCIÓN DE LA INSTALACIÓN EXPERIMENTAL

Todos los experimentos de crecimiento de microorganismos se han realizado en una instalación diseñada para tal fin, situada en las dependencias del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Experimentales de Jaén.

La Figura 3.1 muestra un esquema de dicha instalación, cuyos elementos se describen a continuación:

1. Bomba-compresor, Rena modelo 301, con regulador de caudal. Por medio de ella se introduce aire en los cultivos suministrando el oxígeno necesario.
2. Filtro con algodón hidrófobo. Su misión es retener las impurezas que puedan acompañar al aire.
3. Columna estabilizadora que contiene agua, lo que posibilita conocer la presión de salida y la pérdida de carga originada por la instalación. Mantiene constante la presión en el distribuidor de gas, permitiendo regular independientemente los caudales de aire en cada vaso de cultivo.
4. Frasco lavador en el que el aire se humidifica a la misma temperatura del experimento, evitando las pérdidas posteriores de agua del medio de cultivo por el burbujeo en los vasos de crecimiento.
5. Distribuidor de aire con una entrada y tres salidas que permiten dividir el caudal de aire en tres flujos en dirección a cada uno de los vasos de cultivo.
6. Válvulas de regulación y control, situadas en cada una de las salidas del distribuidor y que permiten ajustar el caudal de aire.
7. Diafragmas intercalados en las conducciones de aire, determinan una diferencia de presión medible.

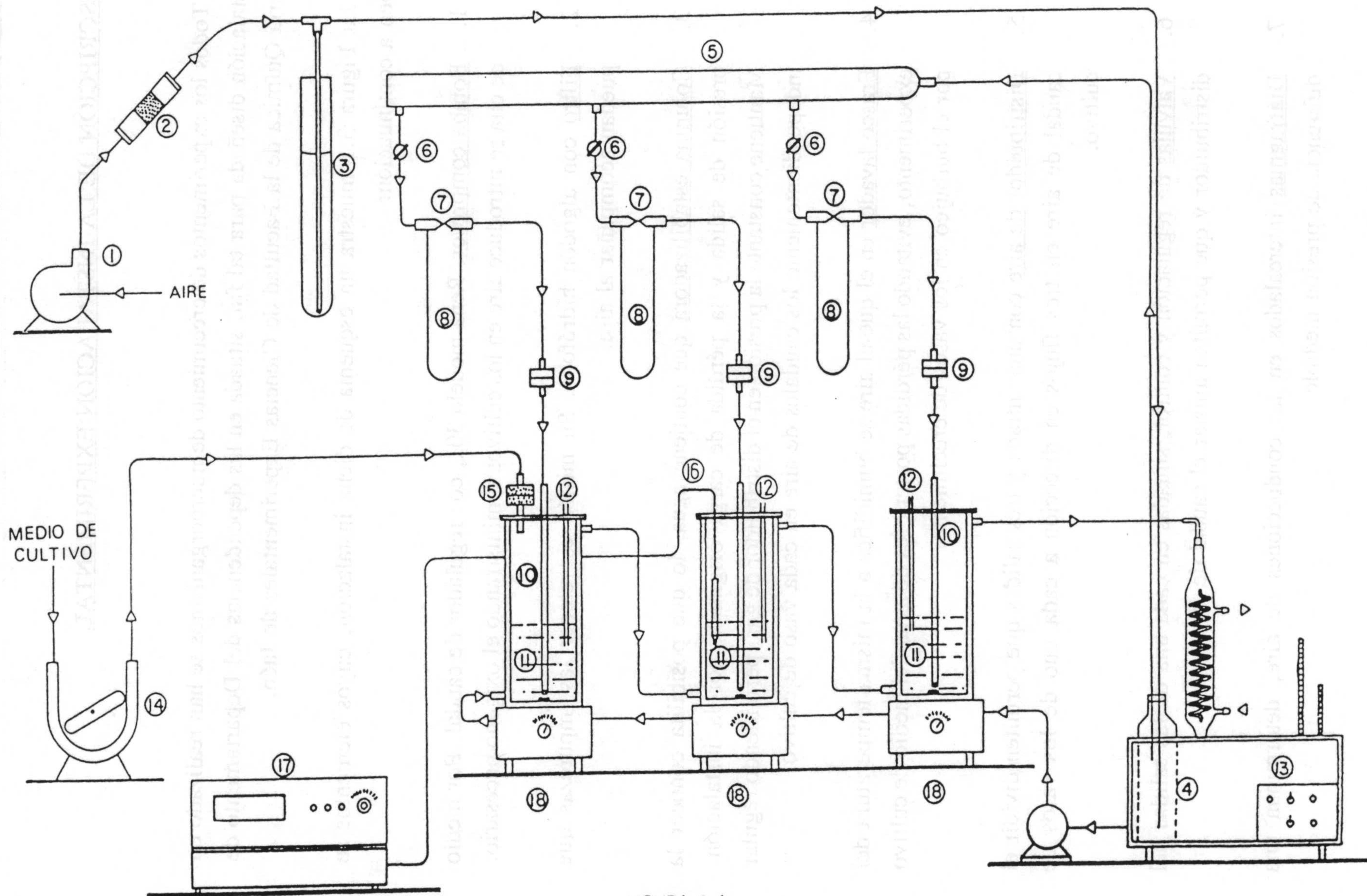


FIGURA 3.1

8. Manómetros diferenciales conectados a los correspondientes diafragmas que permiten medir el caudal de aire que entra en cada vaso de crecimiento.
9. Filtros de esterilización del aire, Millex-FG₅₀ de Millipore de 0,2 μm de tamaño de poro y situados antes de la entrada a los vasos de cultivo.
10. Burbujeadores mediante los cuales se introduce el aire en cada uno de los vasos de cultivo.
11. Vasos de cultivo de geometría cilíndrica. Provistos de una camisa de termostatación por la que circula agua, asegurando el mantenimiento de una temperatura constante en la suspensión del cultivo durante el desarrollo del experimento. Sus características son:
 - Volumen útil: 2,0 L.
 - Diámetro interno: 10,5 cm.
 - Diámetro externo: 13,5 cm.
 - Altura interior: 25,0 cm.
 - Altura exterior: 26,5 cm.

Los vasos de cultivo tienen una tapa metálica con dos orificios que permiten la carga del medio de cultivo y la toma de muestras, así como la introducción del burbujeador.

12. Tubos de goma de silicona, a través de los cuales se extraen las muestras del interior de los vasos.
13. Baño de agua, Digiterm S-542, con termostato y bomba de recirculación que alimenta el agua de termostatación a las camisas de los tres vasos de cultivo conectadas en serie.
14. Bomba peristáltica, Millipore modelo XX80202 30, mediante la que se introduce el medio de cultivo en los diferentes vasos.

15. Portafiltros. Permiten la esterilización del medio de cultivo cuando pasa a su través, impulsado por la bomba peristáltica. Están equipados con un prefiltro de lana de vidrio y un filtro de nitrato de celulosa de porosidad $0,2 \mu\text{m}$.
16. Electrodo combinado, sensible a los hidrogeniones, formado por uno indicador de vidrio y otro de referencia, montados en un solo cuerpo. El elemento de referencia está constituido por una varilla de plata recubierta de AgCl.
17. Medidor de pH, Crison modelo 2001.
18. Agitadores magnéticos, Heidolph MR2000, conjuntamente con la acción del burbujeo de aire en el medio de cultivo mantienen una agitación adecuada para obtener unas condiciones de homogeneidad en la suspensión. La velocidad de agitación se ha mantenido durante el transcurso de todos los experimentos en un valor próximo a 500 rpm.

3.3 PROCEDIMIENTO DE TRABAJO

3.3.1 Levaduras utilizadas

Los experimentos han sido realizados con las levaduras *Pachysolen tannophilus*, cedida por el Prof. J.E. Carrasco, de la División de Biomasa del CIEMAT, *Hansenula polymorpha* (34438), *Pichia stipitis* (58376) y *Candida shehatae* (34887), suministradas por la American Type Culture Collection (ATCC).

3.3.2 Conservación y mantenimiento de los microorganismos

Las levaduras se mantienen en tubos de ensayo de 100 cm³ de capacidad, sobre un medio de cultivo sólido cuya composición en Kg·m⁻³ se detalla a continuación:

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

Para la preparación del citado medio se disuelven los componentes en agua bidestilada, a excepción del agar; se ajusta el pH de la disolución a 7 para que el poder gelificante del agar sea adecuado, y posteriormente se calienta hasta ebullición para disolver, agitando, el agar.

Seguidamente se transfieren unos 25 cm³ de la suspensión resultante a cada tubo de ensayo; se tapan con algodón graso y se esterilizan en autoclave, TD modelo 25, durante 30 minutos a una sobrepresión comprendida entre 58,8 y 78,5 KPa. Finalmente, se disponen de forma inclinada para lograr, tras la solidificación del medio, una mayor superficie de inoculación.

Sobre este medio se realiza la inoculación de la levadura en una cabina de flujo laminar, empleando un asa de platino y en condiciones de esterilidad.

Los tubos inoculados se mantienen en estufa a unos 30°C, realizándose periódicamente transferencia de los microorganismos a medios sólidos frescos.

3.3.3 Medio de cultivo

El medio de crecimiento empleado es el descrito por Lindegren y col. (1958), cuya composición en $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ es la siguiente:

Extracto de levadura	4,00
Peptona	3,60
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,05
KH_2PO_4	2,00
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,00

Y los azúcares (xilosa y/o glucosa) en las proporciones correspondientes a cada experimento.

3.3.4 Desarrollo de los experimentos

A) Precultivo en medio sólido.

La primera etapa de cada experimento consiste en la inoculación en condiciones estériles de los microorganismos en dos tubos de vidrio sobre el medio sólido descrito en el apartado 3.3.2. Se mantienen en estufa a 30°C durante un período de tiempo entre 48 y 60 horas, con el objeto de obtener células en un mismo estado de crecimiento.

B) Inóculo líquido.

Sobre uno de los tubos de precultivo en medio sólido se vierten unos 20 cm³ de medio de cultivo esterilizado, y se agita el tubo suavemente con el fin de resuspender los microorganismos en el medio, sin que se produzca el arrastre de partículas de agar. Esta suspensión se pasa a otro tubo previamente esterilizado y éste constituye ya el inóculo líquido.

El volumen de inóculo líquido necesario se evalúa determinando su absorbancia, que se transforma en concentración de biomasa como se indica en el apartado 3.3.6.1 y se realiza el cálculo para que la concentración inicial en cada vaso de cultivo sea aproximadamente igual a 0,01 Kg·m⁻³.

C) Preparación y comienzo del experimento.

Los vasos de cultivo, filtros, portafiltros y todo el material de vidrio necesario para la inoculación se esterilizan en autoclave a una sobrepresión de 117,7 KPa. durante 30 minutos. El medio de cultivo se ajusta al pH correspondiente a cada experimento mediante la adición de H₂SO₄ 5N y 1N y de NaOH 1N. A continuación se introduce en los vasos de cultivo, a través de portafiltros, mediante la bomba peristáltica. Así mismo se pone en funcionamiento el compresor que va a suministrar el aire con el caudal prefijado para el experimento.

Se adiciona seguidamente, mediante una pipeta estéril, la cantidad calculada de inóculo líquido para alcanzar una concentración de biomasa próxima a 0,01 Kg·m⁻³. En ese momento, se toma el origen de tiempos.

La duración del experimento depende de las condiciones elegidas, así como del microorganismo empleado, siendo los valores extremos entre 40 a 70 horas para *Pichia stipitis* y entre 360 a 400 horas para *Hansenula polymorpha*. Cada cierto tiempo se toman muestras de 2 a 5 cm³ del medio de cultivo, según las necesidades de análisis, mediante una jeringa estéril.

3.3.5 Medida de caudales de aire

Esta medida se ha realizado mediante manómetros diferenciales de dos líquidos, alcohol n-amílico coloreado con yodo y agua.

Los diafragmas se han calibrado determinando diferencias de altura manométrica, Δh , para caudales de aire, Q , conocidos, mediante un medidor de burbuja conectado en serie a la salida de la instalación.

Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 3.1 y se representan en coordenadas logarítmicas en la Figura 3.2 a) b) y c).

Los valores experimentales de Q frente a Δh se han ajustado por regresión lineal obteniéndose las siguientes ecuaciones:

Medidor 1:

$$\log Q = 0,5880 \log \Delta h - 0,3067; \quad r^2 = 0,999 \quad [3.1]$$

Medidor 2:

$$\log Q = 0,5798 \log \Delta h - 0,1705; \quad r^2 = 0,998 \quad [3.2]$$

Medidor 3:

$$\log Q = 0,5816 \log \Delta h - 0,1073; \quad r^2 = 0,999 \quad [3.3]$$

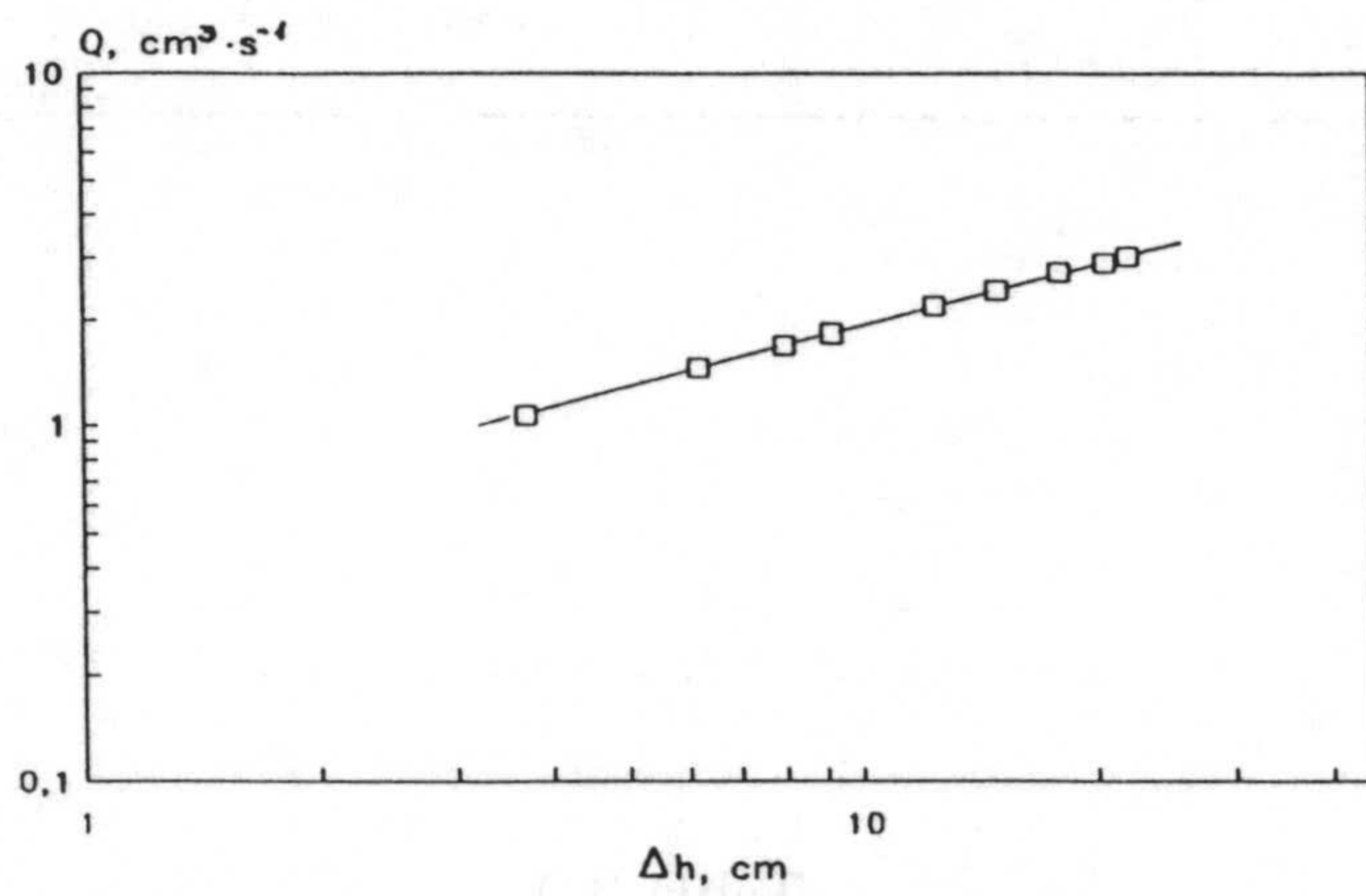
donde Q se expresa en $\text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ y Δh en cm.



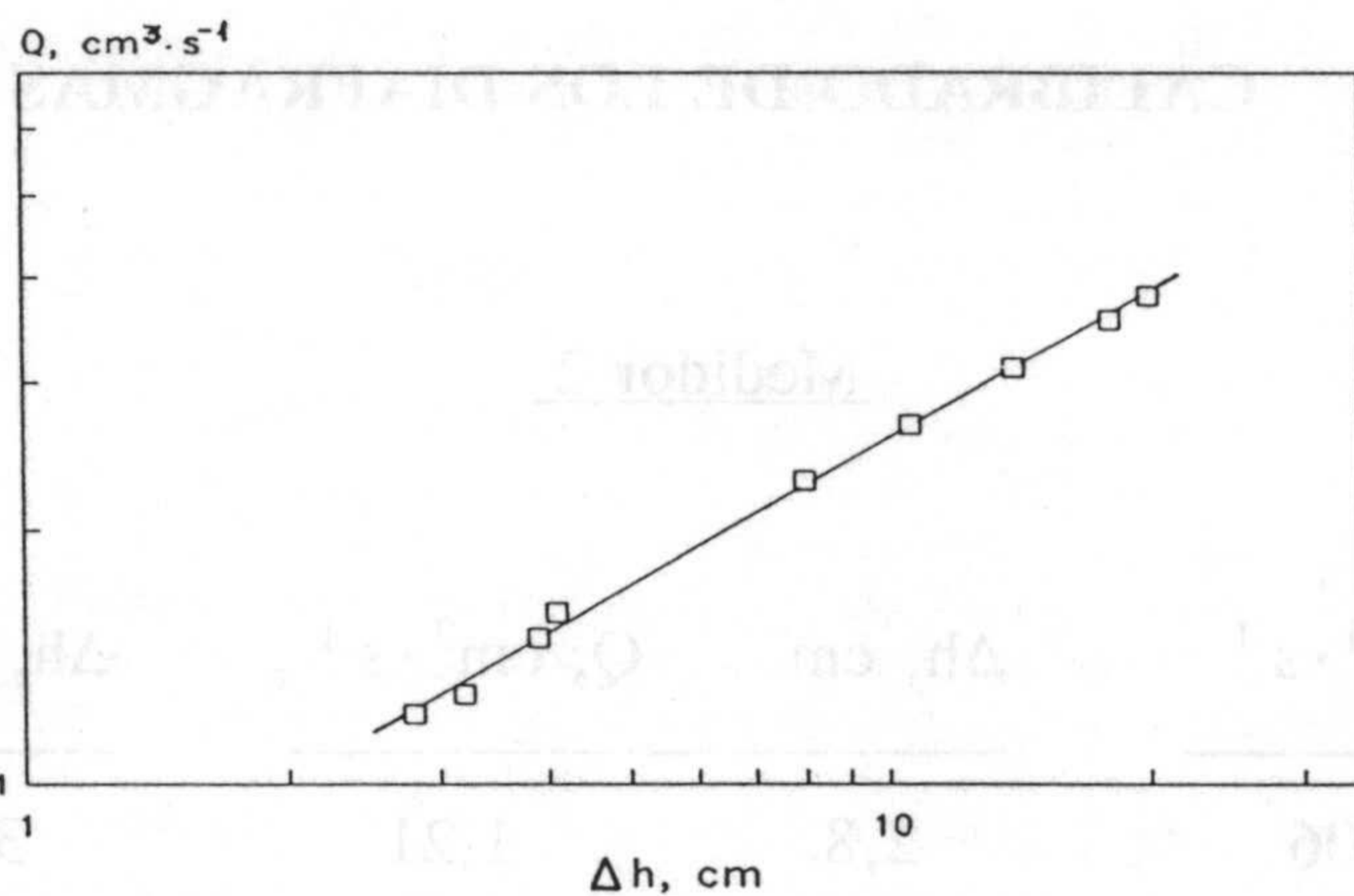
Tabla 3.1

CALIBRADO DE LOS DIAFRAGMAS

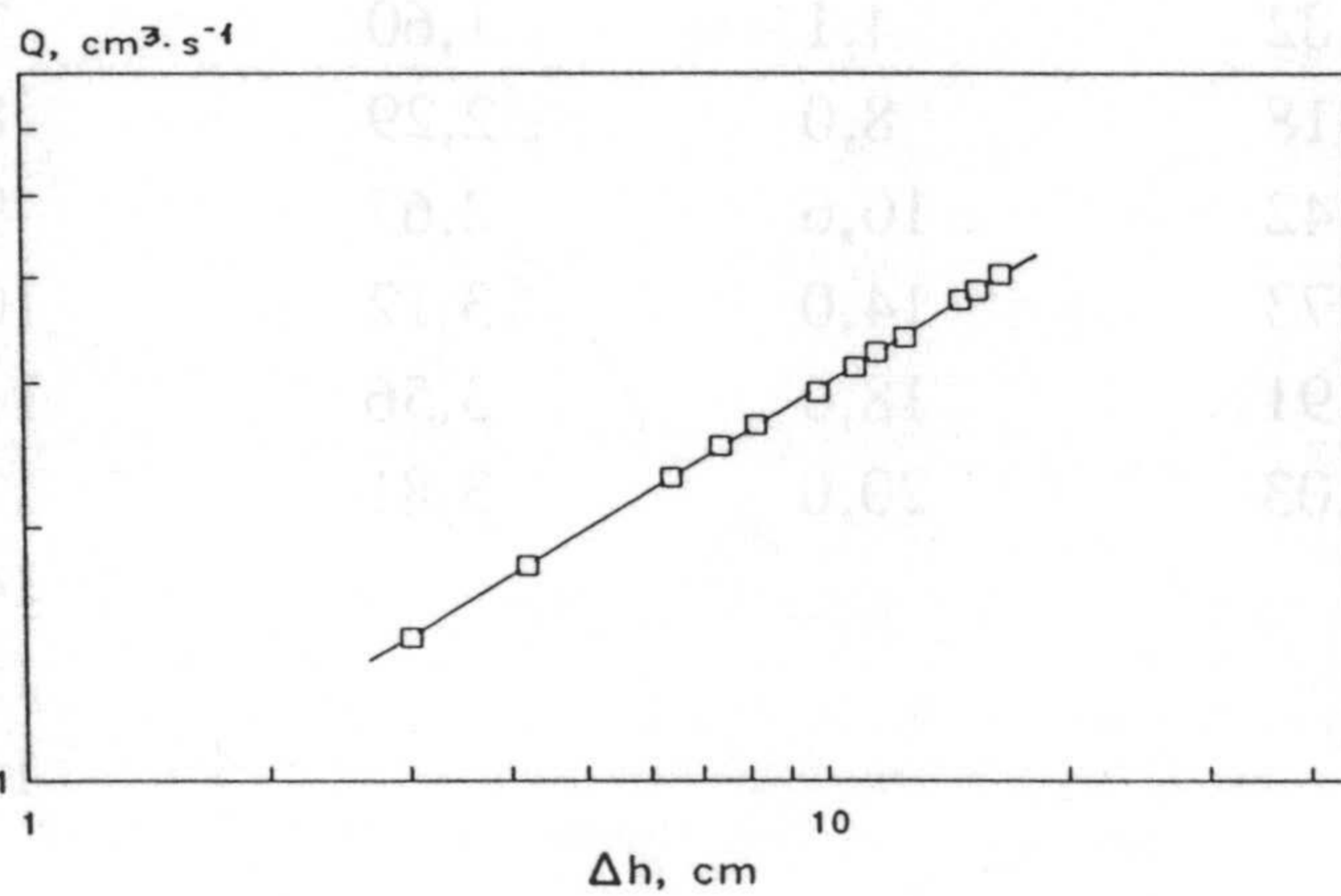
<u>Medidor 1</u>		<u>Medidor 2</u>		<u>Medidor 3</u>	
$\Delta h, \text{ cm}$	$Q, \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$	$\Delta h, \text{ cm}$	$Q, \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$	$\Delta h, \text{ cm}$	$Q, \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
3,7	1,06	2,8	1,21	3,0	1,48
6,2	1,45	3,2	1,28	4,2	1,80
8,0	1,68	3,9	1,49	6,4	2,30
9,2	1,82	4,1	1,60	7,4	2,51
12,5	2,18	8,0	2,29	8,2	2,66
15,0	2,42	10,6	2,67	9,8	2,92
18,1	2,73	14,0	3,12	10,9	3,13
20,6	2,91	18,0	3,56	11,6	3,26
22,0	3,03	20,0	3,81	12,6	3,39
				14,8	3,76
				15,6	3,85
				16,6	4,02



a)



b)



c)

Fig. 3.2.- Rectas de calibrado de los diafragmas; a) Medidor 1; b) Medidor 2; c) Medidor 3

3.3.6 Métodos analíticos

En el estudio realizado se han determinado las concentraciones de biomasa, xilosa y glucosa residuales, etanol y xilitol en muestras tomadas de los vasos de cultivo a distintos tiempos en el transcurso de los experimentos.

3.3.6.1 Determinación del crecimiento celular

El método seguido consiste en medir la absorbancia de la suspensión de células a lo largo del experimento y además el peso seco de muestras correspondientes a la fase estacionaria.

Una vez finalizado el experimento, se toman 50 cm³ de cada vaso y se centrifugan a 5000 r.p.m. durante unos 10 minutos, decantando y lavando el residuo dos veces con agua bidestilada, con el fin de disolver las sales minerales del medio que hayan quedado ocluidas en el residuo centrifugado.

Éste se resuspende finalmente con el menor volumen posible de agua bidestilada (5 a 10 cm³), se deposita en un pesasustancias previamente tarado y se seca en estufa hasta pesada constante. La temperatura de secado será, inicialmente, 95°C para evitar arrastres de material celular, pasando luego a 105°C hasta pesada constante.

Dada la dificultad de controlar el crecimiento celular a través de las medidas de peso seco, se ha optado, como es habitual, por evaluarlo mediante la absorbancia de la suspensión de células. Se ha comprobado que existe una relación lineal entre ésta y la concentración de biomasa cuando la absorbancia está comprendida entre los valores 0,02 y 0,60, lo cual exige, en algunos casos, la dilución correspondiente. En las medidas de absorbancia se emplea medio de cultivo fresco como referencia.

Para obtener dicha relación se ha medido la absorbancia de suspensiones de células, cuyo peso seco se determina posteriormente, utilizando un espectrofotómetro

Bausch-Lomb, modelo Spectronic 2000, realizando dichas medidas a una longitud de onda de 620 nm.

Los resultados obtenidos para las cuatro levaduras se recogen en la Tabla 3.2 y se representan en las Figuras 3.3 a 3.6. El ajuste por mínimos cuadrados de x frente a A_{620} proporciona los siguientes valores para la pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de regresión lineal:

	Pend.	O.O.	r^2
<i>Hansenula polymorpha</i>	0,2146	$-4,53 \cdot 10^{-3}$	0,999
<i>Pachysolen tannophilus</i>	0,2095	$2,04 \cdot 10^{-4}$	0,991
<i>Candida shehatae</i>	0,2247	$-3,70 \cdot 10^{-4}$	0,991
<i>Pichia stipitis</i>	0,2432	$-9,06 \cdot 10^{-3}$	0,999

Las ecuaciones se han empleado para transformar, en cada caso, las medidas de absorbancia en concentración celular, x , en $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$.

Tabla 3.2

ABSORBANCIA - PESO SECO

Hansenula polymorpha

Pachysolen tannophilus

A_{620}	$x, \text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$	A_{620}	$x, \text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$
0,056	0,0091	0,020	0,0054
0,058	0,0090	0,022	0,0063
0,068	0,0114	0,035	0,0087
0,088	0,0136	0,046	0,0109
0,095	0,0146	0,066	0,0144
0,102	0,0170	0,073	0,0131
0,109	0,0180	0,077	0,0152
0,118	0,0225	0,078	0,0196
0,123	0,0228	0,094	0,0189
0,158	0,0272	0,099	0,0218
0,166	0,0292	0,109	0,0215
0,189	0,0340	0,136	0,0262
0,212	0,0365	0,148	0,0287
0,213	0,0456	0,151	0,0345
0,229	0,0450	0,161	0,0303
0,265	0,0557	0,165	0,0392
0,336	0,0694	0,201	0,0435
0,352	0,0680	0,202	0,0431
0,376	0,0730	0,249	0,0523
0,424	0,0900	0,255	0,0538
		0,259	0,0518
		0,293	0,0574
		0,309	0,0691
		0,323	0,0606
		0,331	0,0718
		0,395	0,0864
		0,397	0,0870
		0,595	0,1263

Tabla 3.2 (cont.)

ABSORBANCIA - PESO SECO

Candida shehatae

Pichia stipitis

A_{620}	$x, \text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	A_{620}	$x, \text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,090	0,0151	0,082	0,0138
0,104	0,0211	0,128	0,0221
0,150	0,0301	0,140	0,0251
0,151	0,0333	0,215	0,0407
0,160	0,0283	0,254	0,0503
0,172	0,0361	0,262	0,0552
0,211	0,0452	0,270	0,0543
0,235	0,0449	0,334	0,0679
0,244	0,0542	0,363	0,0754
0,295	0,0602	0,374	0,0815
0,301	0,0632	0,431	0,1006
0,314	0,0698	0,479	0,1086
0,354	0,0748		
0,368	0,0798		

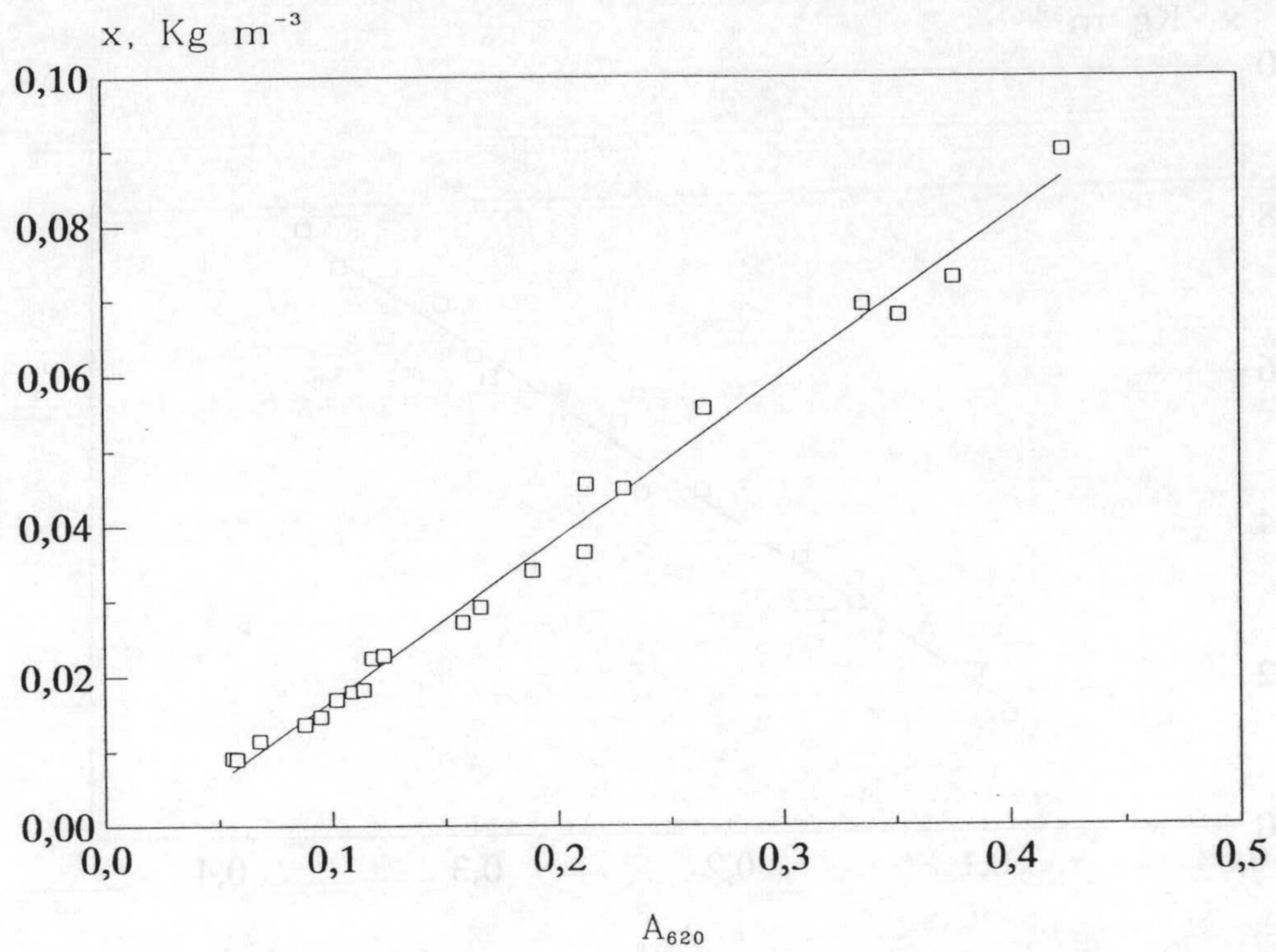


Fig. 3.3.- Concentración de biomasa frente a absorbancia en *Hansenula polymorpha*

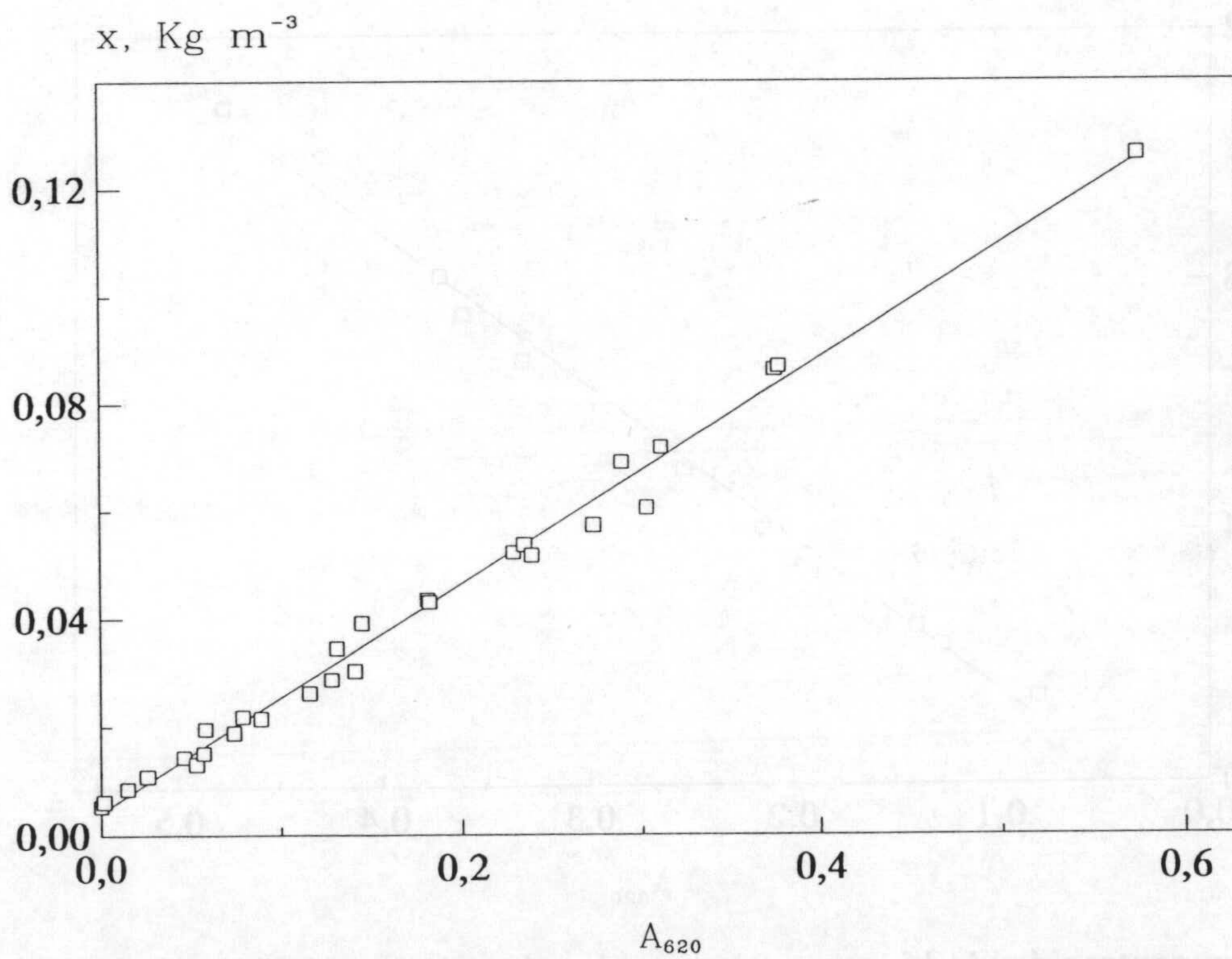


Fig. 3.4.- Concentración de biomasa frente a absorbancia en *Pachysolen tannophilus*

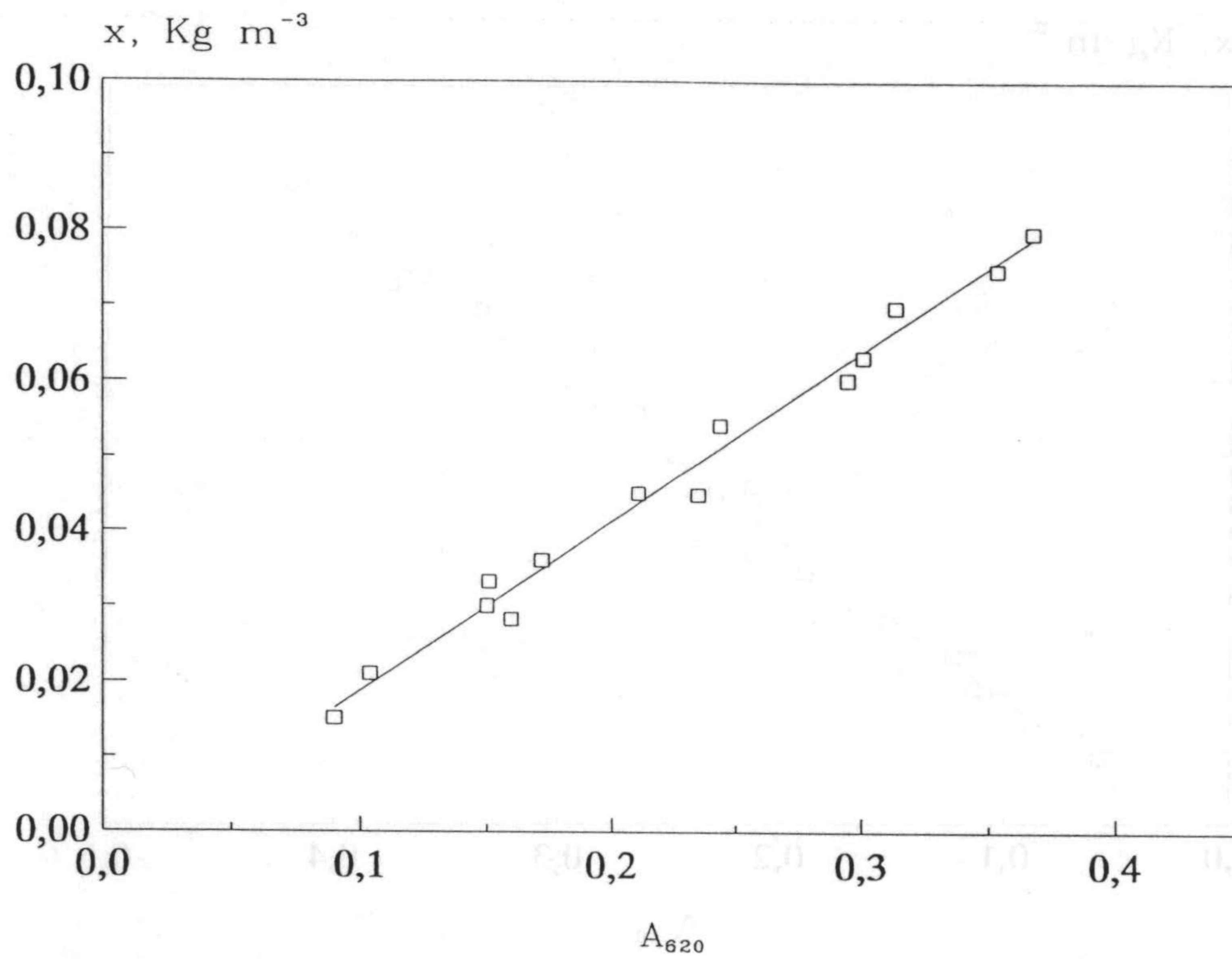


Fig. 3.5.- Concentración de biomasa frente a absorbancia en *Candida shehatae*

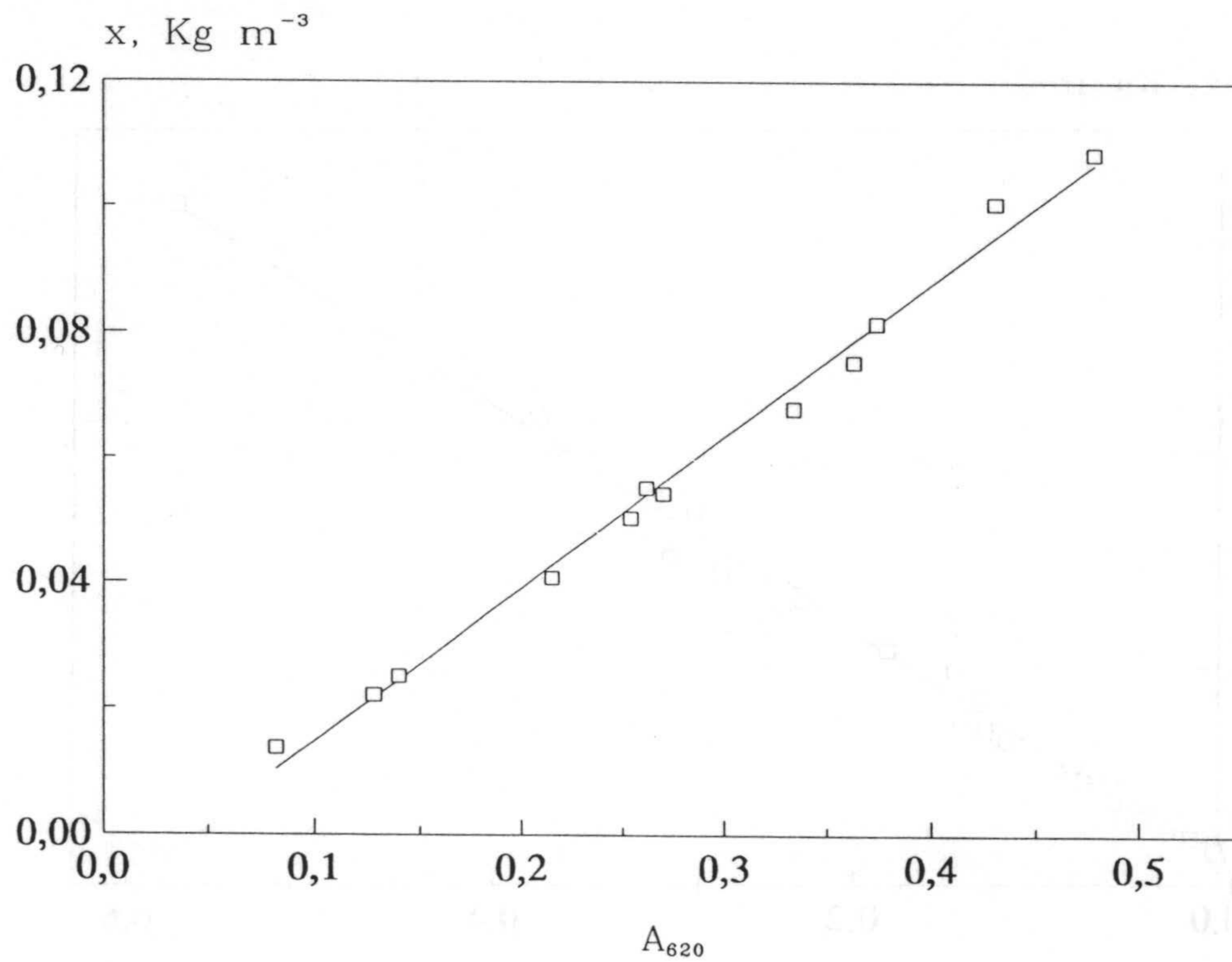


Fig. 3.6.- Concentración de biomasa frente a absorbancia en *Pichia stipitis*

3.3.6.2 Determinación de azúcares

A) Método del ácido DNS para azúcares reductores totales.

El método del ácido dinitrosalicílico para la determinación de azúcares reductores totales fue propuesto por Miller (1959). Está basado en la reacción entre el grupo reductor aldehído del azúcar y el reactivo dinitrosalicílico (DNS), que origina un compuesto coloreado (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico) cuya concentración, y por tanto la del azúcar reductor presente, puede determinarse aplicando un método fotocolorimétrico.

La composición del reactivo DNS es la siguiente:

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

enrasando, todo ello hasta 1 L con agua destilada.

El procedimiento operatorio consta de las siguientes etapas:

- 1.- Se toman unos 5 cm³ de la suspensión de levaduras.
- 2.- Se centrifuga a 5000 r.p.m. durante 10 minutos.
- 3.- Se toman 2 cm³ del sobrenadante.
- 4.- Se adicionan 3 cm³ del reactivo DNS y se calienta, en baño de agua, a unos 80-85°C durante 10 minutos.
- 5.- Se introduce durante 10 minutos en un baño de agua fría.
- 6.- Se mide la absorbancia frente a un blanco a 640 nm.

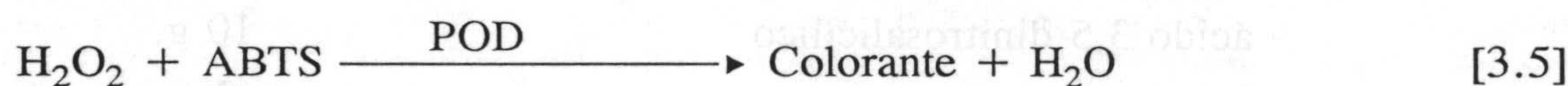
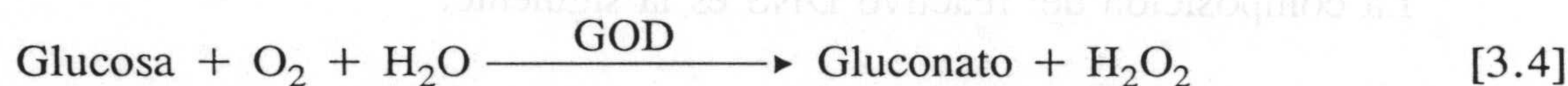
La concentración de azúcares reductores totales se calcula a partir de una recta patrón realizada previamente con disoluciones de concentración conocida. El procedimiento seguido ha consistido en medir la absorbancia de cinco puntos de la recta

patrón (los correspondientes a 0,10, 0,16, 0,20, 0,30 y 0,40 Kg·m⁻³), cada vez que se realizaba una serie de medidas.

Este método es válido para concentraciones de azúcares reductores totales comprendidas entre 0,05 y 0,50 Kg·m⁻³, por lo que para concentraciones superiores es necesario realizar la dilución correspondiente.

B) Determinación de glucosa residual.

Se ha empleado el método enzimático de la glucosa oxidasa propuesto por Werner y col. (1970), basado en las reacciones:



donde:

GOD = enzima glucosa-oxidasa

POD = enzima peroxidasa

ABTS = 2,2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolina-ácido sulfónico-(6)-]-sal diamónica.

Este último compuesto es incoloro, mientras que su forma oxidada, producto de la reacción [3.5], es de color verde, por lo que se puede aplicar un método fotocolorimétrico para su determinación. Las medidas se realizan a una longitud de onda de 610 nm.

El procedimiento operatorio es el siguiente:

- 1.- Se toman 2 cm³ de suspensión de levaduras.
- 2.- Se centrifuga a 5000 r.p.m.
- 3.- Se toman 0,2 cm³ de sobrenadante.
- 4.- Se adicionan 5 cm³ de reactivo que contiene las enzimas, el ABTS y un tampón de fosfatos.
- 5.- Se incuba a 37°C durante 15 minutos.

- 6.- Se miden las absorbancias a 610 nm frente a un blanco formado por 0,2 cm³ de agua destilada y 5 cm³ de reactivo.

La concentración de glucosa se obtiene a partir de una recta de calibrado obtenida previamente, midiendo las absorbancias de disoluciones de glucosa de concentración conocida.

Esta recta se representa en la Figura 3.7 y su ecuación obtenida por regresión lineal es:

$$g = 0,331 \cdot A_{610} - 5,27 \cdot 10^{-3} \quad r^2 = 0,997 \quad [3.6]$$

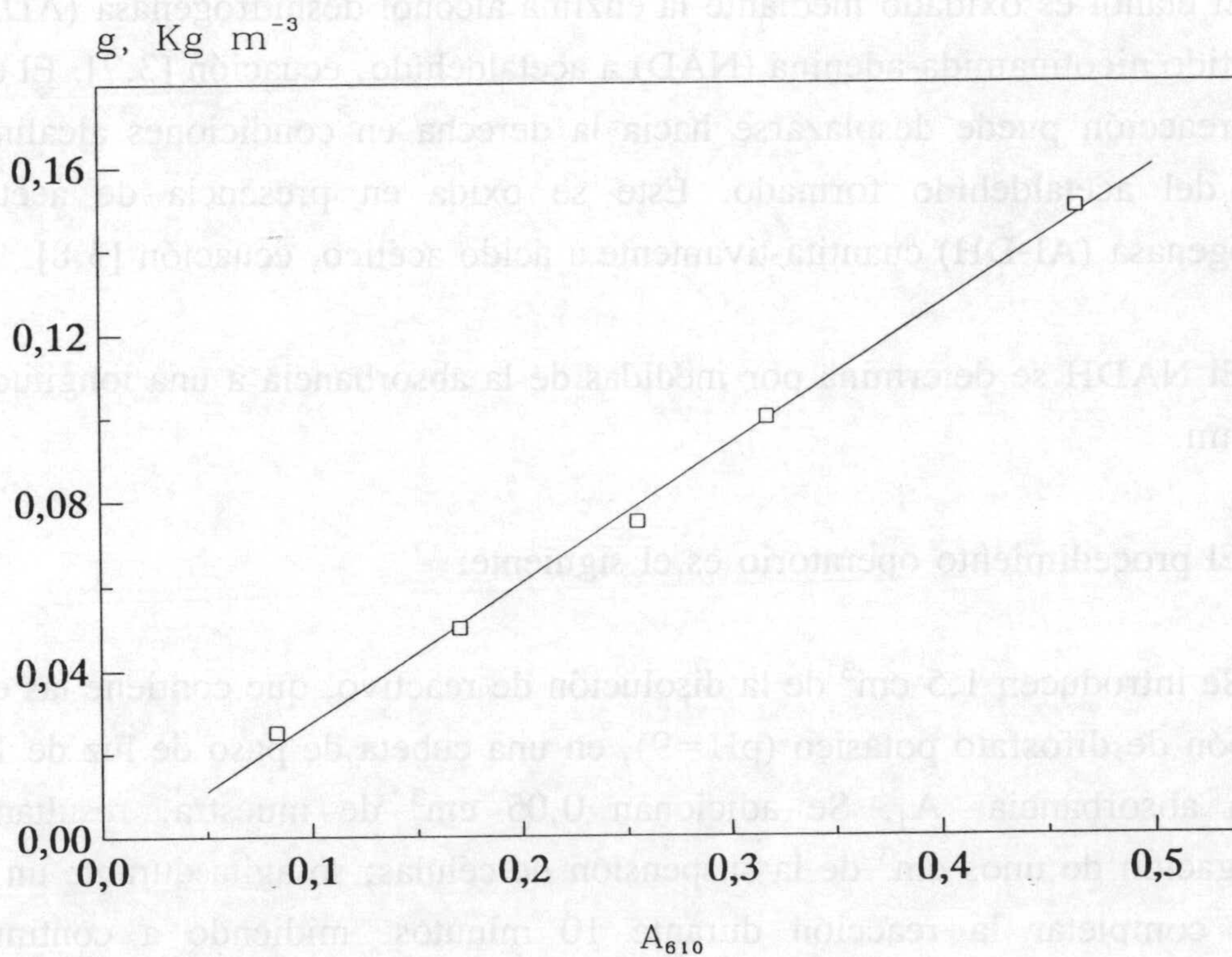
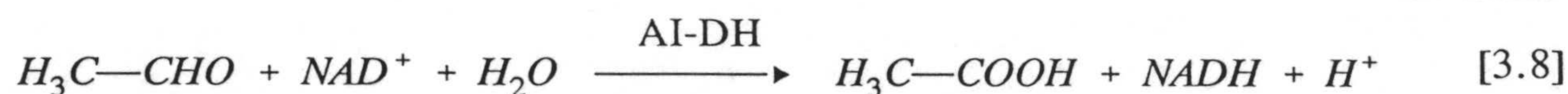
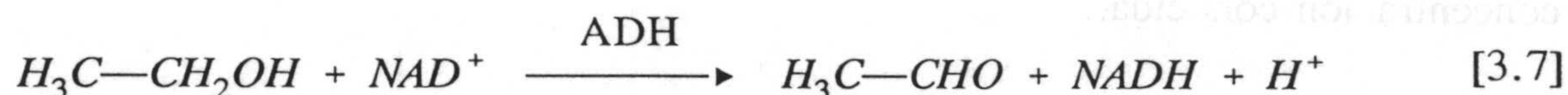


Fig. 3.7.- Recta de calibrado para determinación de concentración residual en glucosa.

3.3.6.3 Determinación del etanol producido

Se ha llevado a cabo mediante el método enzimático propuesto por Beutler y Michal (1977), basado en las siguientes reacciones:



El etanol es oxidado mediante la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) por el dinucleótido nicotinamida-adenina (NAD) a acetaldehído, ecuación [3.7]. El equilibrio de esta reacción puede desplazarse hacia la derecha en condiciones alcalinas y por retirada del acetaldehído formado. Éste se oxida en presencia de acetaldehído-deshidrogenasa (AI-DH) cuantitativamente a ácido acético, ecuación [3.8].

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

El procedimiento operatorio es el siguiente:

Se introducen 1,5 cm³ de la disolución de reactivo, que contiene las enzimas y un tampón de difosfato potásico (pH=9), en una cubeta de paso de luz de 1 cm y se mide la absorbancia, A₁. Se adicionan 0,05 cm³ de muestra, resultante de la centrifugación de unos cm³ de la suspensión de células; se agita durante un minuto y se deja completar la reacción durante 10 minutos, midiendo a continuación la absorbancia, A₂.

El cálculo de la concentración de etanol en Kg · m⁻³ viene dado por la ecuación:

$$E = \frac{V \cdot M_w}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 2 \cdot 1000} \Delta A \cdot F \quad [3.9]$$

siendo:

- V = Volumen final, cm³
- v = Volumen de muestra, cm³
- M_w = Peso molecular del etanol, Kg·Kmol⁻¹
- d = Paso de luz, cm
- ε = Coeficiente de absorción del NADH a 340 nm, igual a 6,3 L·mMol⁻¹·cm⁻¹
- ΔA = A₂ - A₁
- F = Factor de dilución

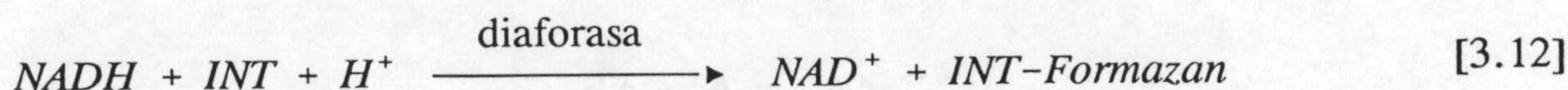
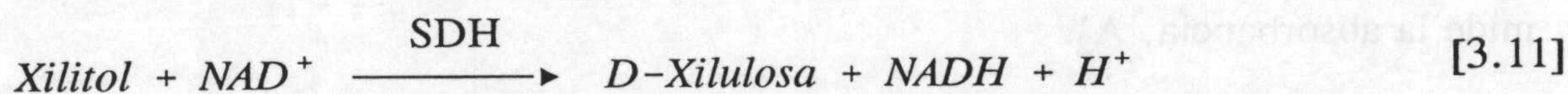
Sustituyendo los parámetros empleados, la ecuación [3.9] se reduce a:

$$E = 0,113 \cdot \Delta A \cdot F \quad [3.10]$$

Este método es válido para concentraciones inferiores a 0,06 Kg·m⁻³; a concentraciones superiores es necesario realizar la dilución correspondiente.

3.3.6.4 Determinación del xilitol producido

Se ha llevado a cabo mediante un método enzimático propuesto por Beutler y Becker (1977), basado en las siguientes reacciones:



El xilitol es oxidado por el dinucleótido nicotinamida-adenina (NAD) a D-Xilulosa en presencia del enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH), también llamado poliol deshidrogenasa, con formación de la forma reducida del dinucleótido nicotinamida-adenina (NADH), ecuación [3.11].

En las condiciones del ensayo, el equilibrio está favorecido hacia la formación de NAD y xilitol; sin embargo, puede desplazarse hacia la derecha por retirada del NADH. Éste reduce cuantitativamente el cloruro de iodotetrazolio (INT) ($C_{19}H_{13}IClN_5O_2$) a INT-Formazan ($C_{19}H_{14}IN_5O_2$) en presencia del enzima diaforasa, ecuación [3.12].

El INT-Formazan producido se determina por medidas de la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm.

El procedimiento operatorio es el siguiente:

En una cubeta de 1 cm. de paso de luz se introduce 1 cm³ de una disolución reactivo, preparada inmediatamente y formada por:

- 0,5 cm³ de un tampón fosfato potásico/trietanolamina (pH=8,6)
- 0,2 cm³ de una disolución de diaforasa
- 0,2 cm³ de una disolución de INT

A continuación se añade 0,1 cm³ de la muestra, resultante de la centrifugación de unos cm³ de la suspensión de células y 1,90 cm³ de agua bidestilada. Se agita y se mide la absorbancia, A_1' .

La reacción se inicia mediante la adición de 0,05 cm³ de una disolución de SDH, se agita y se deja completar la reacción durante 30 minutos, tras los cuales se mide la absorbancia, A_2' .

Se determina la diferencia $\Delta A'$:

$$\Delta A' = A_2' - A_1'$$

El cálculo de la concentración de xilitol en $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ viene expresado por la ecuación:

$$X_i = \frac{V' \cdot M'_w}{\epsilon' \cdot d \cdot v' \cdot 1000} (\Delta A'_{\text{muestra}} - \Delta A'_{\text{blanco}}) \cdot F \quad [3.13]$$

siendo:

V' = Volumen final, cm^3

v' = Volumen de muestra, cm^3

M'_w = Peso molecular del xilitol, $\text{Kg}\cdot\text{Kmol}^{-1}$

d = Paso de luz, cm

ϵ' = Coeficiente de absorción del INT-Formazan a 492 nm, igual a 19,9 $\text{L}\cdot\text{mMol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

F = Factor de dilución

Sustituyendo los parámetros empleados en este caso, la ecuación [3.13] se reduce a:

$$X_i = 0,2332 (\Delta A'_{\text{muestra}} - \Delta A'_{\text{blanco}}) F \quad [3.14]$$

Este método es válido para concentraciones inferiores a $0,10 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$; a concentraciones superiores es necesario realizar la dilución correspondiente.

El cálculo de la concentración de xilitol en $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ viene expresado por la ecuación:

$$X = \frac{Y \cdot M_w}{V \cdot d - V_i \cdot 1000} - \Delta A' \text{ (plancha)} \cdot F \quad [3.13]$$

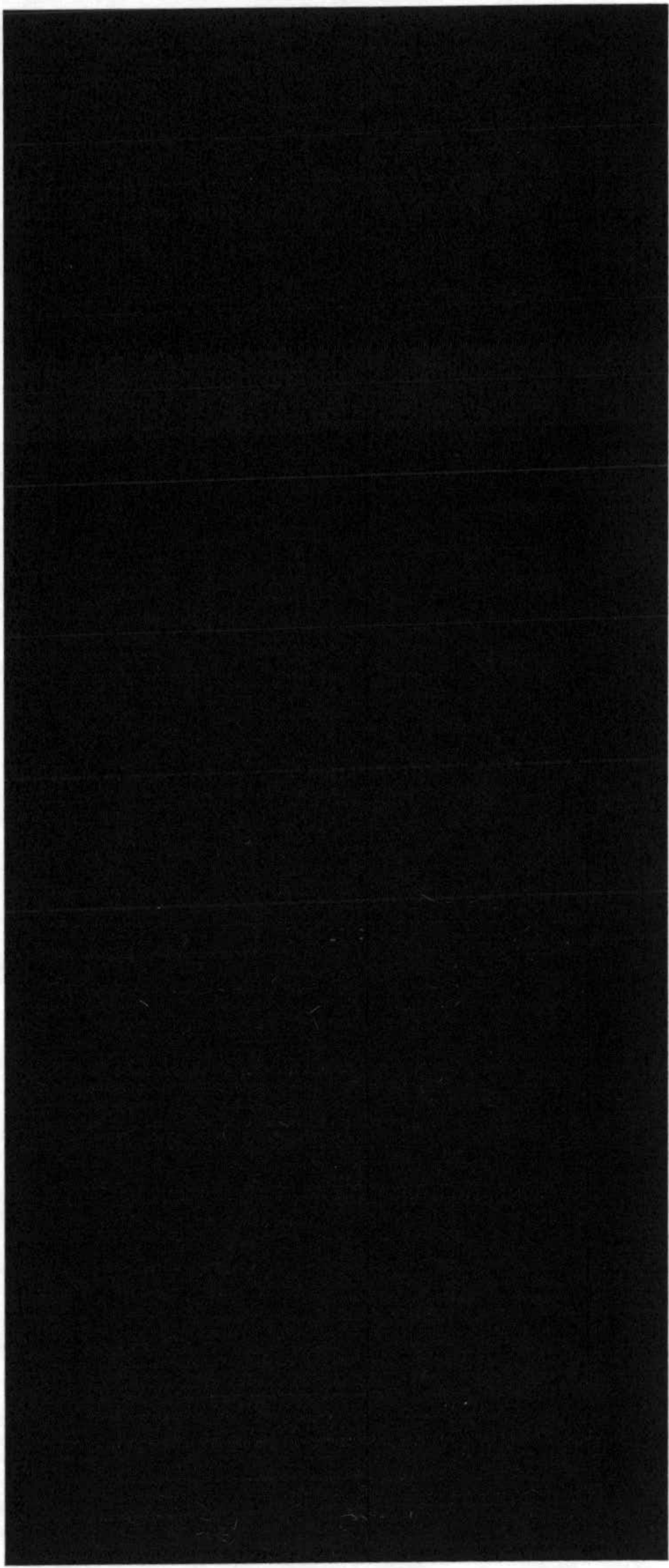
siendo:

- V = Volumen final, cm^3
- V_i = Volumen de muestra, cm^3
- M_w = Peso molecular del xilitol, $\text{Kg}\cdot\text{Kmol}^{-1}$
- d = Peso de la, cm^3
- k = Coeficiente de absorción del IRT-Fotómetro a 493nm , igual a $19.7\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
- F = Factor de dilución

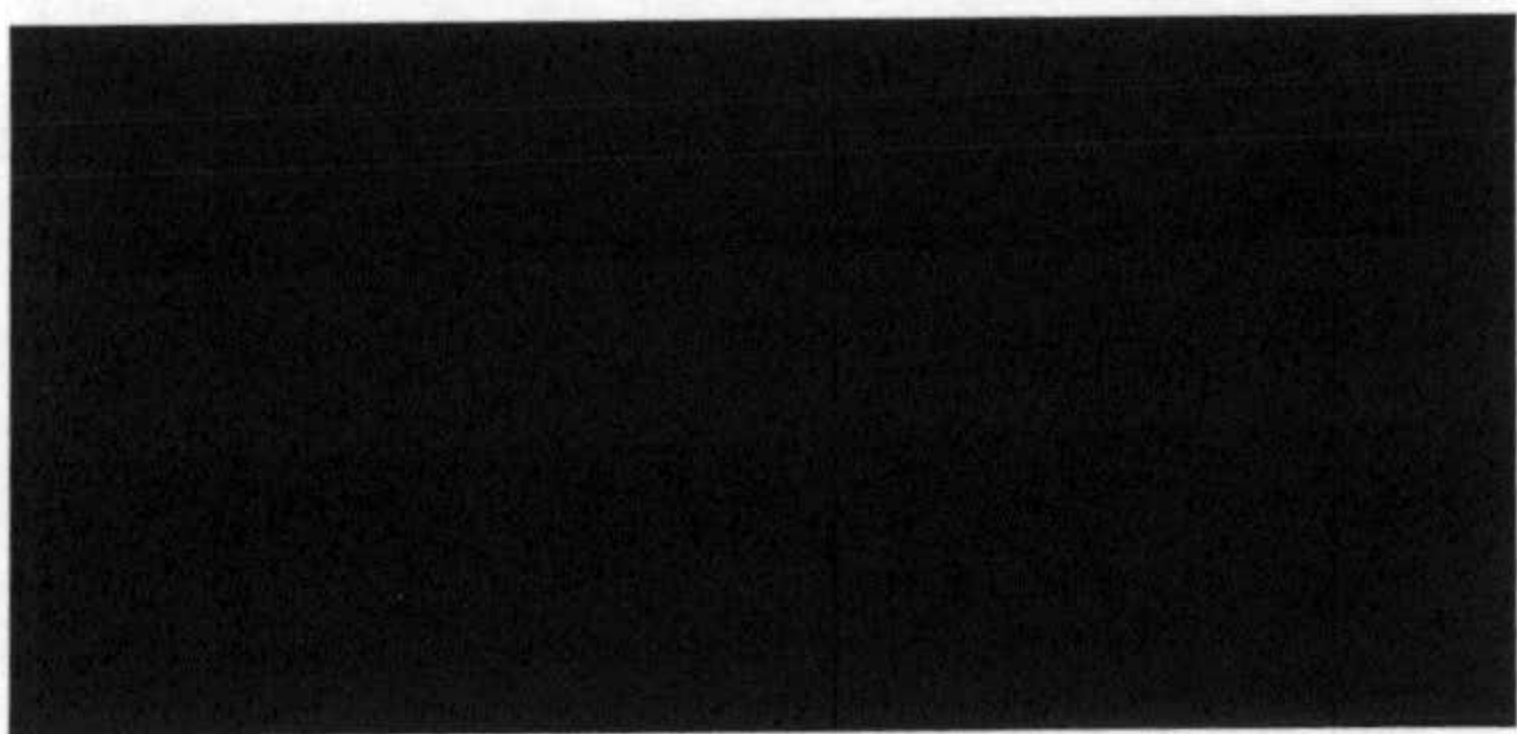
Sustituyendo los parámetros expresados en este caso, la ecuación [3.13] se reduce a:

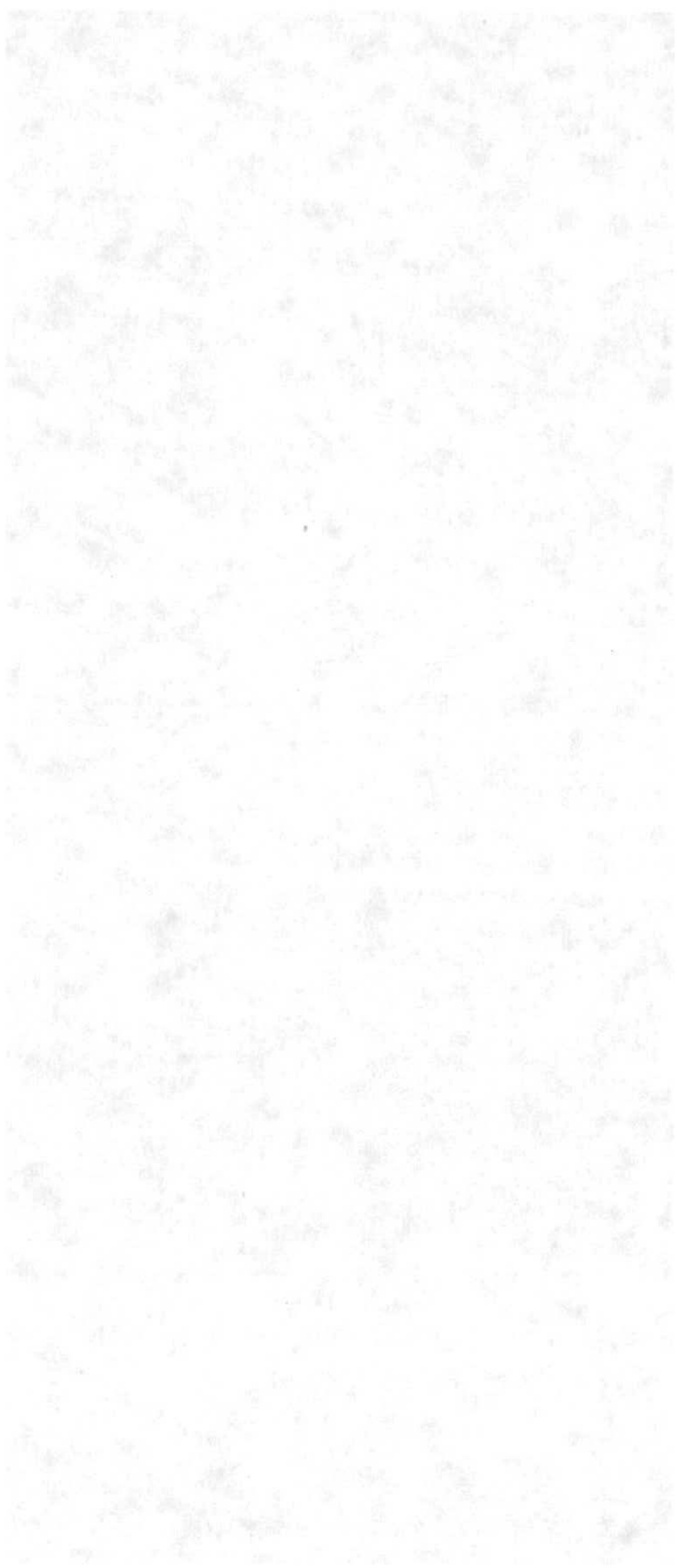
$$X = 0,2332 (\Delta A' \text{ (plancha)} - \Delta A' \text{ (blanco)}) \cdot F \quad [3.14]$$

Este método es válido para concentraciones inferiores a $0,10\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$, a concentraciones superiores es necesario realizar la dilución correspondiente.



4. RESULTADOS EXPERIMENTALES





1950-1951-1952-1953-1954



Los resultados experimentales obtenidos en la fermentación discontinua con las distintas levaduras ensayadas se recogen en las Tablas 4.1 a 4.54.

En todos los casos se ha operado a una temperatura de 30°C y la concentración de azúcares inicial (xilosa o xilosa+glucosa, en el caso de mezclas) ha sido 25 Kg·m⁻³, a excepción de los experimentos realizados en ausencia de sustrato.

En las Tablas figuran, para cada tiempo, la concentración de biomasa, x, y los valores correspondientes de las concentraciones de azúcares residual, s, y de etanol, E, y xilitol, Xi, producidos. Todas ellas están expresadas en el Sistema Internacional de unidades, en Kg·m⁻³.

Los experimentos han sido agrupados en series que se identifican con la inicial o iniciales de la levadura empleada en cada caso, de la forma siguiente: H, P, C, y Pi para *Hansenula polymorpha*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* y *Pichia stipitis* respectivamente.

Además, para cada microorganismo, las iniciales A, P y M indican la serie de experimentos en la que se ha estudiado respectivamente el nivel de aireación, el pH inicial y la concentración inicial de xilosa y glucosa en mezclas. El número posterior corresponde al experimento concreto dentro de cada serie.

Se ha designado por B al experimento base, común a las distintas series para cada levadura.

Los resultados experimentales han sido representados gráficamente en las Figuras 4.1 a 4.65, así como la evolución del pH en función del tiempo para todos los experimentos.

Los resultados experimentales obtenidos en la fermentación de la levadura con las distintas levaduras ensayadas se recogen en las Tablas 4.1 a 4.24.

En todos los casos se ha operado a una temperatura de 30°C y la concentración de azúcar inicial (glucosa + sacarosa) en el caso de mezclas ha sido 25 Kg/m³.

En las Tablas figuran, para cada uno de los tipos de levadura, los valores correspondientes de las concentraciones de azúcar residual, α , y de etanol, E, y xilitol, X, producidos. Todas las cifras expresadas en el Sistema Internacional de Unidades en Kg/m³.

Los experimentos han sido agrupados en series que se identifican con la inicial o iniciales de la levadura empleada en cada caso, de la forma siguiente: H, P, C, y D para *Hanseniaspora polymorpha*, T, A, S, L, y R para *Candida shehatae* y *Pichia stipitis* respectivamente.

Además, para cada microorganismo, las iniciales A, P, y M indican la serie de experimentos en la que se ha estudiado respectivamente el nivel de azúcar, el pH inicial y la concentración inicial de xilosa y glucosa en mezclas. El número posterior corresponde al experimento concreto dentro de cada serie.

Se ha designado por B el experimento base, común a las distintas series para cada levadura.

Los resultados experimentales han sido representados gráficamente en las Figuras 4.1 a 4.22, así como la evolución del pH en función del tiempo para todos los experimentos.

4.1 HANSENULA POLYMORPHA

La fermentación discontinua de disoluciones de xilosa con *Hansenula polymorpha* ha conducido a los resultados experimentales que se recogen en las Tablas 4.1 a 4.7.

Para esta levadura, se han estudiado la influencia del caudal de aireación (serie H-A) y la influencia del pH inicial (serie H-P), siendo la concentración inicial de xilosa $25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ en todos los casos.

Las Figuras 4.1 a 4.9 muestran la representación de la concentración de xilosa residual y la producción de biomasa, etanol y xilitol frente al tiempo para los distintos experimentos y la variación del pH con el tiempo para cada serie.

4.1.1 Influencia del nivel de aireación

Para estudiar la influencia sobre los cultivos del nivel de aireación se ha realizado la serie H-A, en la que se ha mantenido constante el pH inicial del medio de cultivo en 5,5 mientras que se ha variado el caudal de aireación en los siguientes valores: 0,000, 0,075, 0,150 y 0,300 v/v/min.

Los resultados experimentales obtenidos aparecen en las Tablas 4.1 a 4.4 y en las correspondientes representaciones de las Figuras 4.1 a 4.4.

La Figura 4.5 muestra la variación del pH en el transcurso del cultivo para todos los experimentos de esta serie. Puede observarse que se mantiene prácticamente constante durante las primeras 50-60 horas de cultivo, produciéndose posteriormente un descenso hasta las 150-200 horas; a partir de este momento, el pH permanece prácticamente constante o con un ligero ascenso.

TABLA 4.1

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: H-B

pH_i = 5,5

Q = 0,000 v/v/min

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,003			
2,0	0,004			
3,5	0,005	24,49		
5,0	0,010			
8,0	0,032			
18,5	0,138	24,09	0,019	
21,0	0,148			
23,0	0,189			
26,0	0,197	24,01		
29,0	0,221	23,94		
44,0		23,96	0,034	0,82
52,0	0,375	23,82		
70,5	0,509	23,64		
90,5	0,686		0,071	
99,0	0,750		0,075	
117,5	0,869	21,18	0,078	
148,5	1,115	20,08	0,087	
171,0	1,453	19,27	0,097	
195,0		16,15	0,109	
214,0	1,898	13,78	0,111	
239,0	1,962	11,77	0,120	
269,0	2,134	9,79	0,131	
292,0	2,370	8,07	0,137	
339,0	2,445	4,78	0,129	
381,0	2,638	2,81	0,088	14,23

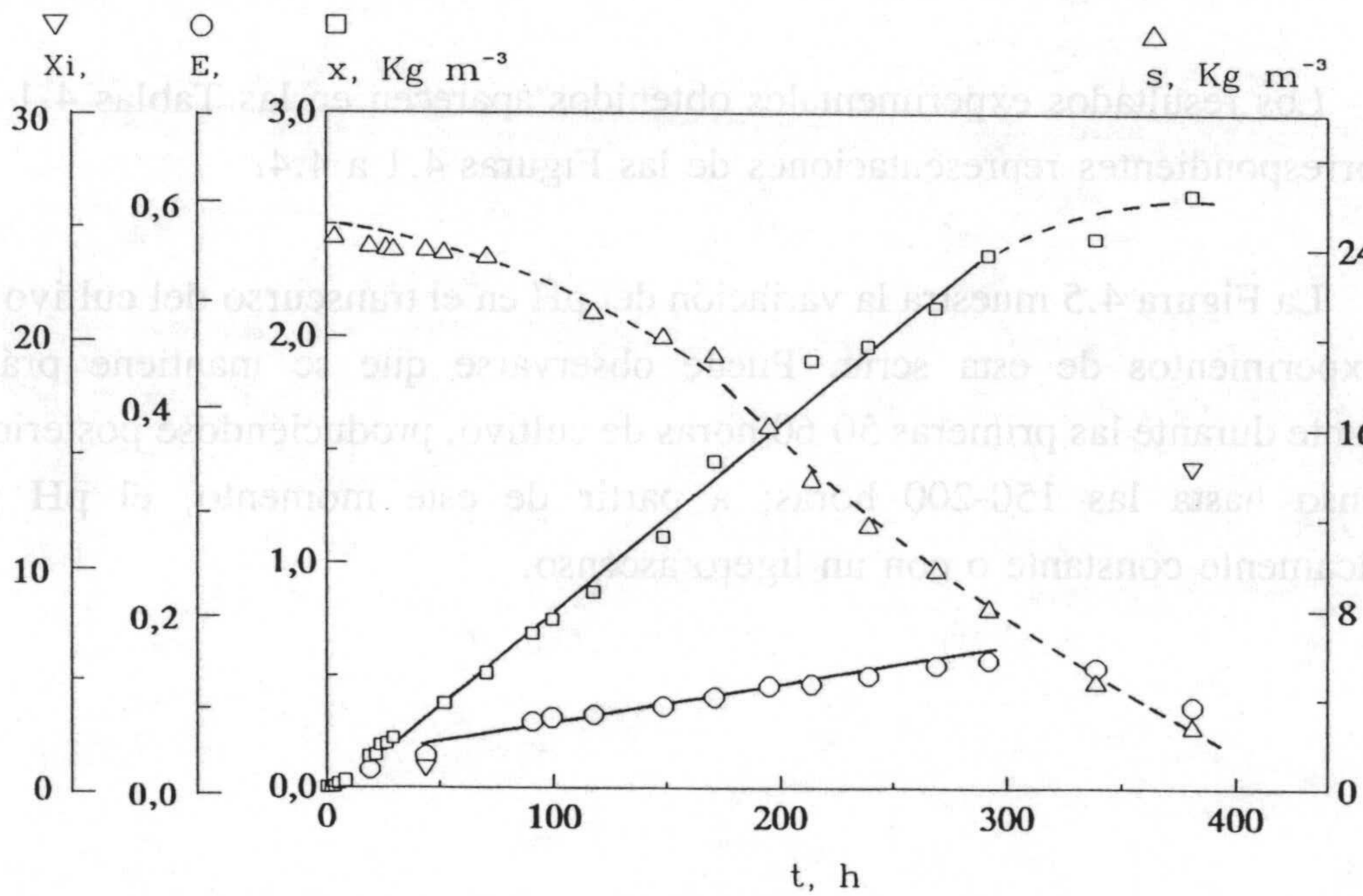


Fig. 4.1

TABLA 4.2

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: H-A1

pH_i = 5,5

Q = 0,075 v/v/min

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,004			
3,0	0,006			
5,5	0,014			
8,5	0,047	23,07		
11,0	0,087			
20,0	0,459		0,011	
24,0	0,648	20,62		
27,0	0,747	18,41	0,015	
31,0	0,914	16,87	0,016	
44,0	1,705	15,84	0,028	
48,0	1,866	14,78	0,031	
54,0	2,119		0,049	
72,0	3,046	11,27	0,050	
77,5	3,507	11,13	0,051	
99,0		7,25	0,057	
128,0	5,942	4,96	0,054	6,86
152,0	6,543	2,37	0,062	
176,0	6,865	1,41	0,054	
198,0	7,466	0,90	0,048	
225,0	7,594	0,57	0,009	7,18
248,0	7,702			

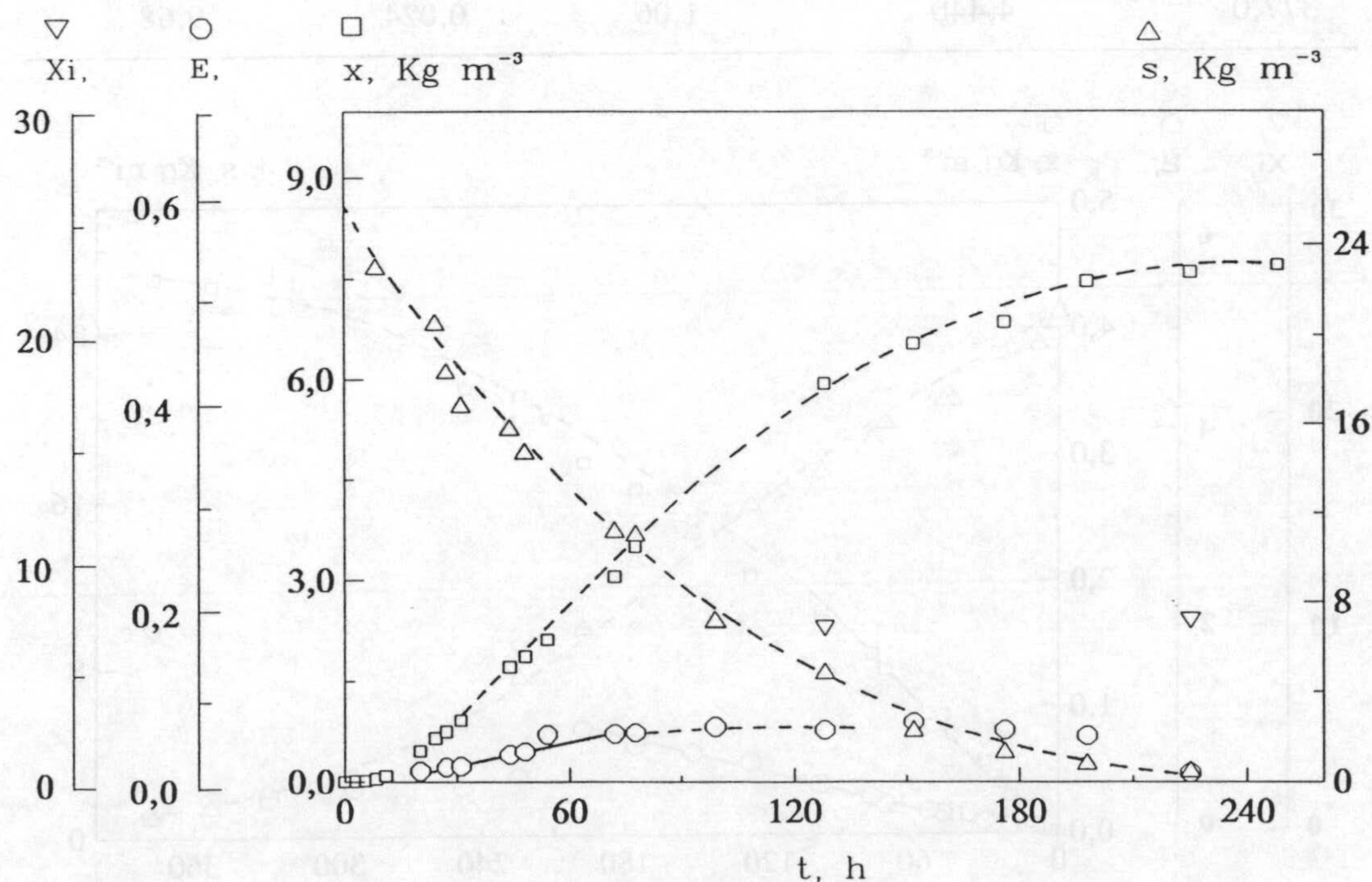


Fig. 4.2

TABLA 4.3

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: H-A2

pH_i = 5,5

Q = 0,150 v/v/min

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,005	24,91		
3,0	0,008			
5,5	0,017			
8,5	0,049	23,33		
11,0	0,086			
20,0	0,296	23,16	0,009	
24,0	0,399	22,90		
27,0	0,457	22,89	0,011	
31,0	0,571		0,014	
44,0	0,785	20,73	0,023	2,78
48,0	0,831	20,69	0,023	
54,0	0,949		0,026	
72,0	1,292	19,61	0,034	
77,5	1,421	18,91	0,043	
99,0	1,769	17,35	0,057	
128,0	2,048	15,80	0,082	
152,0	2,499	14,49	0,093	
176,0	2,746	13,13	0,102	
198,0	2,960	9,90	0,120	
225,0	3,486	7,57	0,067	8,86
248,0	3,550	5,69	0,055	
294,0	4,162	3,03	0,054	
329,0		2,35	0,043	
353,0	4,375	1,49	0,042	
377,0	4,440	1,06	0,024	9,68

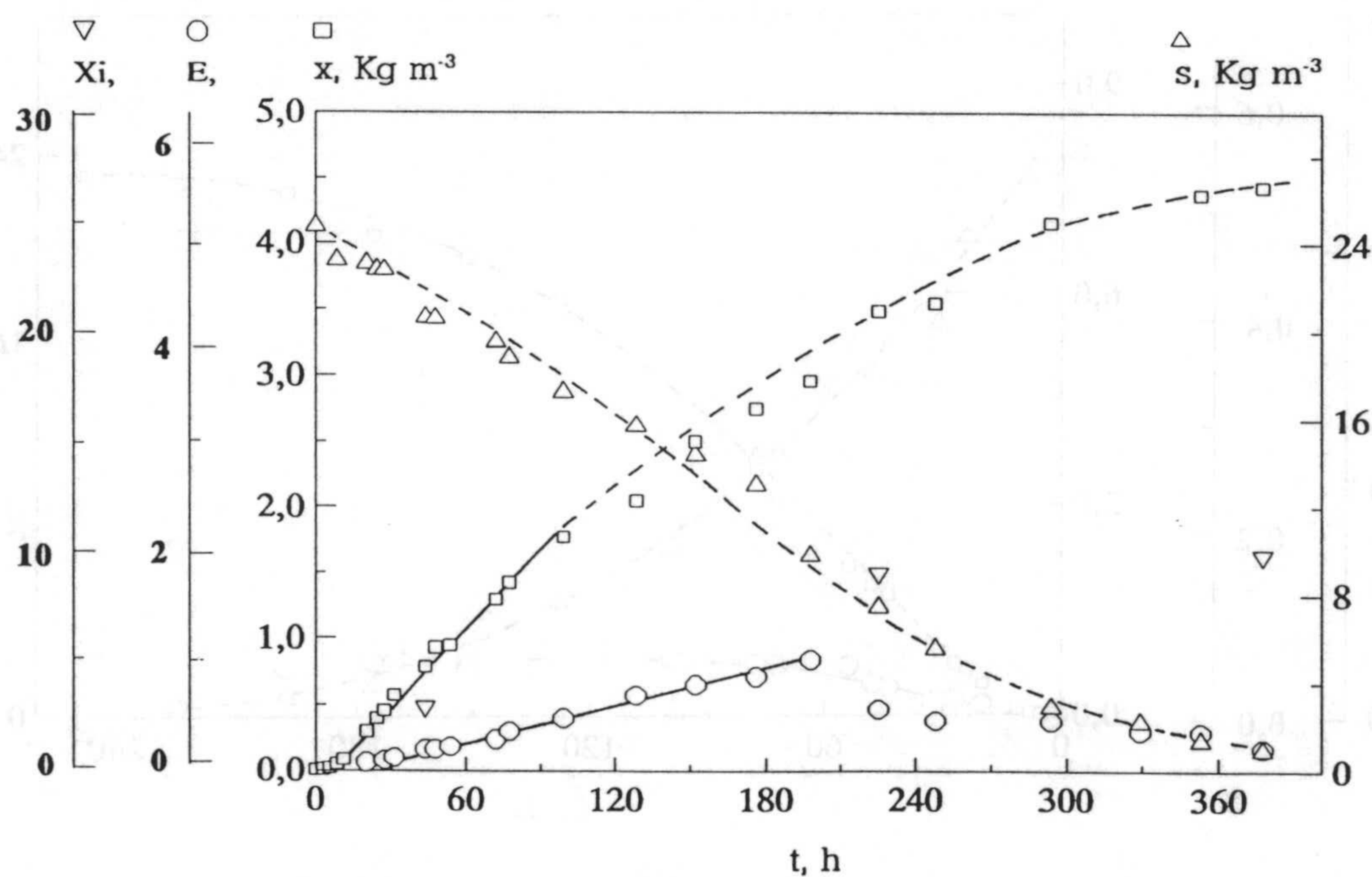


Fig. 4.3

TABLA 4.4

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: H-A3

pH_i = 5,5

Q = 0,300 v/v/min

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,002			
3,0	0,003			
5,5	0,008			
8,5	0,029			
11,0	0,057			
20,0	0,435	22,99	0,015	
24,0	0,682	22,82		
27,0	0,725	22,64	0,035	
31,0	0,871	21,50	0,040	
44,0	1,308	19,34	0,074	1,56
48,0	1,448	19,00	0,080	
54,0	1,625		0,083	
72,0	2,327	17,10	0,090	
77,5	2,510	16,24	0,096	
99,0	3,250	12,24	0,113	
128,0	4,139	8,99	0,120	
152,0	4,783	5,99	0,153	
176,0	5,341	3,50	0,170	
198,0	6,157	2,01	0,034	
225,0	6,800	1,06	0,001	5,71
248,0	7,036	0,68		
253,0	7,105	0,64		6,18

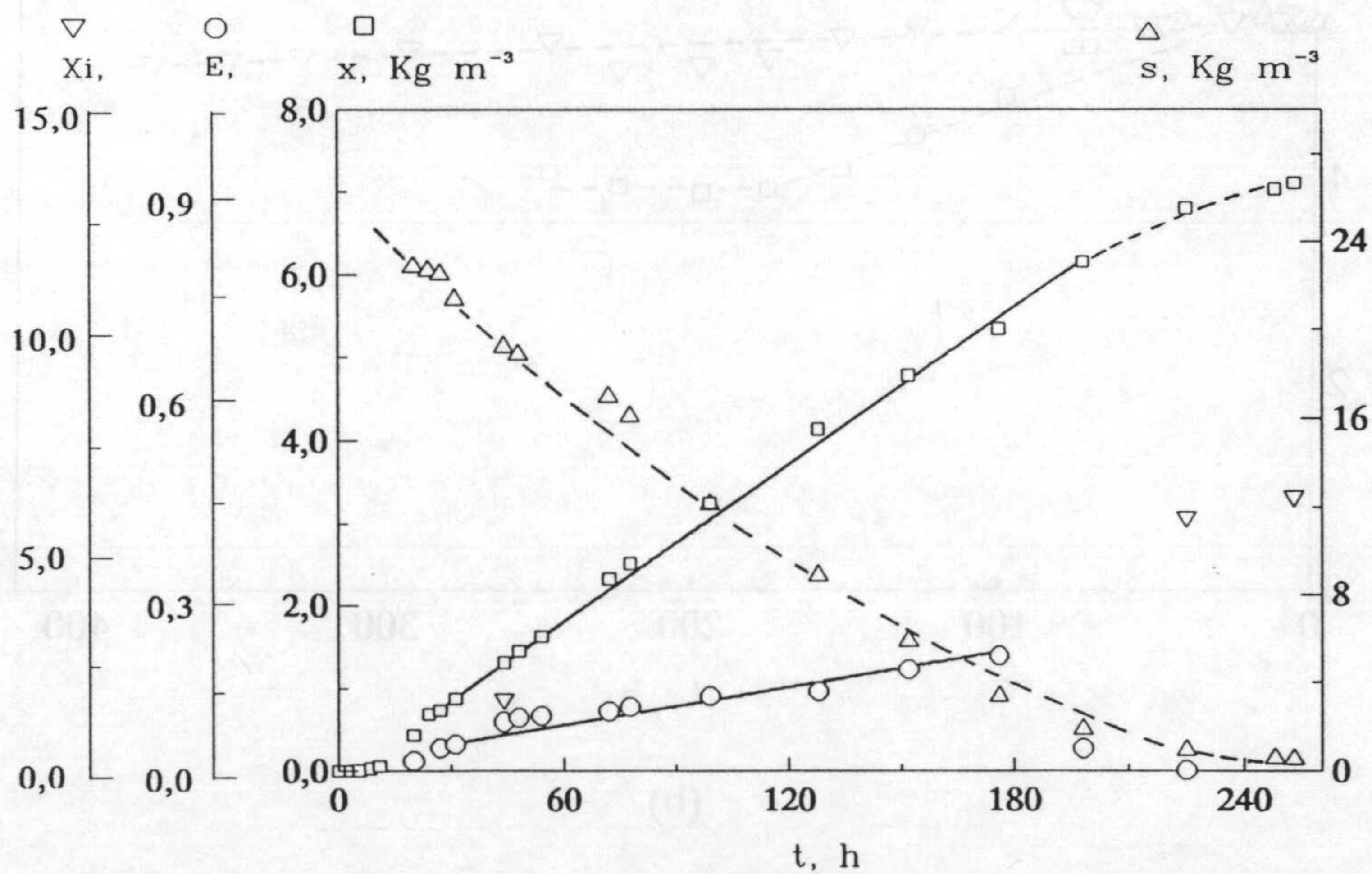
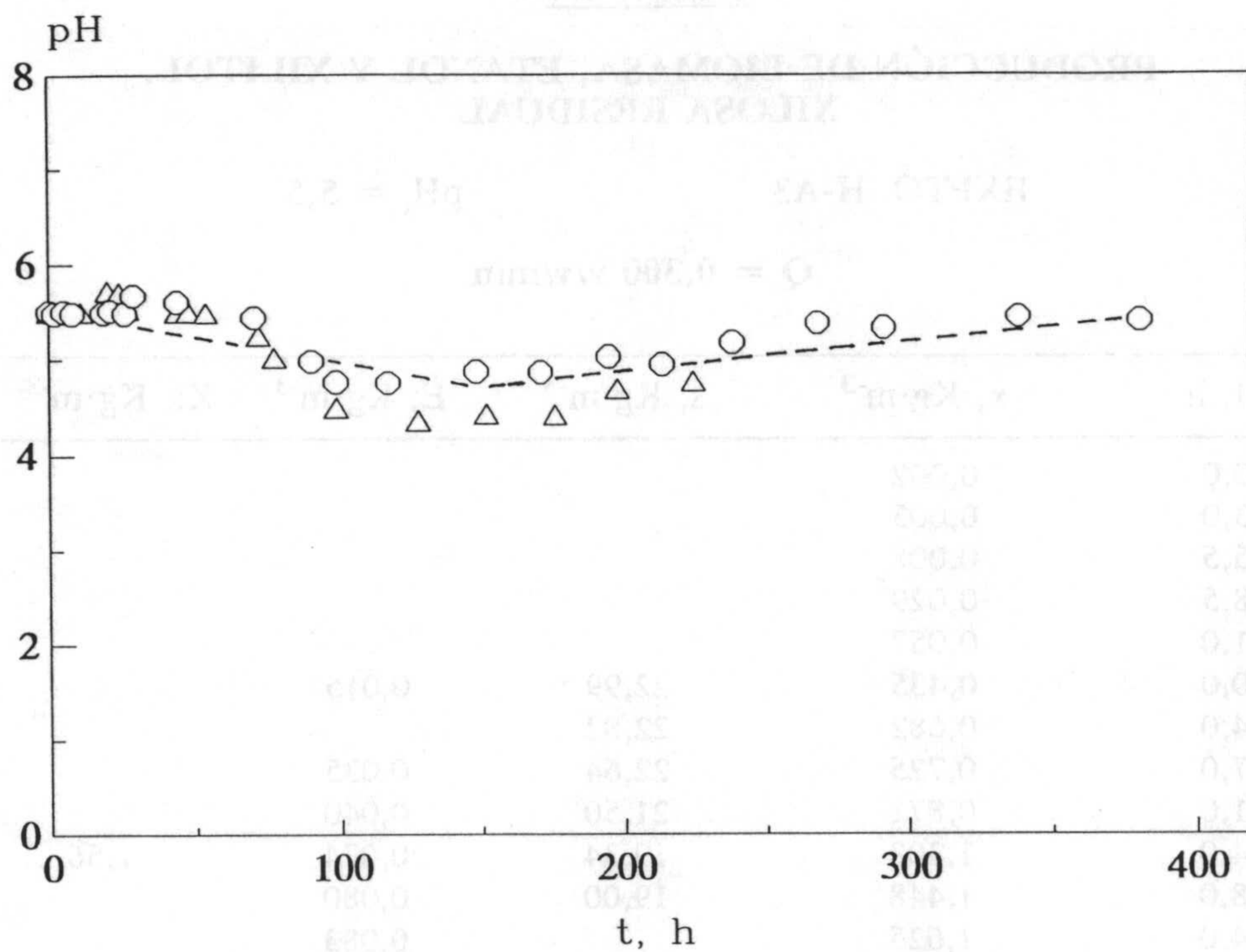
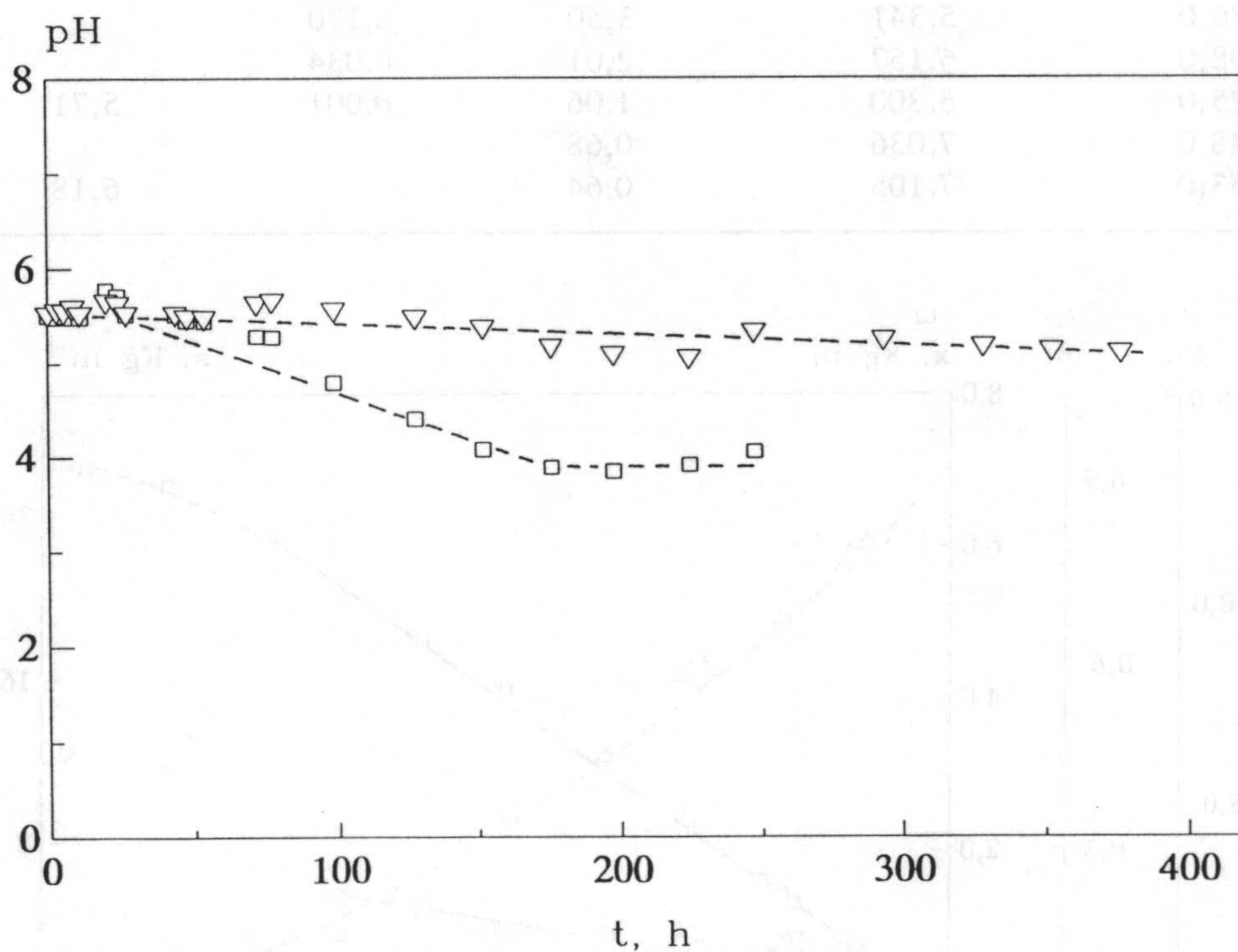


Fig. 4.4



(a)



(b)

Fig. 4.5.- Variación del pH en los experimentos de la serie de aireación:
 (a) H-B (○) y H-A1 (Δ); (b) H-A2 (▽) y H-A3 (□).

4.1.2 Influencia del pH inicial

En las Tablas 4.5 a 4.7 aparecen los resultados experimentales correspondientes a la serie H-P, en la que se ha modificado el pH inicial mientras que se ha mantenido constante el nivel de aireación, $Q=0,000$ v/v/min, y la concentración inicial de xilosa, $s_0=25$ Kg·m⁻³.

En las Figuras 4.6 a 4.8 se muestra la representación del consumo de sustrato y de la producción de biomasa, etanol y xilitol frente al tiempo, para los distintos experimentos de la serie.

Los valores de pH inicial ensayados han sido 3,5, 4,5, 5,5 y 6,5, cuya variación en el transcurso del experimento se muestra en la Figura 4.9.

Se observa que en todos los casos existe un descenso del pH con el tiempo, siendo algo más acusado cuanto mayor es el pH inicial. Así, en el caso de $pH_i=3,5$, se mantiene prácticamente constante durante todo el experimento, mientras que en los restantes hay descensos significativos que alcanzan aproximadamente dos unidades en el cultivo de $pH_i=6,5$.

Estos descensos, al igual que los observados en la serie en que se modificó el nivel de aireación, pueden ser debidos a la excreción celular de bioproductos de carácter ácido, tales como ácido acético, glicerol y otros alcoholes que, aunque no han sido comprobados en *Hansenula polymorpha*, sí han sido detectados en otras levaduras como *Candida shehatae* y *Pichia stipitis*, du Preez y col. (1988).

TABLA 4.5

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: H-P1

Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 3,5

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,004			
2,0	0,004			
3,5	0,005	24,40		
5,0	0,008			
8,0	0,027			
18,5	0,198	23,00	0,004	
21,0	0,234			
23,0	0,258			
26,0	0,311	22,25		
29,0	0,341	22,81		
44,0		22,12	0,008	3,00
52,0	0,573	20,80		
70,5	0,788	20,76	0,010	
90,5	1,035	20,62	0,014	
99,0	1,088	20,57	0,018	
117,5	1,357		0,023	
148,5	1,404	17,66	0,031	
171,0	1,844		0,037	
195,0	1,930	12,64	0,042	
214,0	2,316	10,93	0,046	
239,0	2,563	9,26	0,053	
269,0	2,885	7,29	0,062	
292,0	3,196	6,06	0,068	
339,0	3,314	3,61	0,070	
381,0	3,400	2,32	0,062	13,67

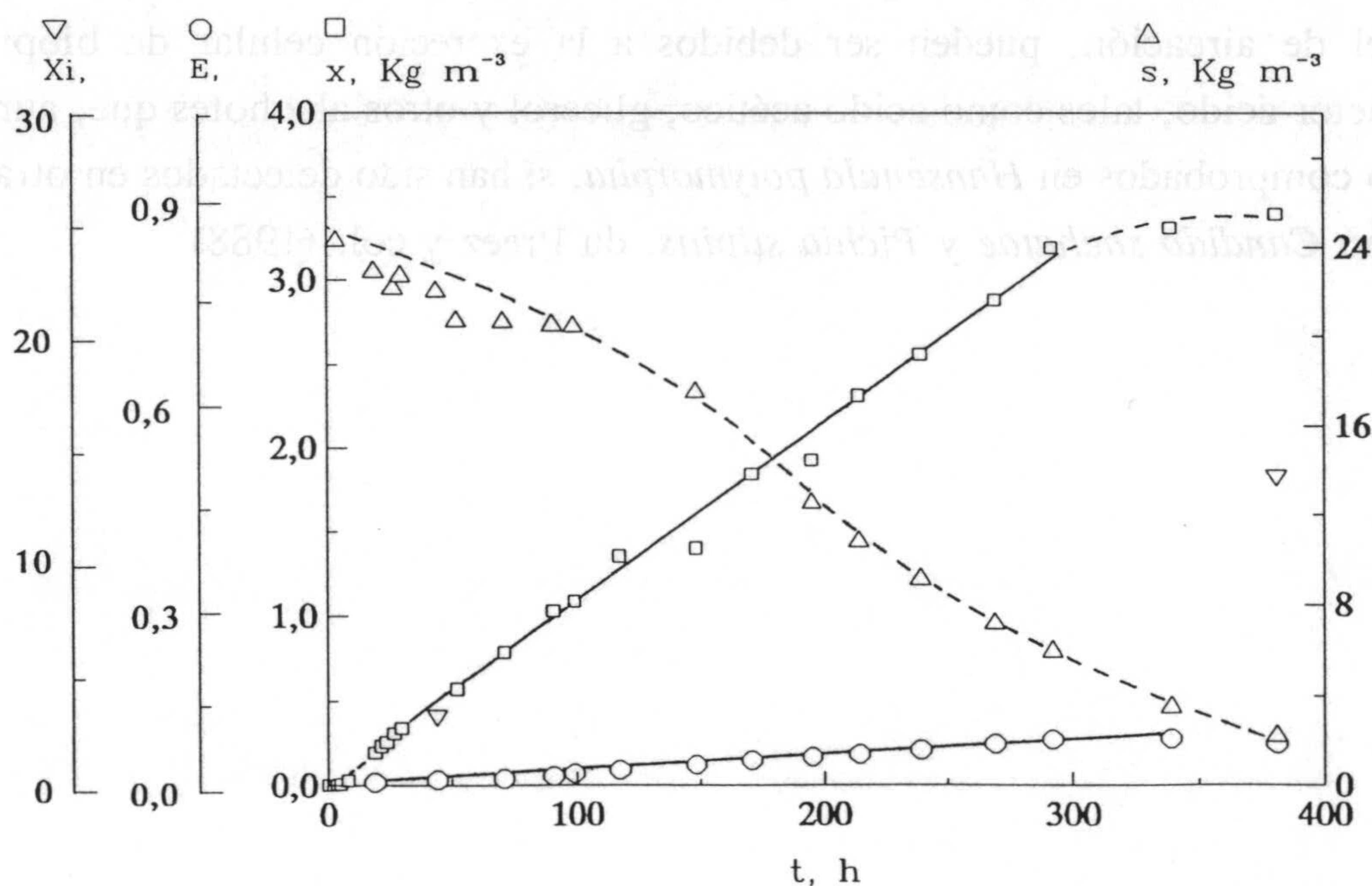


Fig. 4.6

TABLA 4.6

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: H-P2

Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 4,5

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,003			
2,0	0,005			
3,5	0,005	23,83		
5,0	0,009			
8,0	0,034			
18,5	0,295	22,47	0,005	
21,0	0,326			
23,0	0,340			
26,0	0,347	20,45		
29,0	0,442	20,18		
44,0		19,31	0,008	
52,0	0,756	18,87		5,55
70,5	0,954	18,70	0,010	
90,5	1,164	17,25	0,016	
99,0	1,271	17,08	0,023	
117,5	1,389	16,72	0,025	
148,5	1,490	12,63	0,029	
171,0	1,941	10,38	0,040	
195,0	1,995	7,71	0,045	
214,0	2,134	6,54		
239,0	2,767	4,88	0,058	
269,0	2,821	3,55		
292,0	3,379	2,32	0,071	
339,0	3,786	1,16	0,085	
381,0	3,851	0,74	0,077	16,44

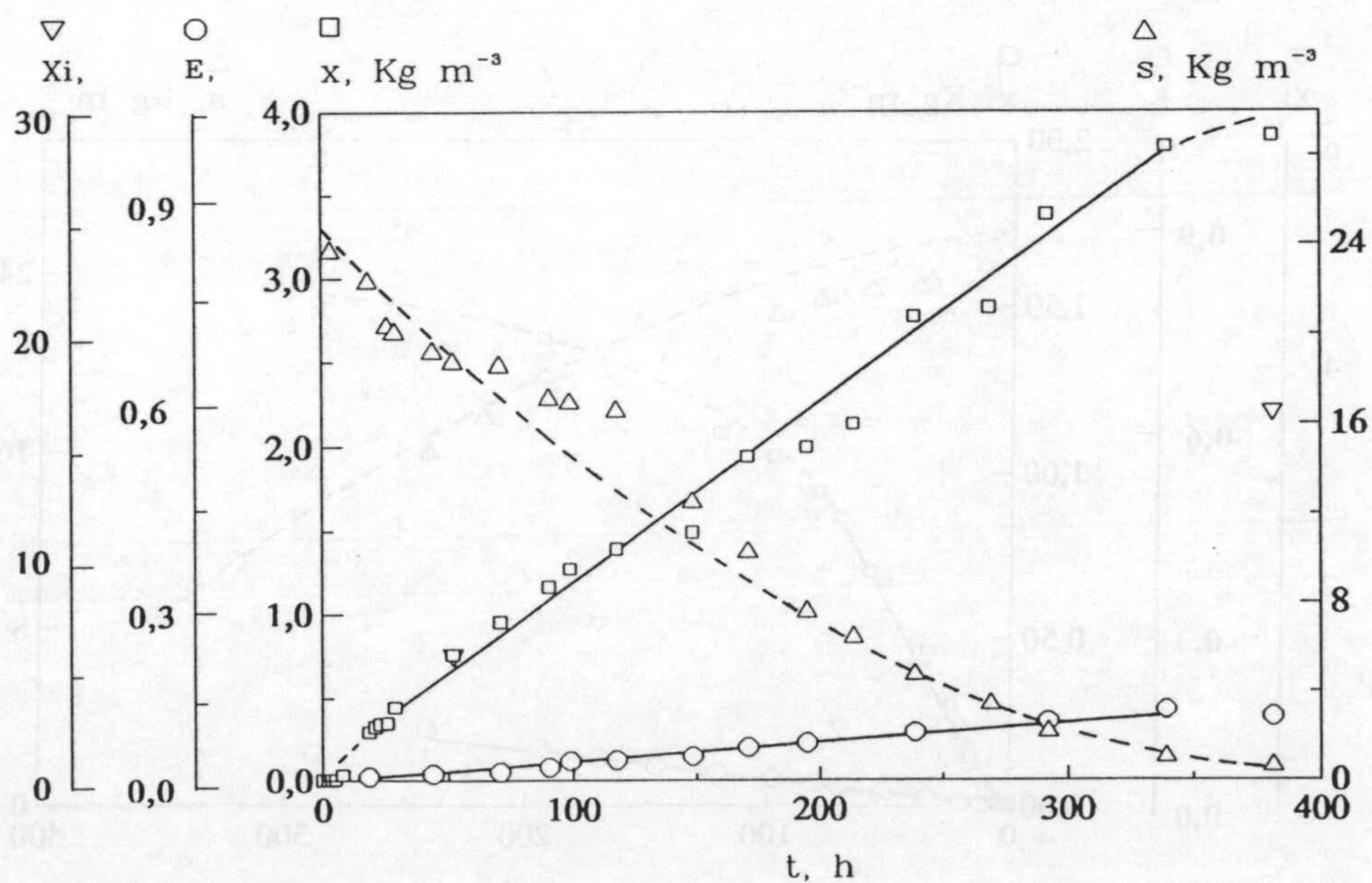


Fig. 4.7

TABLA 4.7

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: H-P3

Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 6,5

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,005			
2,0	0,006			
3,5	0,008			
5,0	0,010			
6,5	0,019	24,81		
8,0	0,025			
9,0	0,035			
10,0	0,043			
12,0	0,073	24,43	0,003	
14,0	0,095			
17,0	0,151			
21,0	0,245		0,007	0,54
25,0	0,301			
34,0	0,468	23,68	0,015	
38,5	0,498	23,47		
52,0	0,670		0,022	
58,0	0,704	23,36		
71,0	0,867	22,96	0,031	0,70
80,0	0,944	22,90	0,038	
98,0	1,052	22,18	0,042	
121,0	1,122		0,050	
146,0			0,060	
170,0	1,363	19,73	0,071	1,63
194,0	1,406	19,44	0,088	
219,0		17,59		
241,0		15,99	0,114	
288,0	1,481	15,08	0,080	
337,0		10,12		

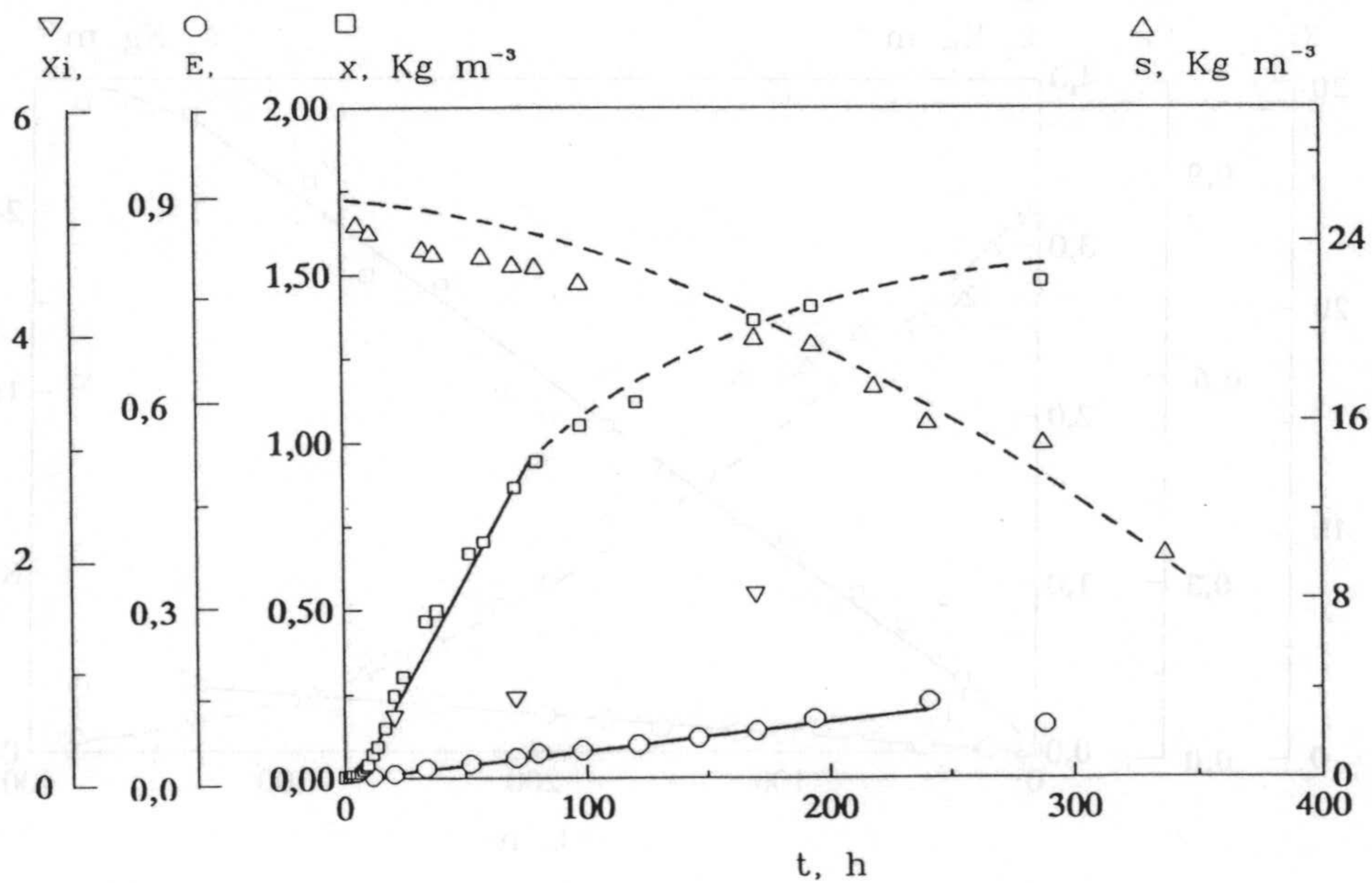


Fig. 4.8

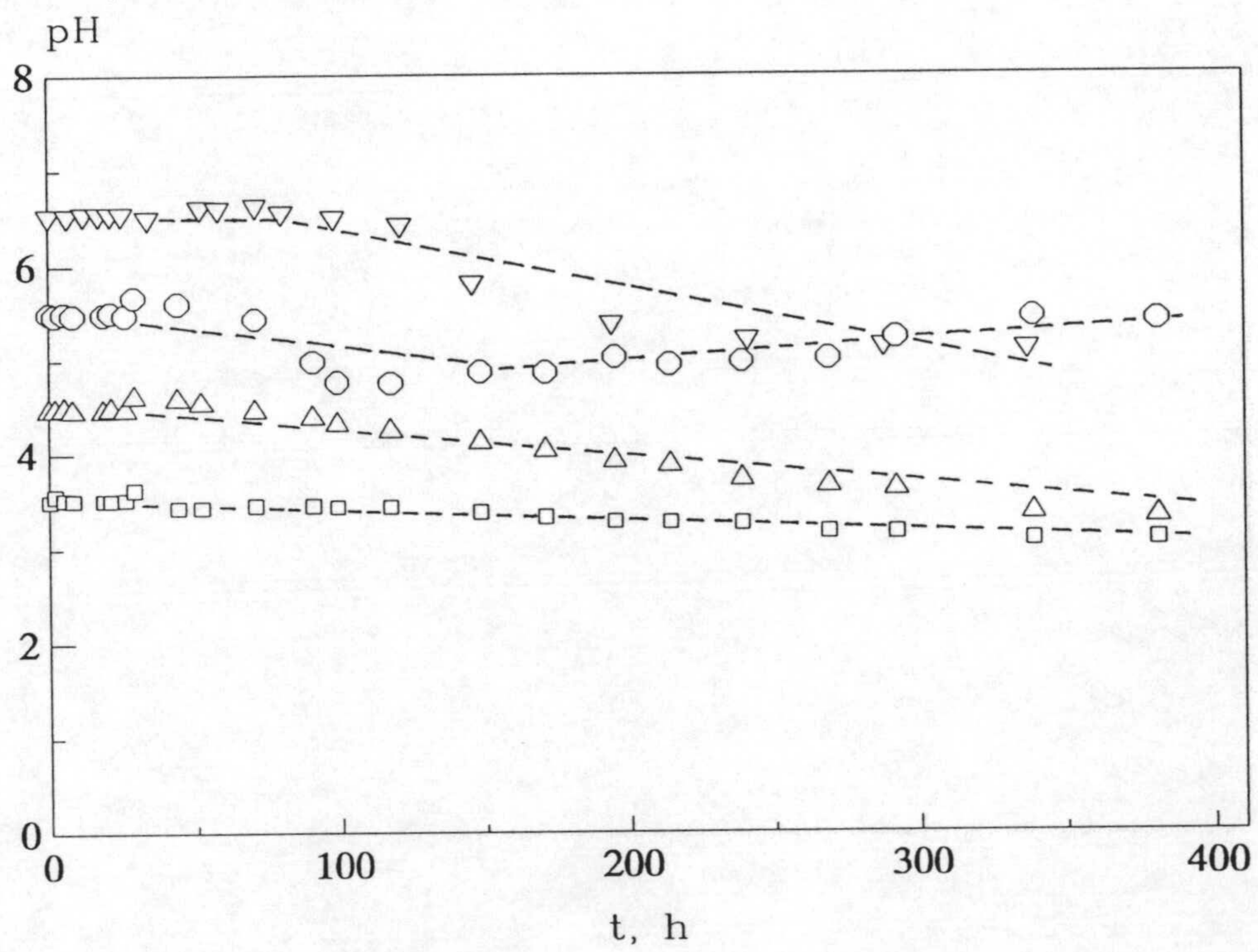


Fig. 4.9.- Variación del pH en los experimentos de la serie de pH inicial:

H-P1 (□), H-P2 (Δ), H-B (○) y H-P3 (▽).

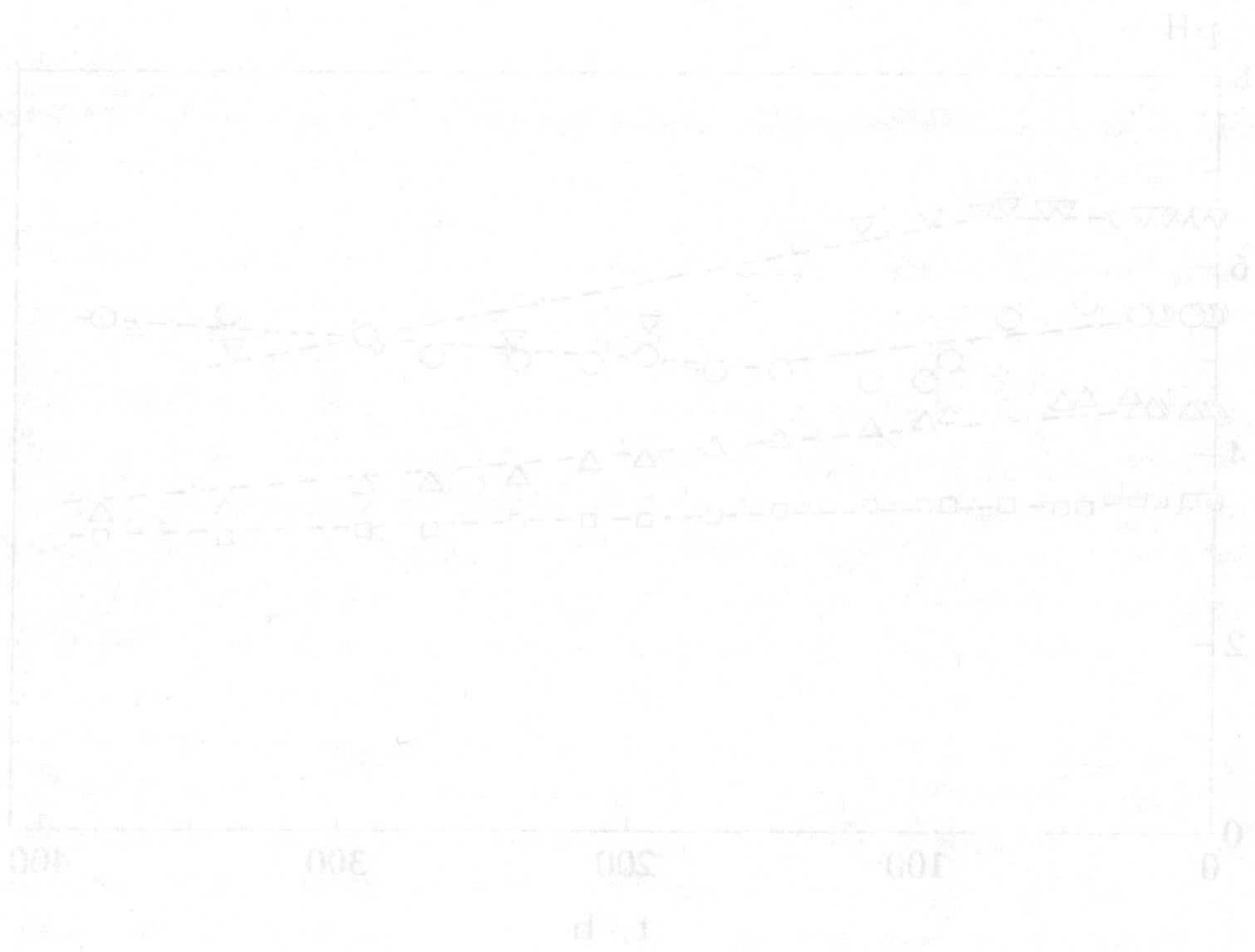


Fig. 4.91 - Variación del pH en los experimentos de la serie de pH inicial.

H-P1 (□), H-B (Δ), H-P2 (○) y H-P3 (▽).

4.2 PACHYSOLEN TANNOPHILUS

En las Tablas 4.8 a 4.25 aparecen los resultados experimentales correspondientes a la fermentación discontinua con *Pachysolen tannophilus*.

La influencia del caudal de aireación empleado en los distintos cultivos (serie P-A) se recoge en las Tablas 4.8 a 4.12. En las Tablas 4.13 a 4.17 figuran los datos experimentales correspondientes a la serie P-P, en la que se ha estudiado el pH inicial del medio de cultivo.

Se ha estudiado también el crecimiento de este microorganismo sobre mezclas xilosa-glucosa en distintas proporciones. Los resultados experimentales se recogen en las Tablas 4.18 a 4.25.

En las Figuras 4.10 a 4.30 se recogen las representaciones de las concentraciones de biomasa, etanol y xilitol producidos y azúcares residuales a lo largo de cada cultivo, así como la evolución del pH frente al tiempo para los experimentos de las tres series.

4.2.1 Influencia del caudal de aireación

Para el estudio de esta variable se han realizado cultivos en los que se ha mantenido constante el pH inicial, en 3,5, variándose el caudal de aire en los siguientes valores: 0,000; 0,075; 0,150; 0,225 y 0,300 v/v/min. Los resultados experimentales obtenidos se reflejan en las Tablas 4.8 a 4.12, mientras que en las Figuras 4.10 a 4.14 aparecen las representaciones de las concentraciones de biomasa y etanol producidos y de xilosa residual.

En la Figura 4.15 se muestra la evolución del pH con el tiempo para los experimentos de esta serie. Puede observarse que esta variable disminuye a medida que progresa el cultivo y que este descenso es mayor, por lo general, cuanto mayor es el caudal de aire aportado.

TABLA 4.8

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: P-A1

pH_i = 3,5

Q = 0,000 v/v/min

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³
0,0	0,015		
2,0	0,022		
3,5	0,033		
7,0	0,082		
16,0	0,277		
18,5	0,293		0,055
21,0	0,330		
23,5	0,393	23,29	
26,5	0,450		
41,0	0,953	19,36	0,661
47,5	0,963	17,30	
50,5	1,131		1,086
64,5	1,686	12,87	2,467
71,5	1,885		
74,0	2,136	9,28	3,430
89,5	2,597	3,69	5,749
95,5	2,870		
98,0		0,71	
113,0		0,16	6,507
139,5	3,551	0,06	7,073

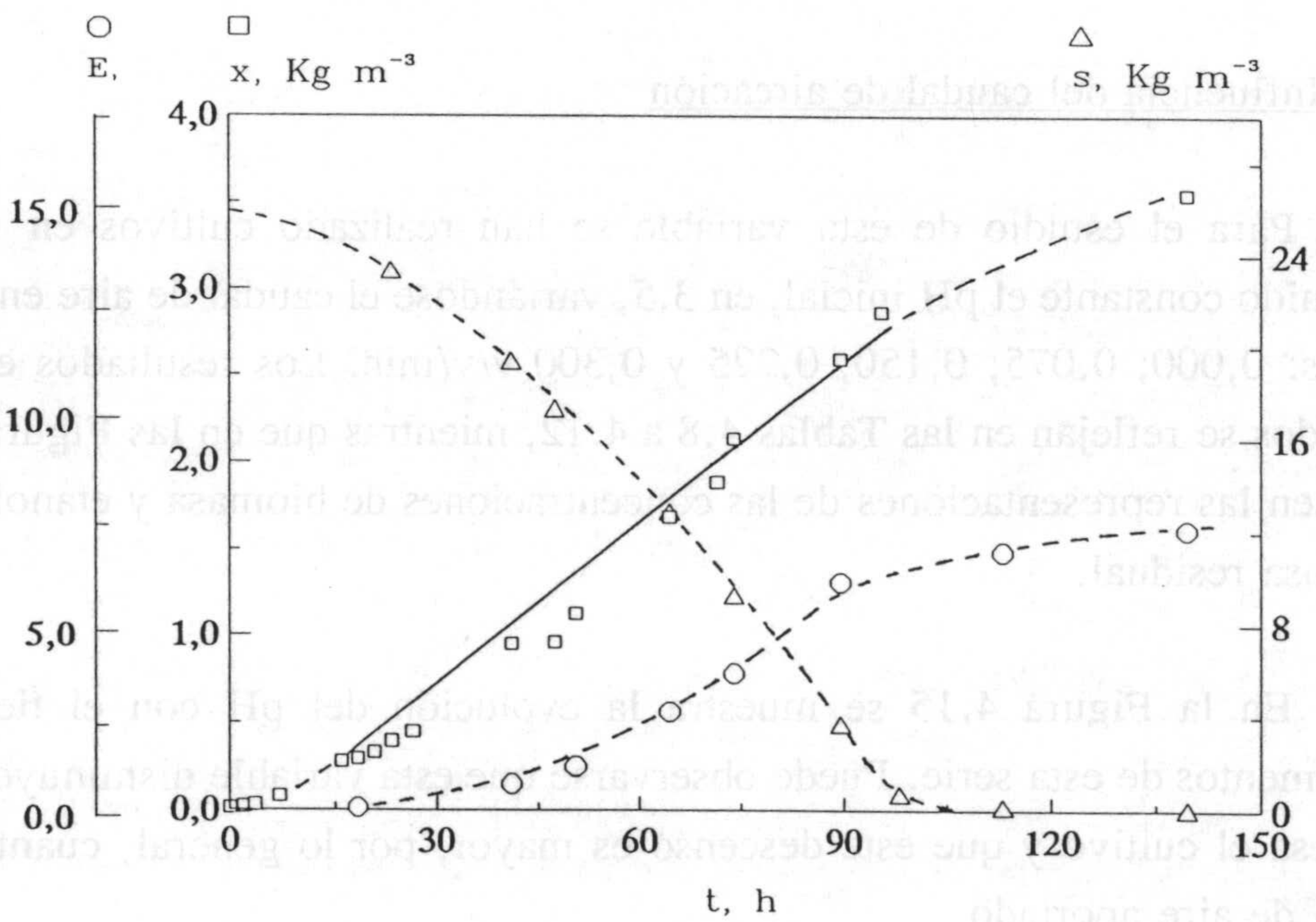


Fig. 4.10

TABLA 4.9

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: P-A2

pH_i = 3,5

Q = 0,075 v/v/min

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³
0,0	0,020		
3,0	0,023		
5,0	0,051		
7,0	0,068		0,004
19,0	0,641		0,070
22,0	0,766		0,115
25,0	0,927	21,65	0,161
28,0	1,342	20,37	0,220
31,0	1,556	19,44	0,416
43,0	2,657		1,640
46,0	3,354	14,39	2,080
49,0	3,568	14,25	2,420
55,5	4,291	9,98	3,150
67,0	6,085	2,91	5,670
70,0	6,407		5,400
73,0	6,728	1,46	4,890
76,0	6,380		

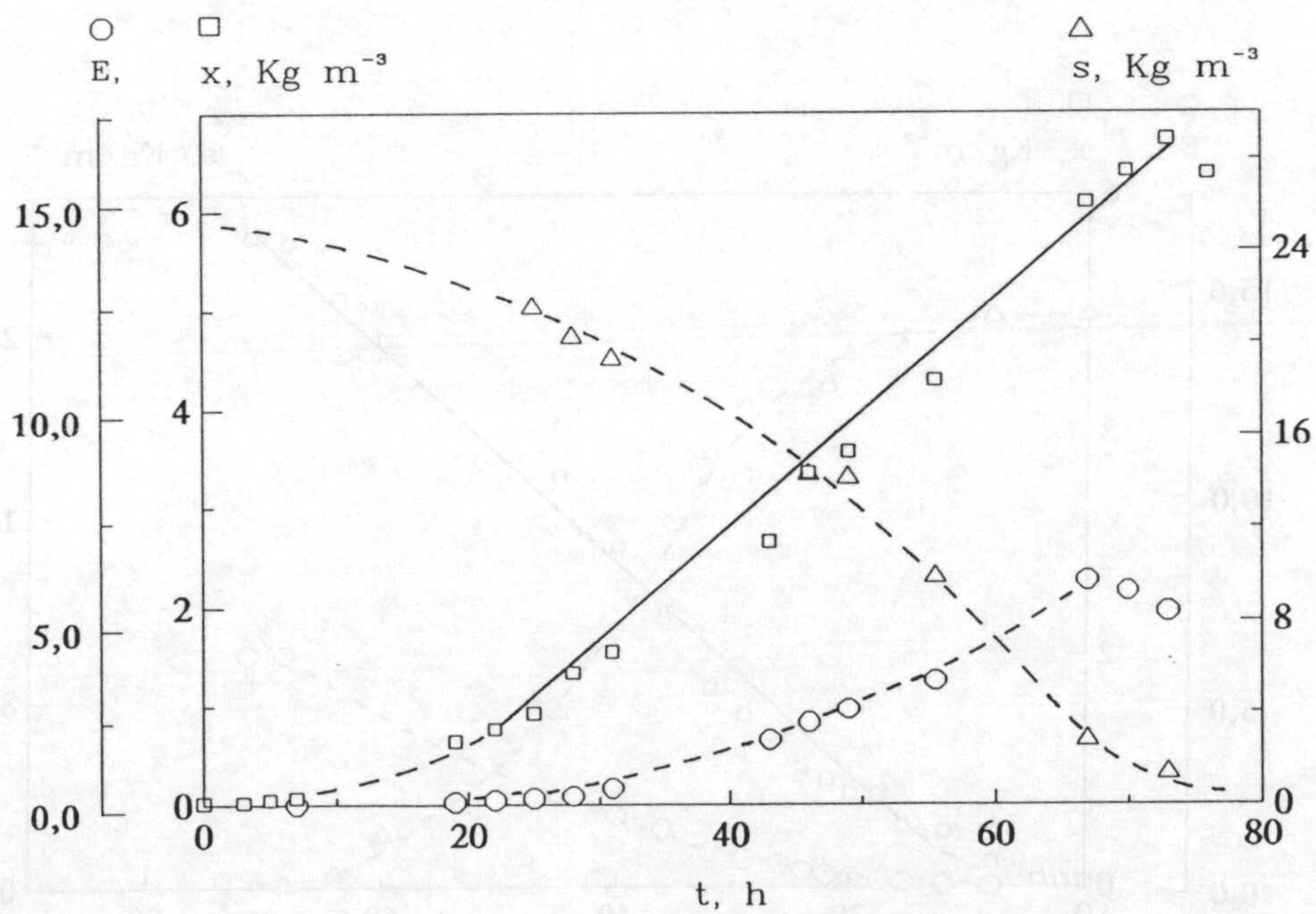


Fig. 4.11

TABLA 4.10

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: P-A3

pH_i = 3,5

Q = 0,150 v/v/min

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³
0,0	0,030	24,91	
2,0	0,039		
4,0	0,062		
6,0	0,115		
8,0	0,211	24,82	0,020
12,0	0,472		0,054
15,5	0,512		0,115
17,5	0,793		0,147
20,0	0,806		0,227
22,0	0,921	21,80	0,288
24,0	1,040	21,54	0,401
26,0	1,274		0,548
29,0	1,481	20,93	0,684
32,0	1,709	18,84	0,859
36,0	2,320	12,56	1,450
40,0	2,952		1,810
45,0	3,567	7,61	
54,2			2,550
60,0	4,746	2,32	5,380
64,0	5,100	0,65	6,308
68,3	5,582	0,23	5,820
71,5	5,636	0,00	5,840
84,0	5,636		

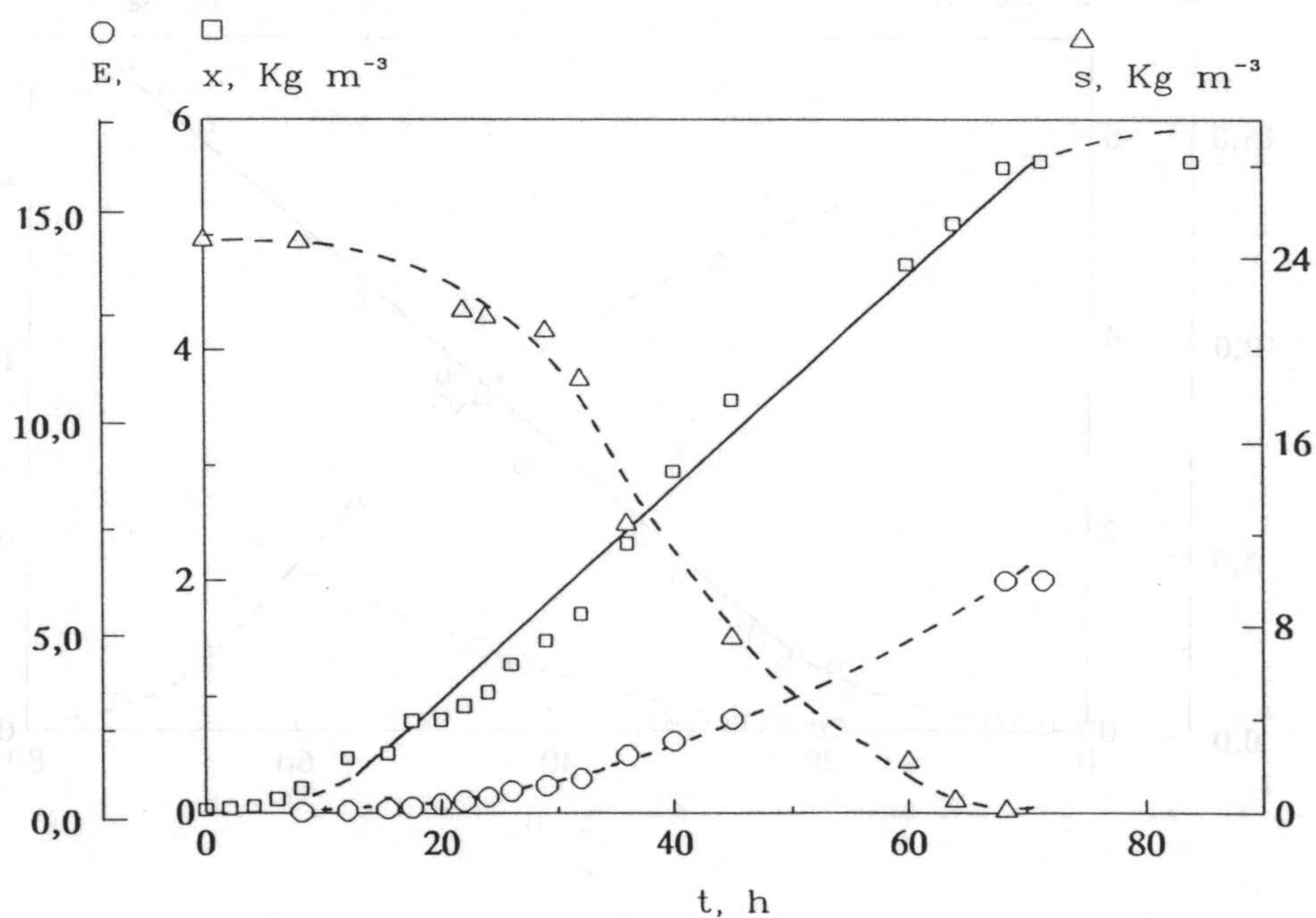


Fig. 4.12

TABLA 4.11

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: P-A4

pH_i = 3,5

Q = 0,225 v/v/min

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³
0,0	0,020		
3,0	0,022		
5,0	0,048		
7,0	0,064		
19,0	0,646	23,43	0,090
22,0	0,780	22,08	0,156
25,0	0,994		0,249
28,0	1,369	19,80	0,318
31,0	1,463	18,52	0,465
43,0	2,604		1,520
46,0	3,461	14,32	1,880
49,0	3,595	13,92	2,350
55,5	4,344	11,50	3,080
67,0	5,951	2,72	5,260
70,0	6,540	1,19	5,570
73,0	6,621	0,66	4,600
76,0	6,246		

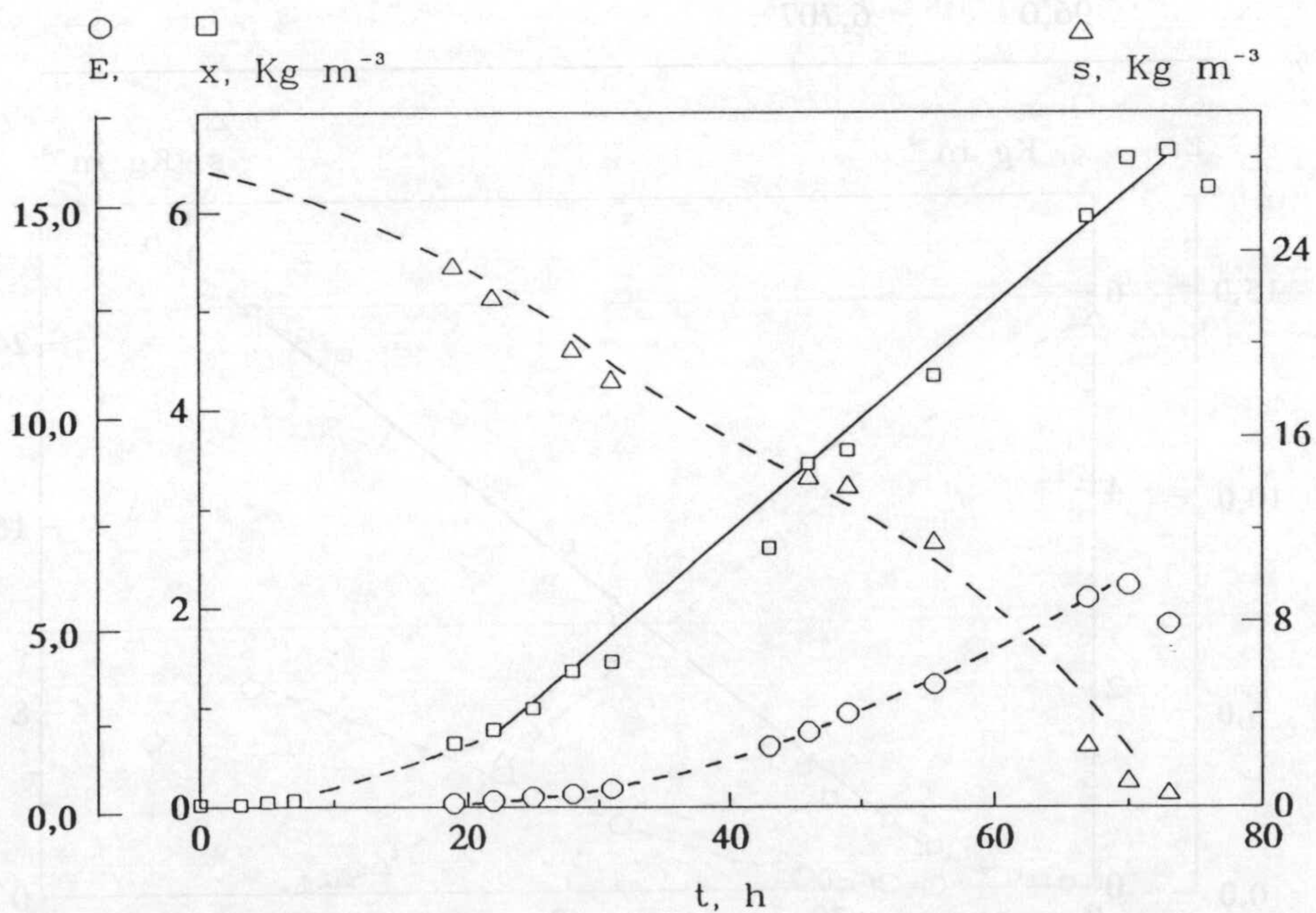


Fig. 4.13

TABLA 4.12

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: P-A5

pH_i = 3,5

Q = 0,300 v/v/min

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³
0,0	0,028	24,59	
2,0	0,037		
4,0	0,062		
6,0	0,119		
8,0	0,251		
12,0	0,418		0,051
15,5	0,686		0,129
17,5			0,161
20,0	0,927	16,96	0,254
22,0	1,222	15,60	0,325
24,0	1,289	15,12	
36,0	2,721	10,31	1,680
40,0	3,487		
45,0	4,103	5,73	3,000
54,2		1,21	
57,0		0,72	
60,0	5,657	0,45	
64,0	5,904		5,208
68,3	6,493		
71,5	6,600		3,890
84,0	6,654		
96,0	6,707		

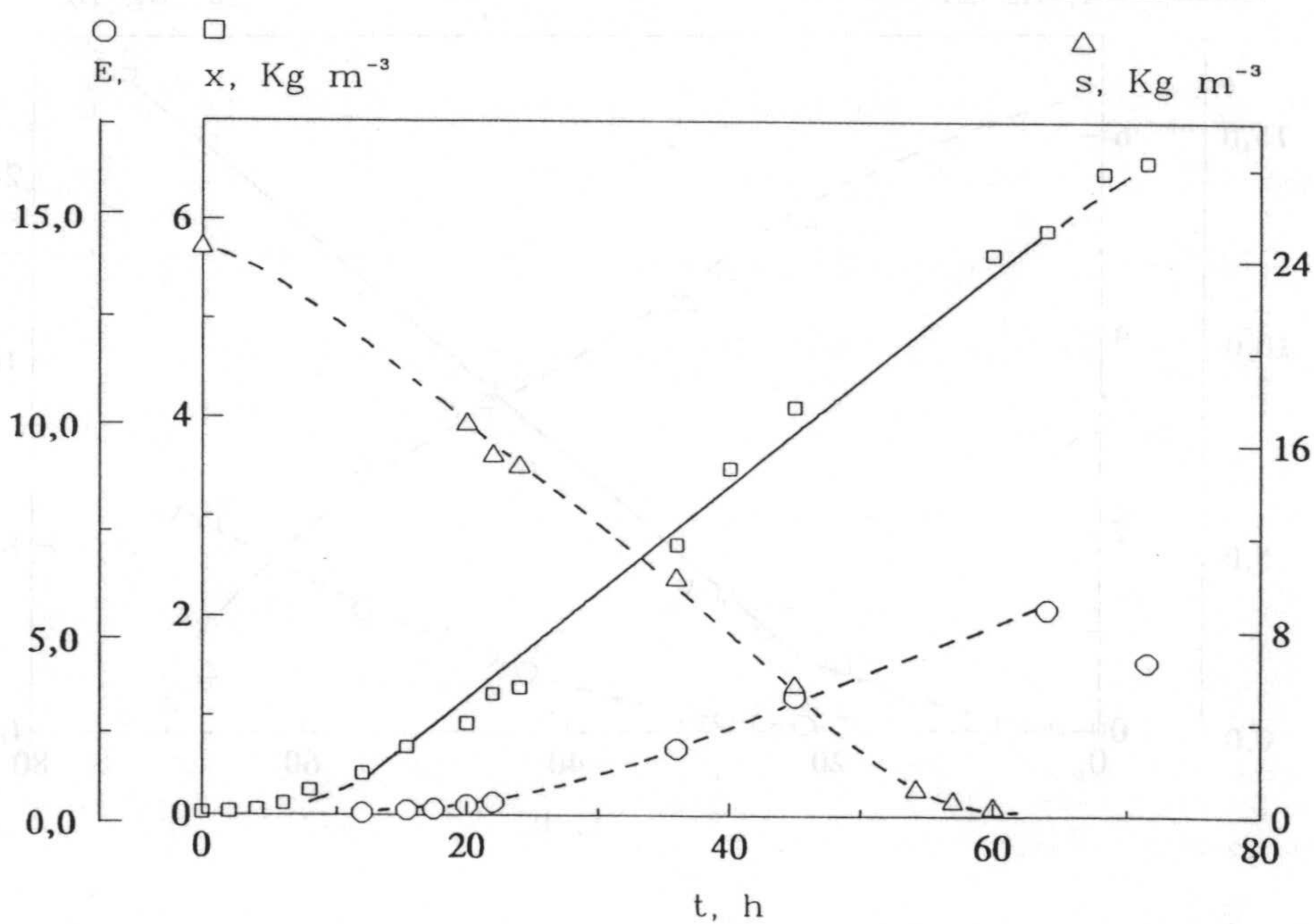


Fig. 4.14

4.2. Influencia del pH inicial

El nivel de aireación y la concentración inicial de xilosa se han mantenido constantes en los valores de 0.00 v/v/min y 2.5 K/m³ respectivamente para la serie P-T, en la que se ha estudiado la influencia del pH inicial. Los valores analizados para esta variable han sido 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5 y 6.5, y los correspondientes resultados experimentales se recogen en las Tablas 4.13, 4.14 y 4.15 y en las representaciones de las Figuras 4.16 a 4.20.

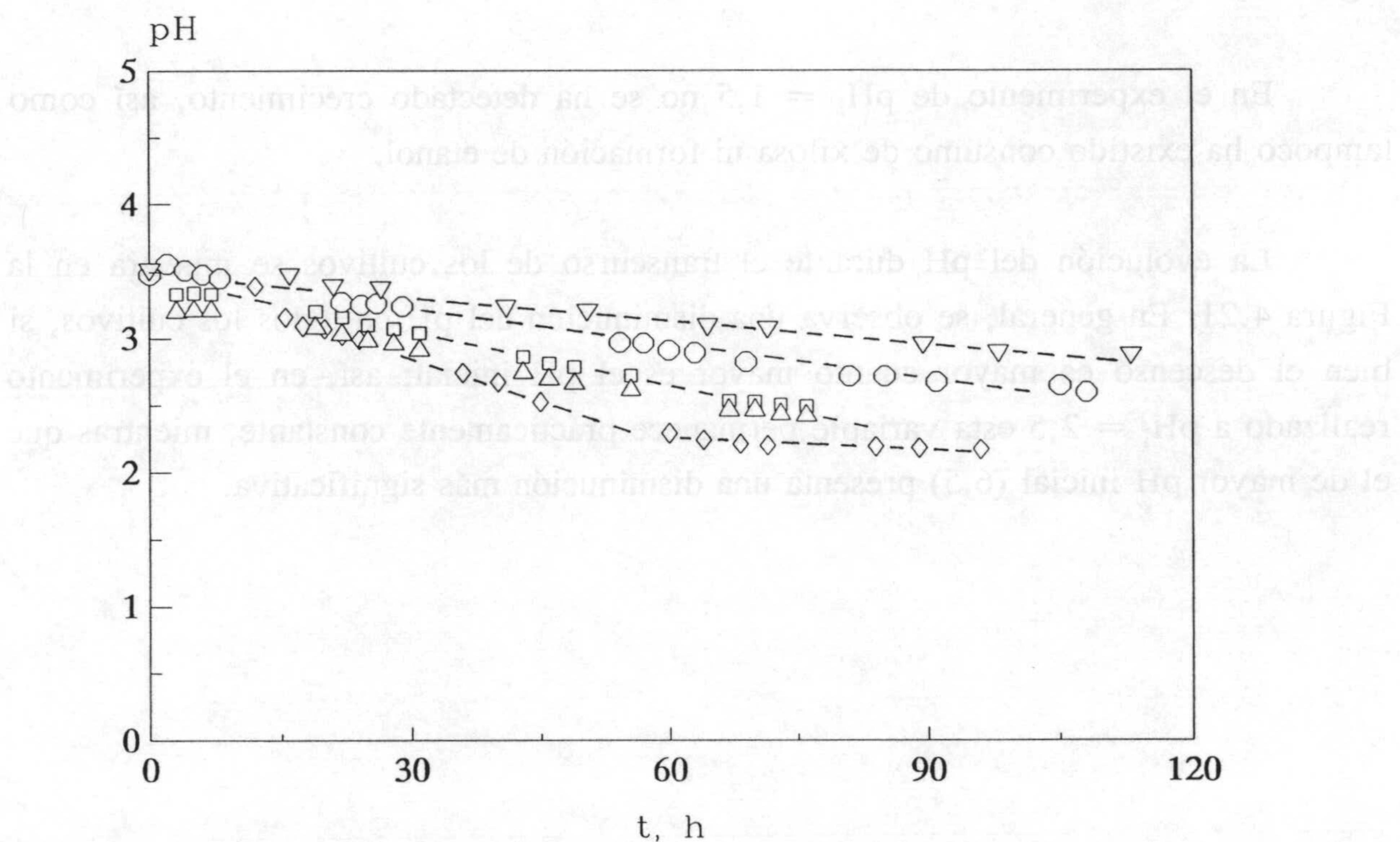


Fig. 4.15.- Variación del pH en los experimentos de la serie de aireación:
 P-A1 (∇), P-A2 (Δ), P-A3 (○), P-A4 (□) P-A5 (◇)

4.2.2 Influencia del pH inicial

El nivel de aireación y la concentración inicial de xilosa se han mantenido constantes en los valores de 0,00 v/v/min y 25 Kg·m⁻³, respectivamente, para la serie P-P, en la que se ha estudiado la influencia del pH inicial. Los valores analizados para esta variable han sido 1,5, 2,5, 3,5, 4,5, 5,5 y 6,5 y los correspondientes resultados experimentales se recogen en las Tablas 4.13 a 4.17 y en las representaciones de las Figuras 4.16 a 4.20.

En el experimento de $\text{pH}_i = 1,5$ no se ha detectado crecimiento, así como tampoco ha existido consumo de xilosa ni formación de etanol.

La evolución del pH durante el transcurso de los cultivos se muestra en la Figura 4.21. En general, se observa una disminución del pH en todos los cultivos, si bien el descenso es mayor cuanto mayor es el pH inicial; así, en el experimento realizado a $\text{pH}_i = 2,5$ esta variable permanece prácticamente constante, mientras que el de mayor pH inicial (6,5) presenta una disminución más significativa.

TABLA 4.13

PRODUCCIÓN DE BIOMASA.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: P-P1 Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 1,5

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³
0,0	0,041	
2,0	0,045	
4,5	0,047	24,07
6,5	0,044	
8,5	0,046	
10,5	0,044	
12,0	0,045	
19,0	0,043	24,57
22,5	0,041	24,45
30,0	0,041	
45,0	0,035	
50,0	0,033	
55,5	0,033	
67,5	0,028	
76,5	0,029	
95,5	0,023	
103,0	0,026	
117,0	0,024	
126,0	0,022	
143,0	0,021	
166,0	0,018	

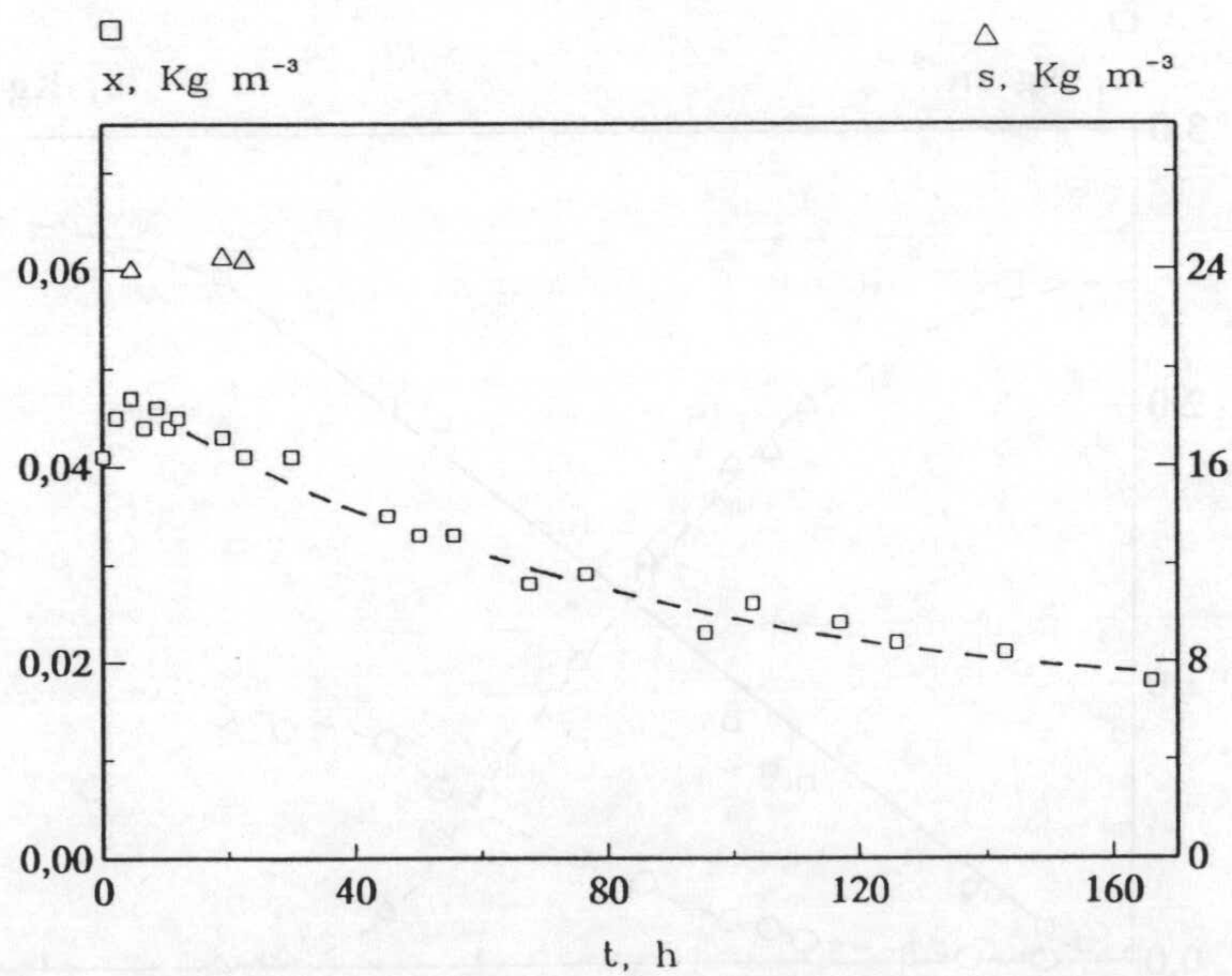


Fig. 4.16

TABLA 4.14

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: P-P2 Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 2,5

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³
0,0	0,028	14,0	0,0
2,0	0,033	14,0	0,0
4,5	0,045	14,0	0,0
6,5	0,062	14,0	0,0
8,5	0,085	14,0	0,0
10,5	0,105	14,0	0,0
12,0	0,128	14,0	0,044
19,0	0,235	14,0	0,08
22,5	0,268	14,0	0,093
30,0	0,377	14,0	0,176
45,0	0,649	20,21	0,463
50,0	0,695	18,55	0,723
55,5	0,867	18,08	0,904
67,5	1,403	14,77	1,718
76,5	1,555	11,02	2,283
95,5	1,954	4,71	3,729
103,0	2,022	2,06	4,746
117,0	2,304	0,49	4,972
126,0	2,482	0,21	5,312
143,0	2,503	0,0	3,786
166,0	2,744	0,0	4,068

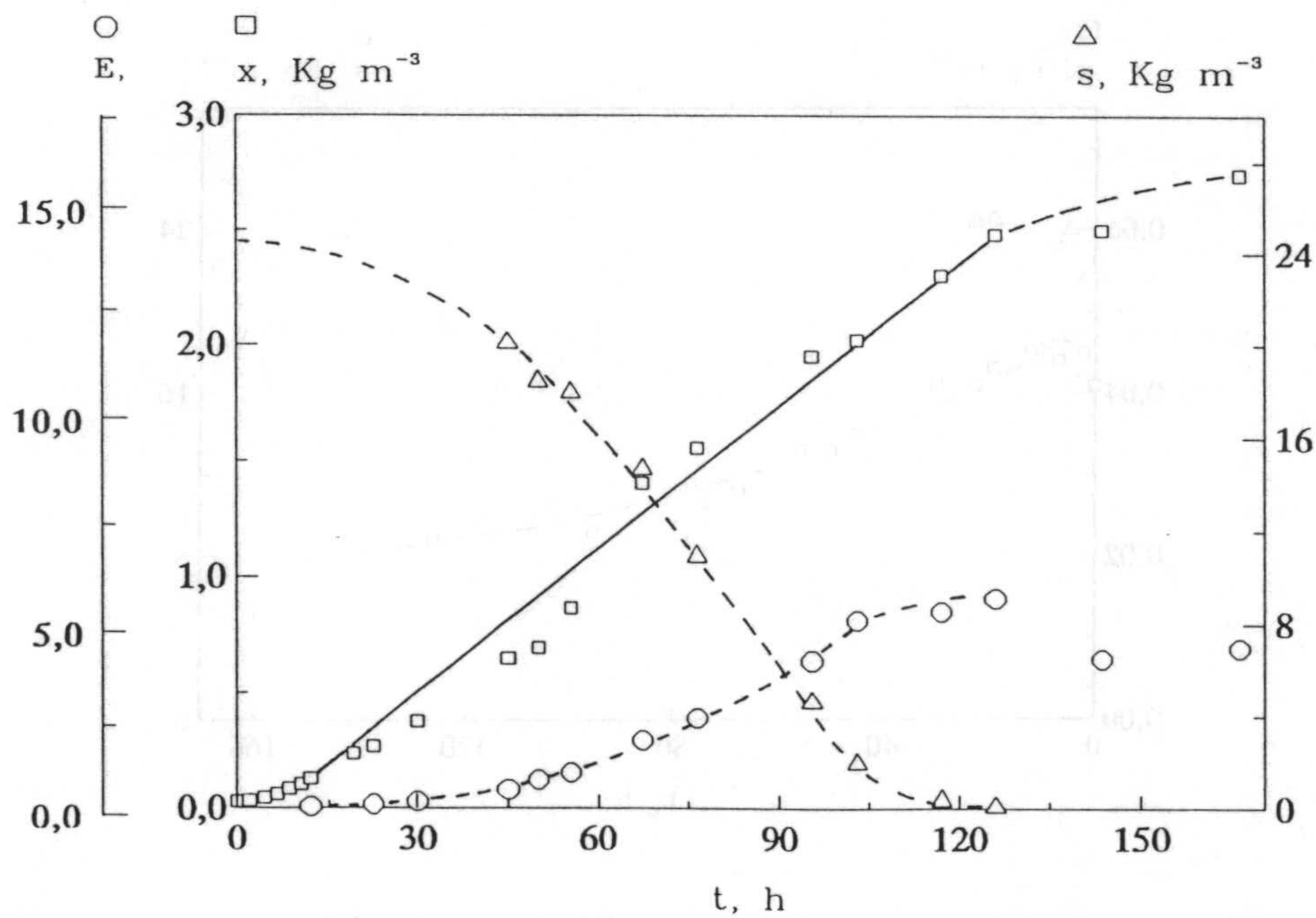


Fig. 4.17

TABLA 4.15

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: P-B Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 4,5

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³
0,0	0,015		
2,5	0,018		
6,0	0,047		0,002
7,5	0,065		
20,0	0,272		0,085
23,5	0,319		
28,0	0,414		0,198
44,0	0,754	19,56	0,610
48,0	0,785		
53,5	0,885	17,50	0,927
68,0	1,173	15,64	1,842
71,5	1,204		
76,0	1,330	11,47	2,893
91,0	1,906	9,23	5,017
95,5	1,938		
98,5	2,053	6,40	5,695
101,5	2,126	4,15	
117,0	2,514	0,34	8,362
119,0	2,440		9,266

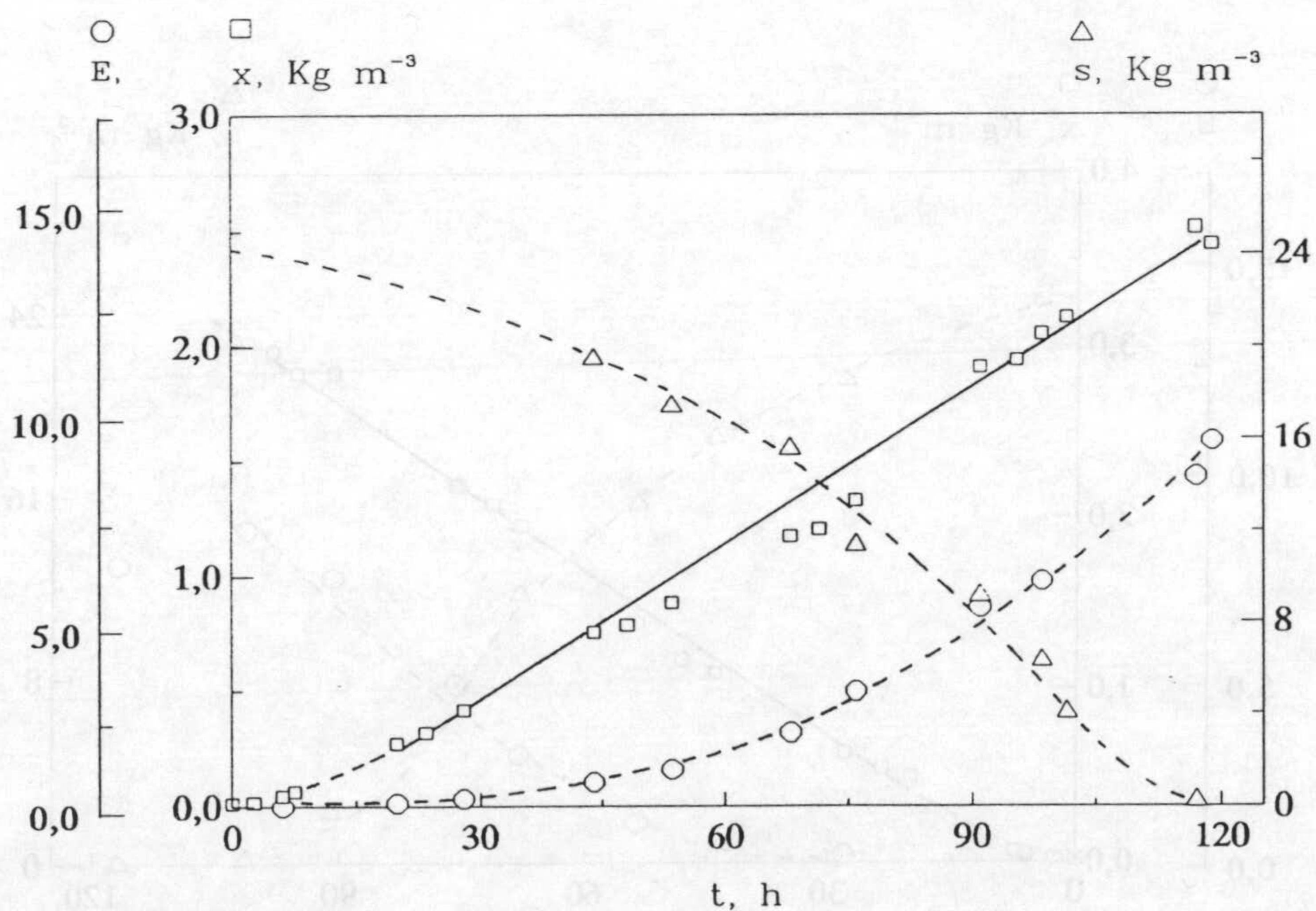


Fig. 4.18

TABLA 4.16

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: P-P3 Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 5,5

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³
0,0	0,015		
2,5	0,019		
6,0	0,047		
7,5	0,066		
20,0	0,492		
23,5	0,539		
28,0	0,628	21,13	0,220
44,0	1,100	18,63	
48,0	1,173		
53,5	1,394	15,73	1,006
68,0	1,959	11,81	2,712
71,5	2,084		
76,0	2,189	6,81	4,520
91,0	2,849	2,32	7,232
95,5	2,849		
98,5	2,975	0,64	7,854
101,5	3,027	0,28	8,475
117,0	3,635	0,14	7,571

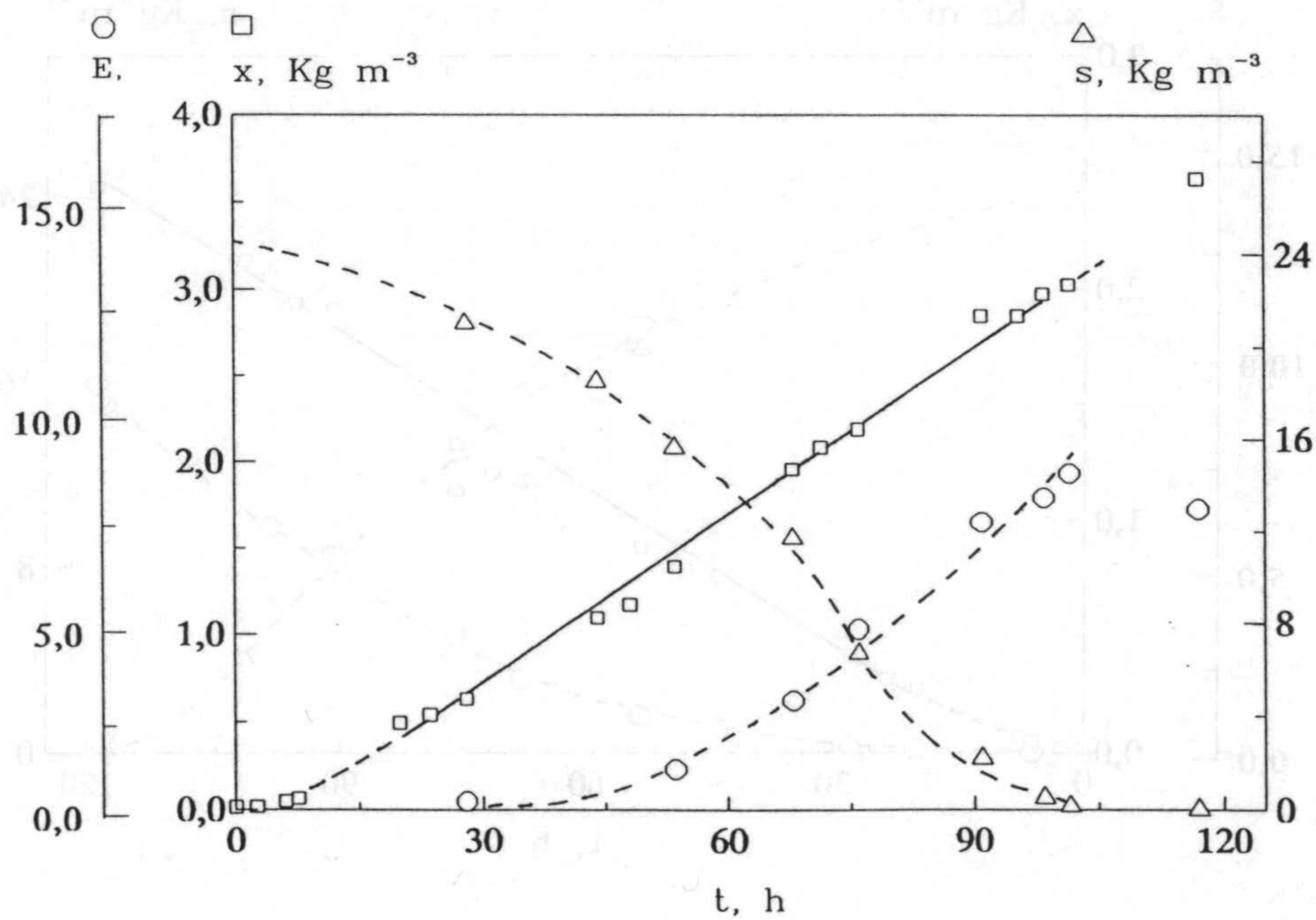


Fig. 4.19

TABLA 4.17

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: P-P4 Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 6,5

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³
0,0	0,010		
2,0	0,015		
4,5	0,021		
6,5	0,030		
8,5	0,048		
10,5	0,066		
12,0	0,087		0,008
19,0	0,217	24,19	
22,5	0,249	24,10	
30,0	0,316	23,78	0,052
45,0	0,549	22,08	0,138
50,0	0,578	21,89	0,164
55,5	0,649	21,56	0,217
67,5		18,69	0,373
76,5		17,34	0,492
95,5	1,309	15,54	0,725
103,0	1,231	15,25	0,808
117,0	1,330	13,48	0,898
126,0	1,278		0,876
143,0	1,262		0,655

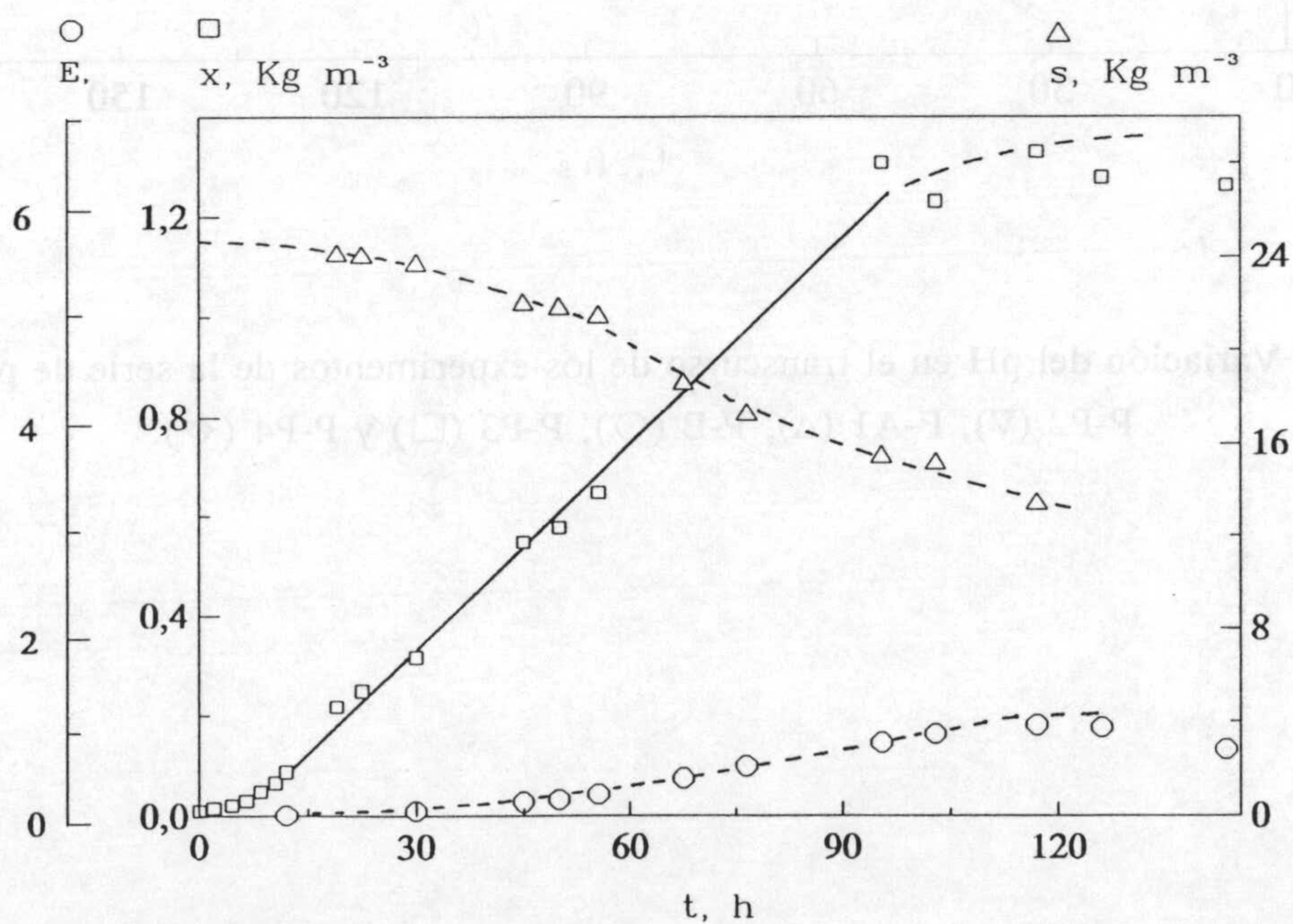


Fig. 4.20

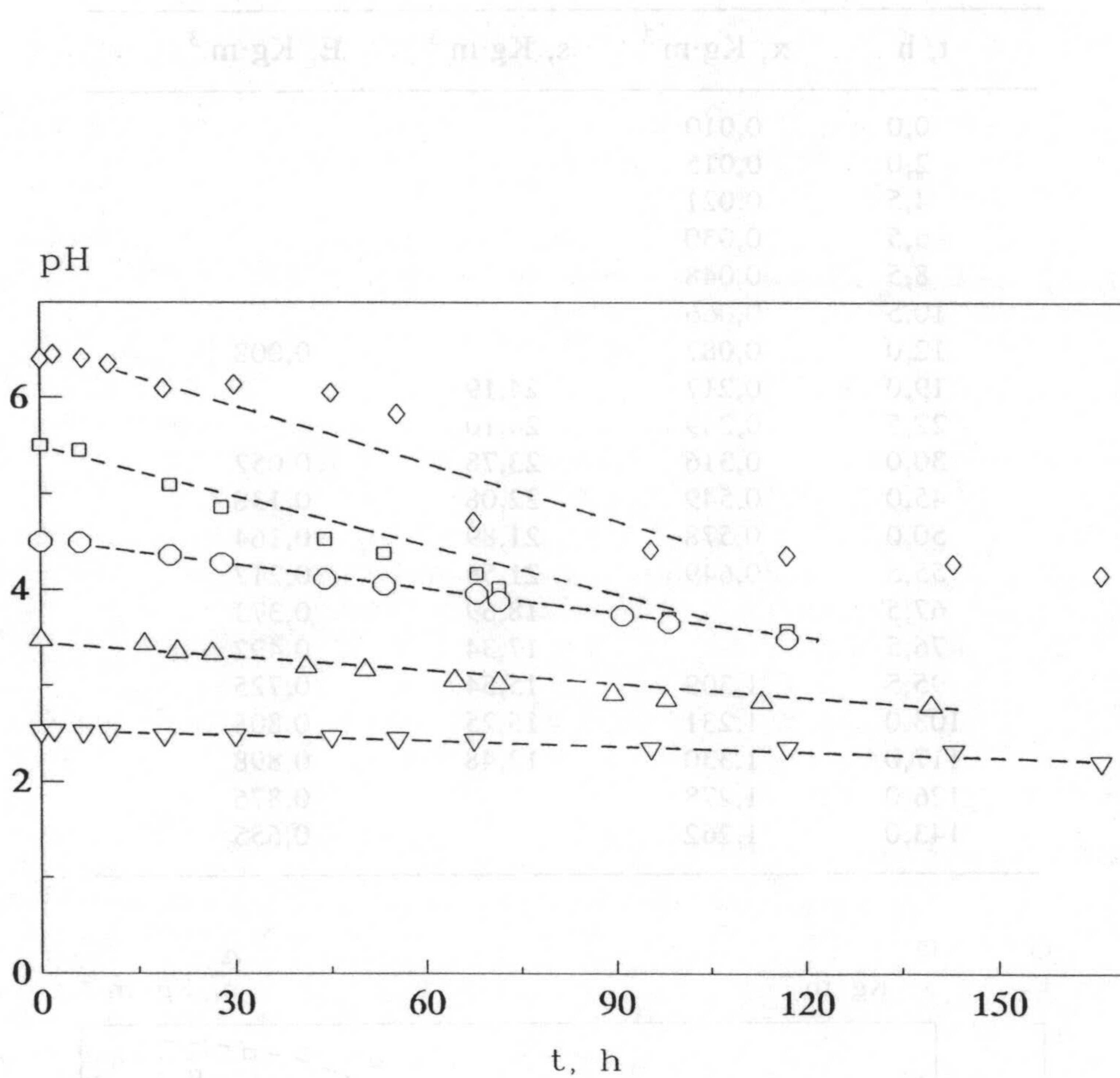


Fig. 4.21.- Variación del pH en el transcurso de los experimentos de la serie de pH :
 P-P2 (▽), P-A1 (Δ), P-B (○), P-P3 (□) y P-P4 (◇).

4.2.3 Influencia de la composición del medio de cultivo. Mezclas xilosa-glucosa

El estudio de la influencia de la composición del medio de cultivo, en cuanto a la proporción de xilosa y glucosa en el mismo, se ha llevado a cabo mediante los experimentos de la serie P-M, en la que se han mantenido constantes el pH inicial y la aireación en 4,5 y 0,0; se han empleado las siguientes concentraciones de ambos azúcares:

$s_0, \text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$:	24	20	15	10	5	1	0	0
$g_0, \text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$:	1	5	10	15	20	24	25	0

Los resultados experimentales para esta serie aparecen en las Tablas 4.18 a 4.25 y están representados en las Figuras 4.22 a 4.29.

La Figura 4.30.a recoge la variación del pH con el tiempo en el transcurso de los cultivos realizados con mayor proporción de xilosa en la mezcla de los dos azúcares estudiados. Puede apreciarse que no existe una influencia significativa de dicha proporción, puesto que los valores del pH son prácticamente coincidentes para todos los experimentos. Se observa también una leve disminución del valor de esta variable a tiempos próximos a 25 horas, a los cuales existe ya una disminución apreciable de la concentración de sustrato así como una considerable formación de etanol.

En la Figura 4.30.b se muestra la misma evolución pero para los experimentos de mayor proporción de glucosa. En ella se observa que también se alcanzan valores prácticamente independientes de la proporción inicial de azúcares, aunque la disminución del valor de pH es mayor que la detectada para los cultivos en que la concentración inicial de xilosa era más elevada.

Ambos comportamientos pueden explicarse, al menos parcialmente, por el efecto inhibitorio que ejerce la concentración de etanol en el medio de cultivo.

TABLA 4.18

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
SUSTRATO RESIDUAL

EXPTO: P-M1 $\text{pH}_i = 4,5$ $Q = 0,000 \text{ v/v/min}$

$s_0 = 24 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $g_0 = 1 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	g, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,011			
2,0	0,014			
4,0	0,027	24,78	1,00	
6,0	0,050	24,41		0,005
8,5	0,096			0,069
11,5	0,251	23,72		0,319
14,5	0,362	22,79	0,18	0,429
23,0	0,607	22,41	0,08	0,576
25,5	0,717	21,93		0,655
29,0	0,842	21,47		0,893
34,5	0,953	19,74		0,972
50,0	1,466	16,49		1,865
57,0	1,529	14,28		2,305
74,0	2,022	8,50		3,729
97,0	2,409			6,102
120,0		0,24		5,989
128,0	2,702	0,21		5,537
144,0	2,723	0,18		5,650

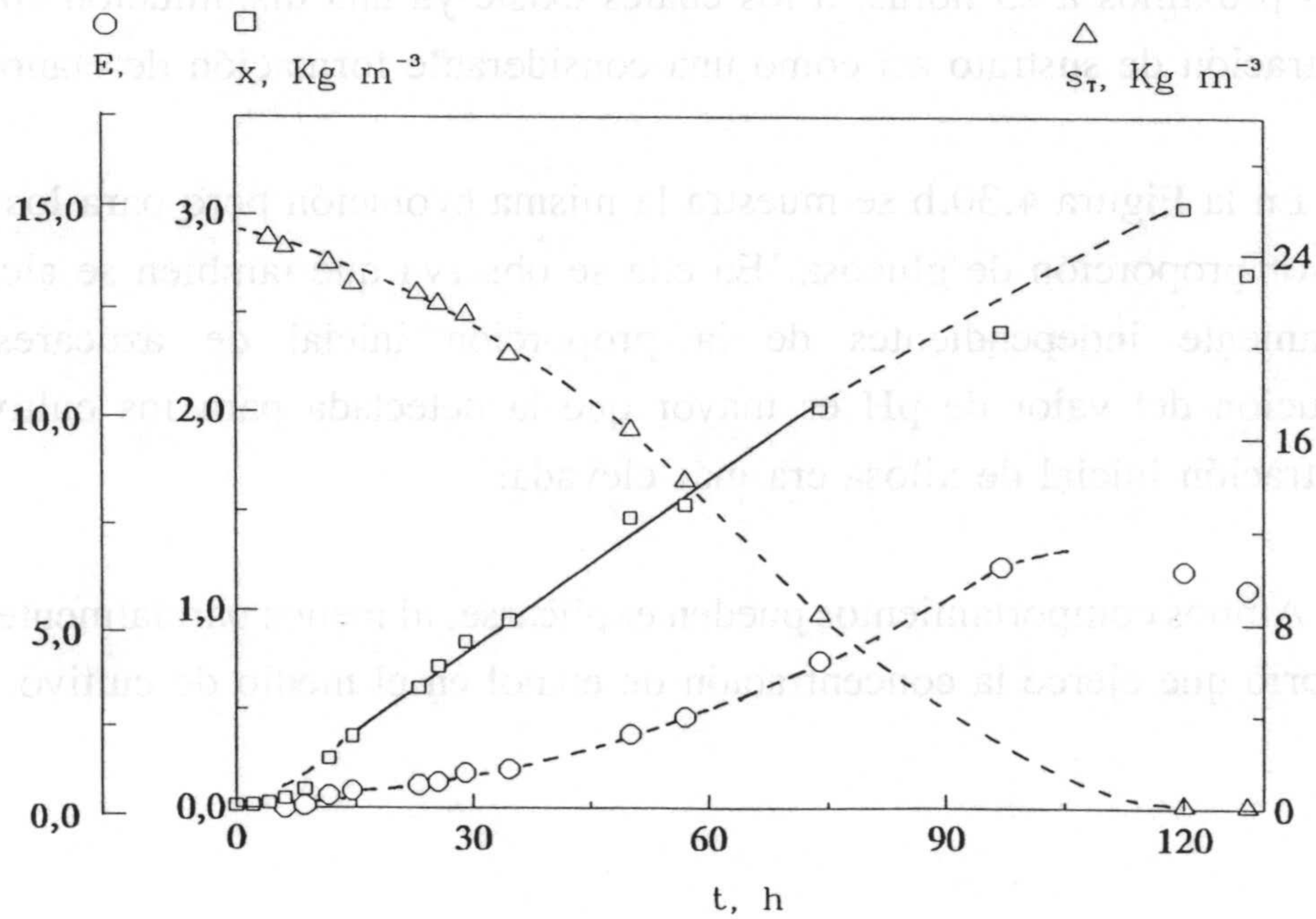


Fig. 4.22

TABLA 4.19

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
SISTRATO RESIDUAL

EXPTO: P-M2 $pH_i = 4,5$ $Q = 0,000$ v/v/min

$$s_0 = 20 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3} \quad g_0 = 5 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	g, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,011			
2,0	0,014			
4,0	0,027		4,61	0,003
6,0	0,050			
8,5	0,103	23,57	2,28	0,093
11,5	0,281	22,68		0,588
14,5	0,628		2,08	1,373
23,0	0,864	18,87		1,808
26,5	0,875	17,83	0,06	1,898
30,0	0,976	17,96		1,921
34,5	1,084	17,14		2,260
50,0	1,770	12,77		3,808
57,0	1,833	10,08		4,492
74,0	2,461	4,02		6,667
97,0	2,776	0,32		8,193
120,0	2,891	0,17		6,328

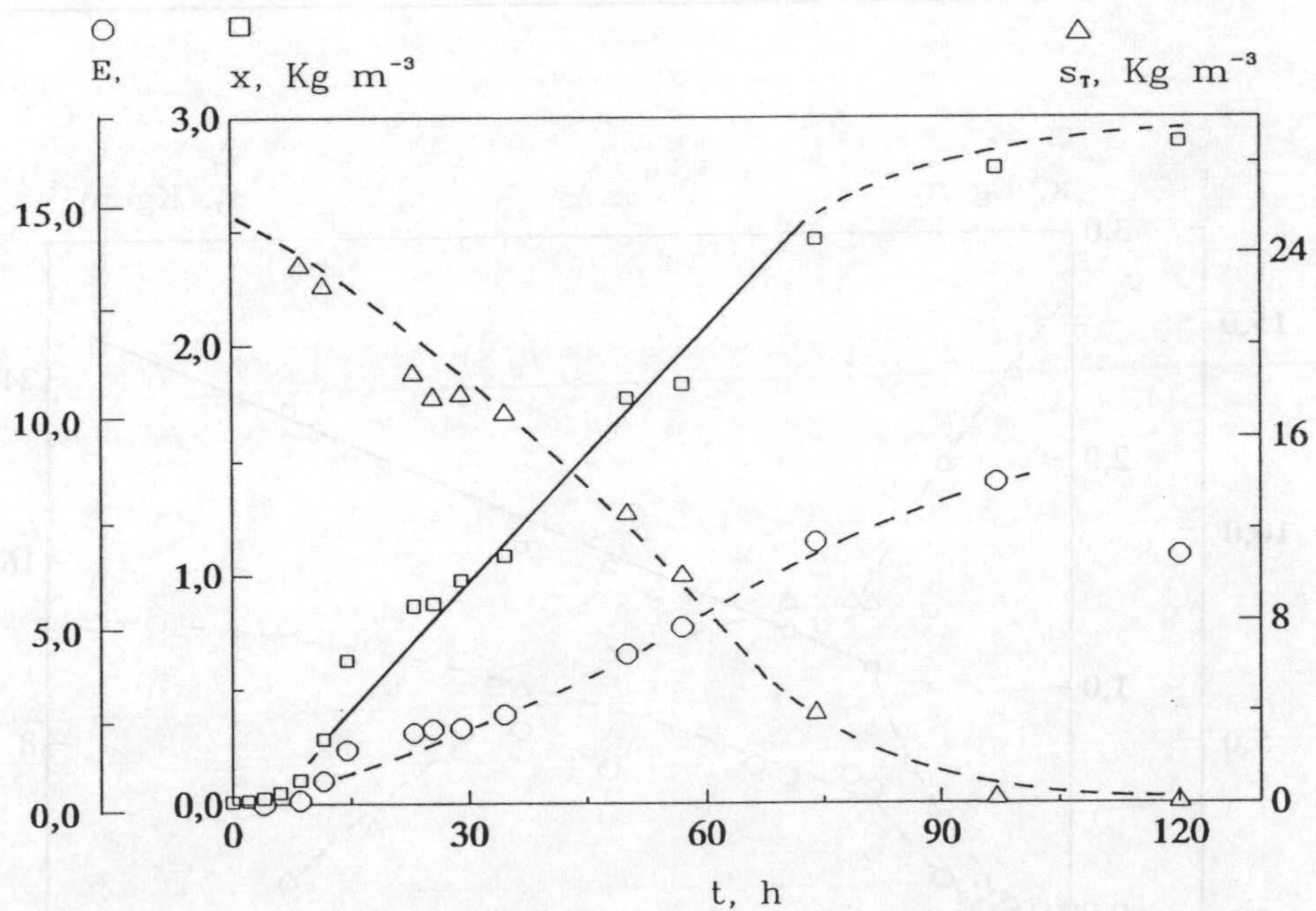


Fig. 4.23

TABLA 4.20

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
SISTRATO RESIDUAL

EXPTO: P-M3 $pH_i = 4,5$ $Q = 0,000$ v/v/min

$s_0 = 15 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $g_0 = 10 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	g, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,013			
1,5	0,015			
3,0	0,020			
4,5	0,030			
6,0	0,050	23,97	9,21	0,011
7,5	0,077	23,20	8,50	0,055
9,0	0,146			0,158
13,0	0,432	19,95	6,24	0,942
20,3	1,098	13,88	0,05	3,254
22,5		13,99		3,639
25,5	1,278	13,37		
29,0	1,257	13,98		3,616
32,5				3,899
47,5	1,550	11,72		3,842
56,5	1,644	10,20		4,859
71,5	2,179	4,17		7,096
80,5	2,252	1,92		7,594
94,0	2,378			7,684
100,0	2,535			7,729

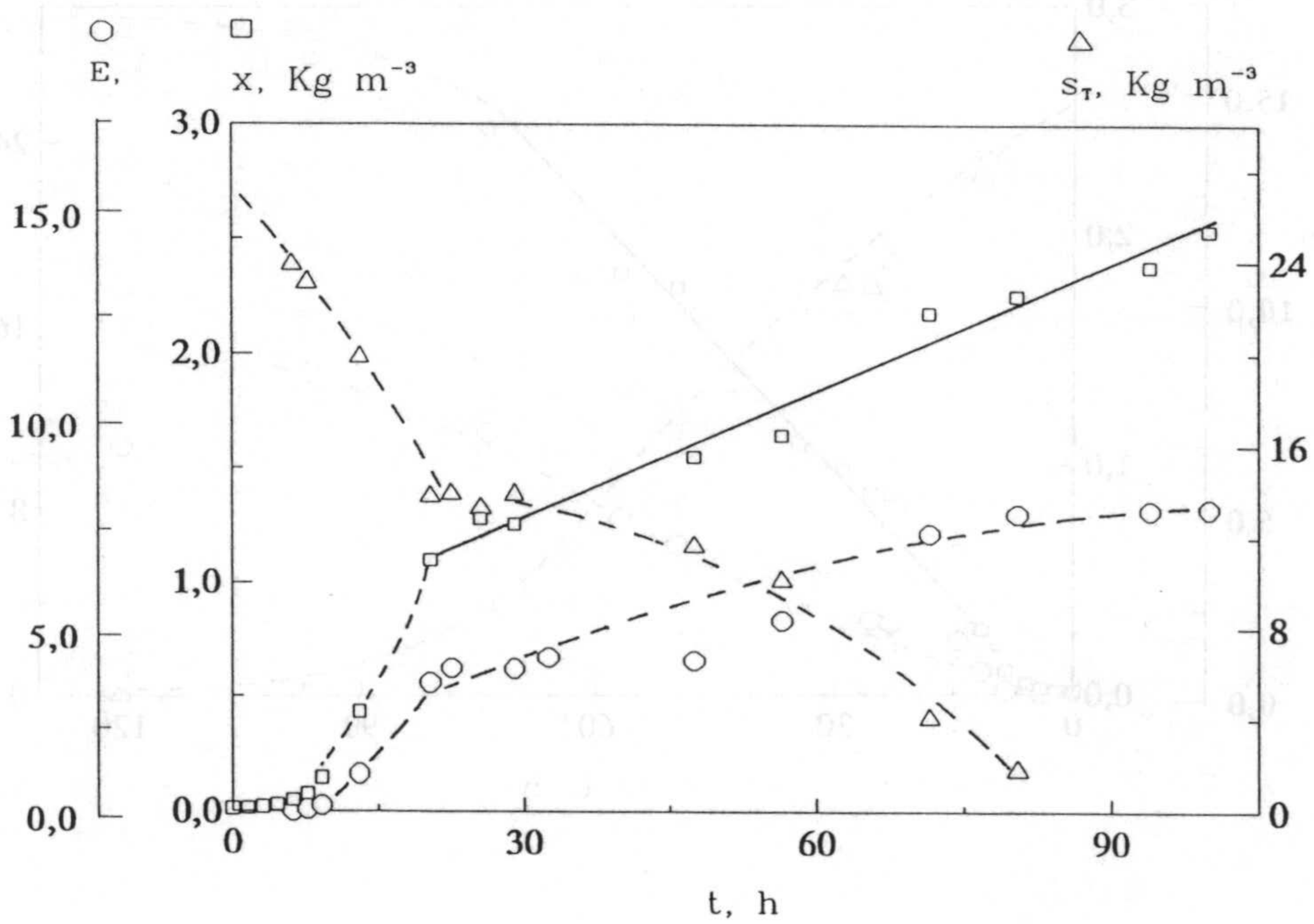


Fig. 4.24

TABLA 4.21

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
SUSTRATO RESIDUAL

EXPTO: P-M4 $pH_i = 4,5$ $Q = 0,000$ v/v/min

$$s_0 = 10 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3} \quad g_0 = 15 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	g, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,012			
2,0	0,017			
4,0	0,031			0,006
6,0	0,058		12,45	0,028
8,0	0,109		11,10	0,146
12,0	0,411		9,12	1,019
20,5		8,93	0,07	4,813
23,0	1,770	8,50	0,04	
26,0	1,802	8,94		5,492
30,0	1,875	8,89		5,243
33,0	1,854	9,04		
46,0	1,938	7,46		
51,0	1,980	7,87		
57,0	2,053	7,45		5,820
70,0		4,85		5,763
81,0	2,378	1,72		7,402
94,5	2,535	0,08		
102,0	2,545			6,192

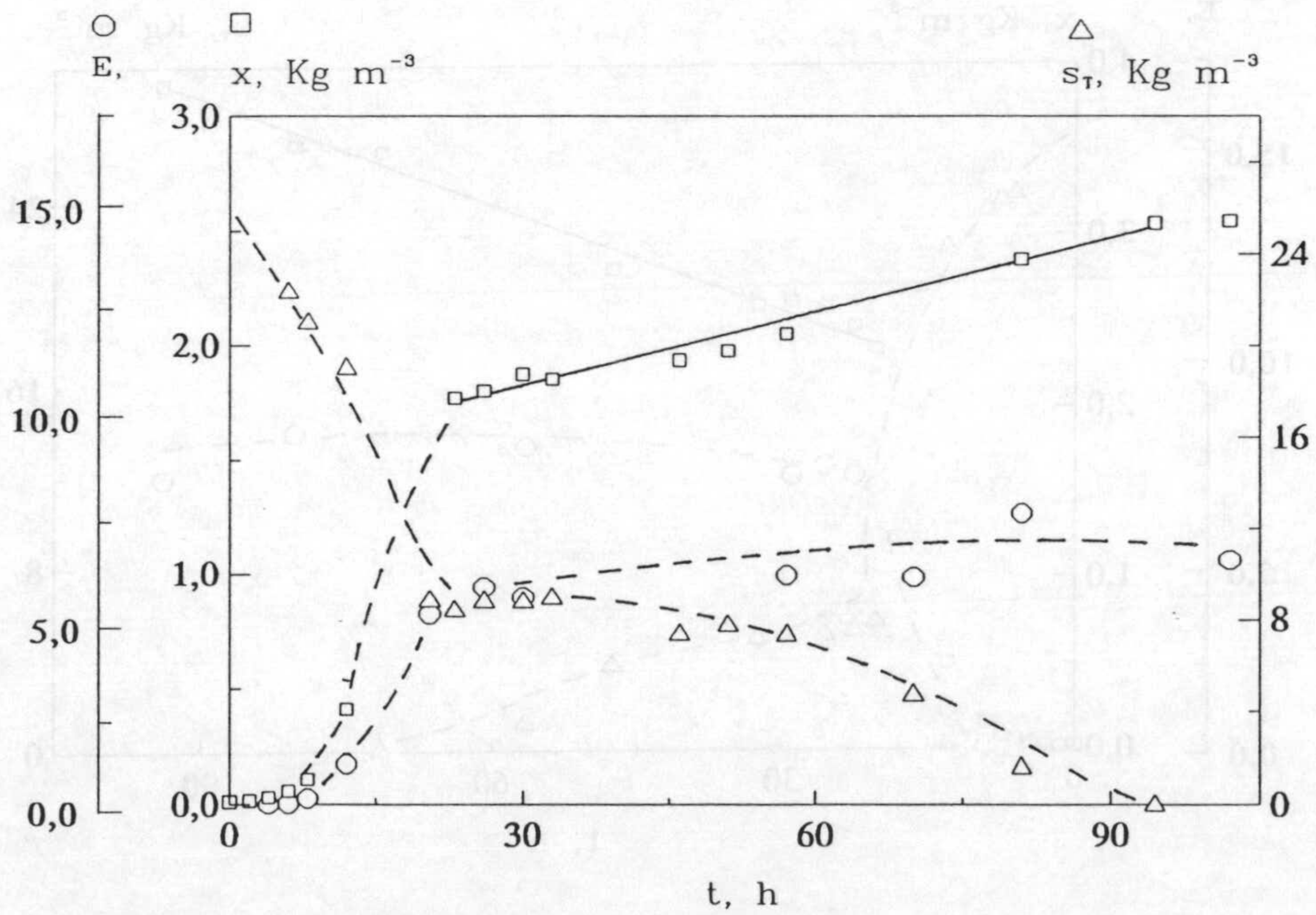


Fig. 4.25

TABLA 4.22

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
SISTRATO RESIDUAL

EXPTO: P-M5 $\text{pH}_i = 4,5$ $Q = 0,000 \text{ v/v/min}$

$$s_0 = 5 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3} \quad g_0 = 20 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	g, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,013			
1,5	0,015			
3,0	0,021			
4,5	0,030		19,59	
6,0	0,050	24,41	18,94	0,004
7,5	0,080	24,13	18,51	0,031
9,0	0,151	23,69	17,74	0,093
13,0	0,505	22,02	15,05	1,023
20,3	2,341	5,71	0,09	6,735
22,5	2,472	5,32		7,006
25,5	2,577			7,289
29,0	2,618	4,81		7,006
32,5	2,597	4,97		
47,5	2,807	3,84		
56,5	2,996	1,32		7,797
71,5	3,498	0,16		
80,5	3,540			8,136
94,0	3,896			6,950

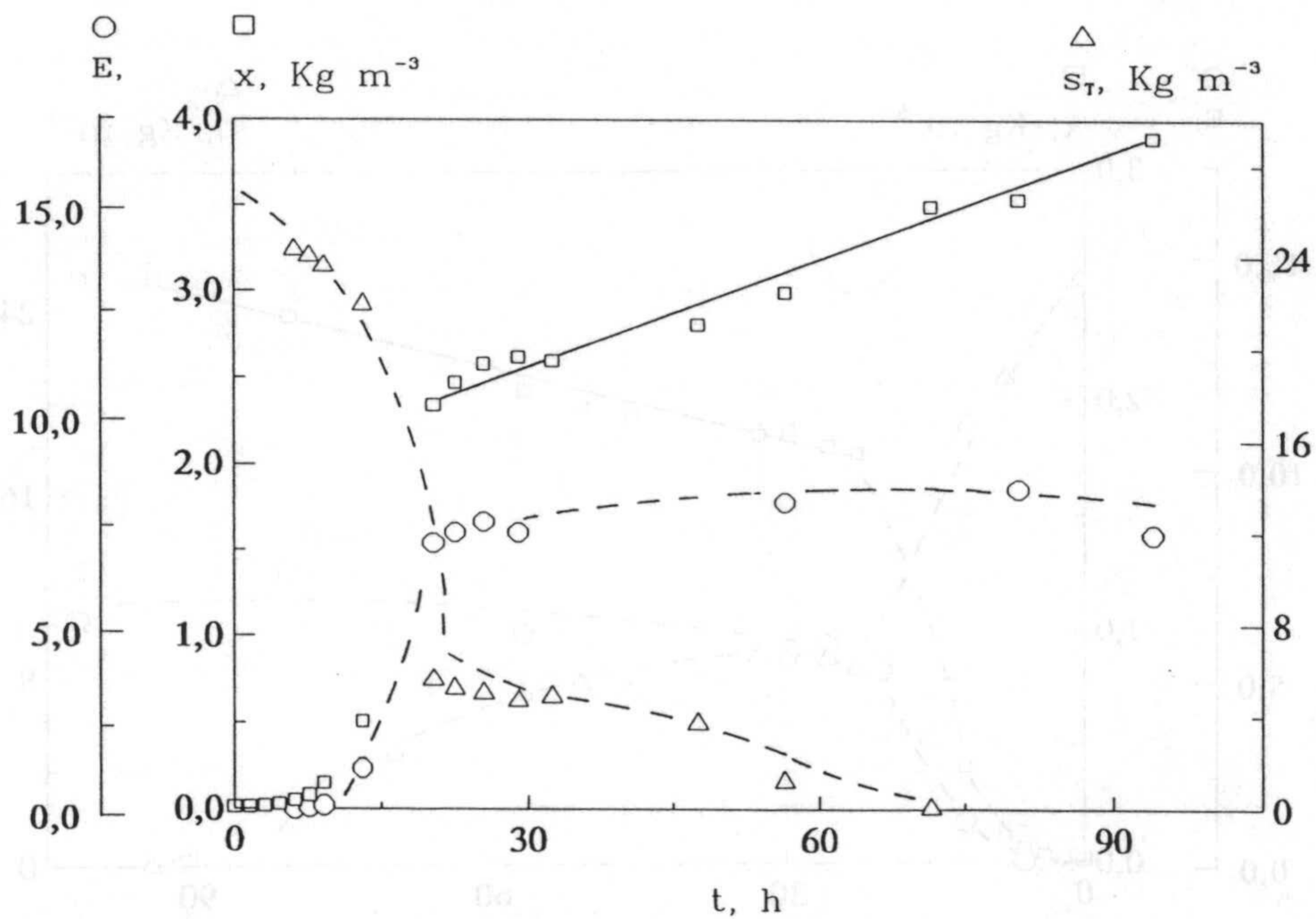


Fig. 4.26

TABLA 4.23

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
SUSTRATO RESIDUAL

EXPTO: P-M6 $pH_i = 4,5$ $Q = 0,000$ v/v/min

$$s_0 = 1 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3} \quad g_0 = 24 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$$

t, h	x, Kg·m ⁻³	s _T , Kg·m ⁻³	g, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³
0,0	0,013			
1,5	0,015			
3,0	0,020	24,78	23,02	
4,5	0,030			
6,0	0,051	24,36	22,80	0,004
7,5	0,078	23,72		0,028
9,0	0,151	22,82	21,29	0,115
13,0	0,476	20,62	18,50	1,000
20,3	2,236	5,49	4,65	7,232
22,5			0,11	8,984
25,5		1,72		9,017
29,0	2,723	0,96	0,04	9,153
32,5	2,723			8,588
47,5	2,807			8,023
56,5	2,744			7,458
71,5	2,745			7,119

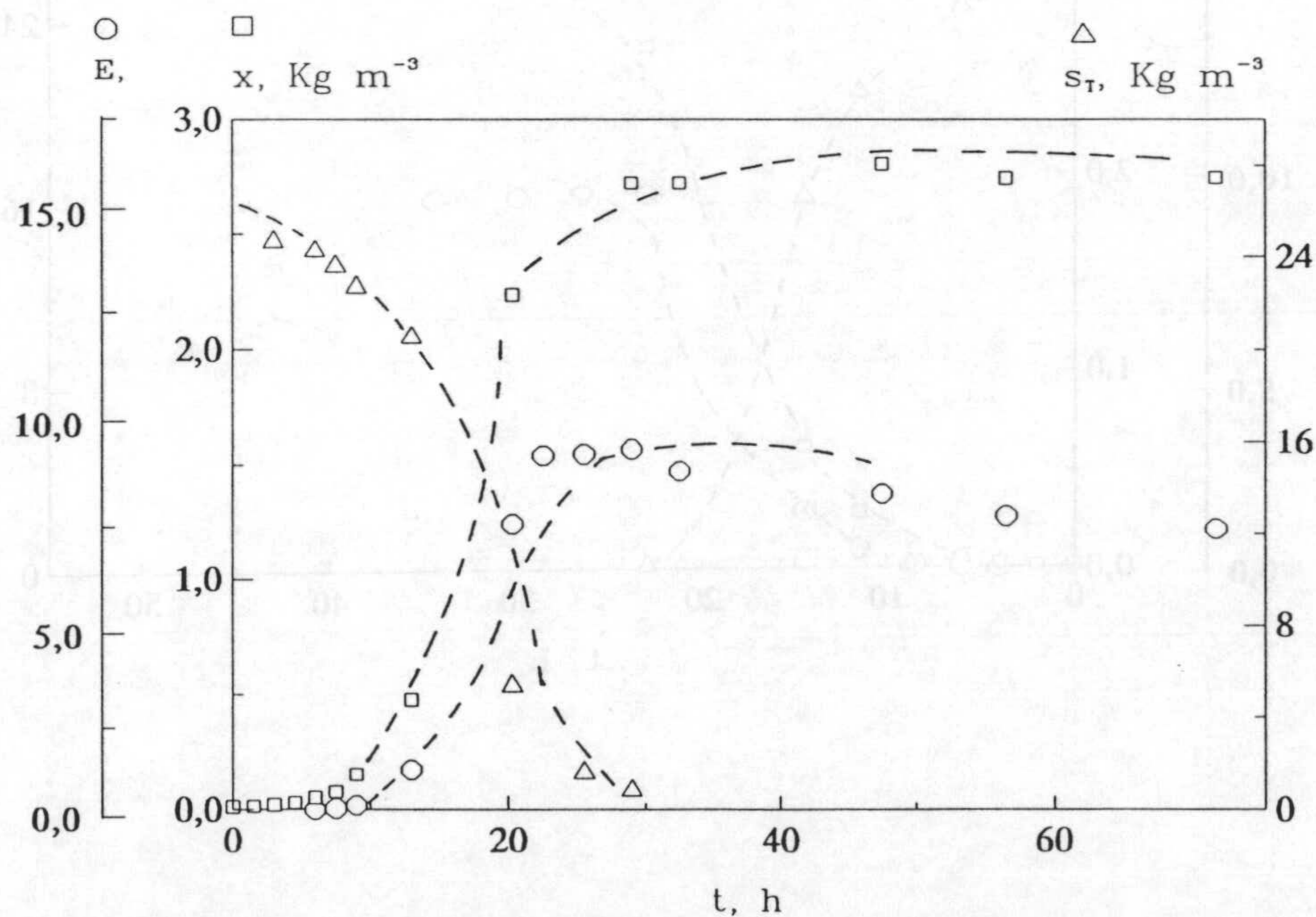


Fig. 4.27

TABLA 4.24

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
SUSTRATO RESIDUAL

EXPTO: P-M7 $pH_i = 4,5$ $Q = 0,000$ v/v/min

$s_0 = 0 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $g_0 = 25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,011		
2,0	0,014		
4,0	0,027		0,003
6,0	0,049	24,55	0,009
8,5	0,099		0,103
11,5	0,289	20,87	0,511
14,5	0,622	16,33	1,441
23,0	2,655	0,27	9,549
26,5	2,975		9,549
30,0	3,100		9,492
34,5	2,912		9,436
50,0	3,142		

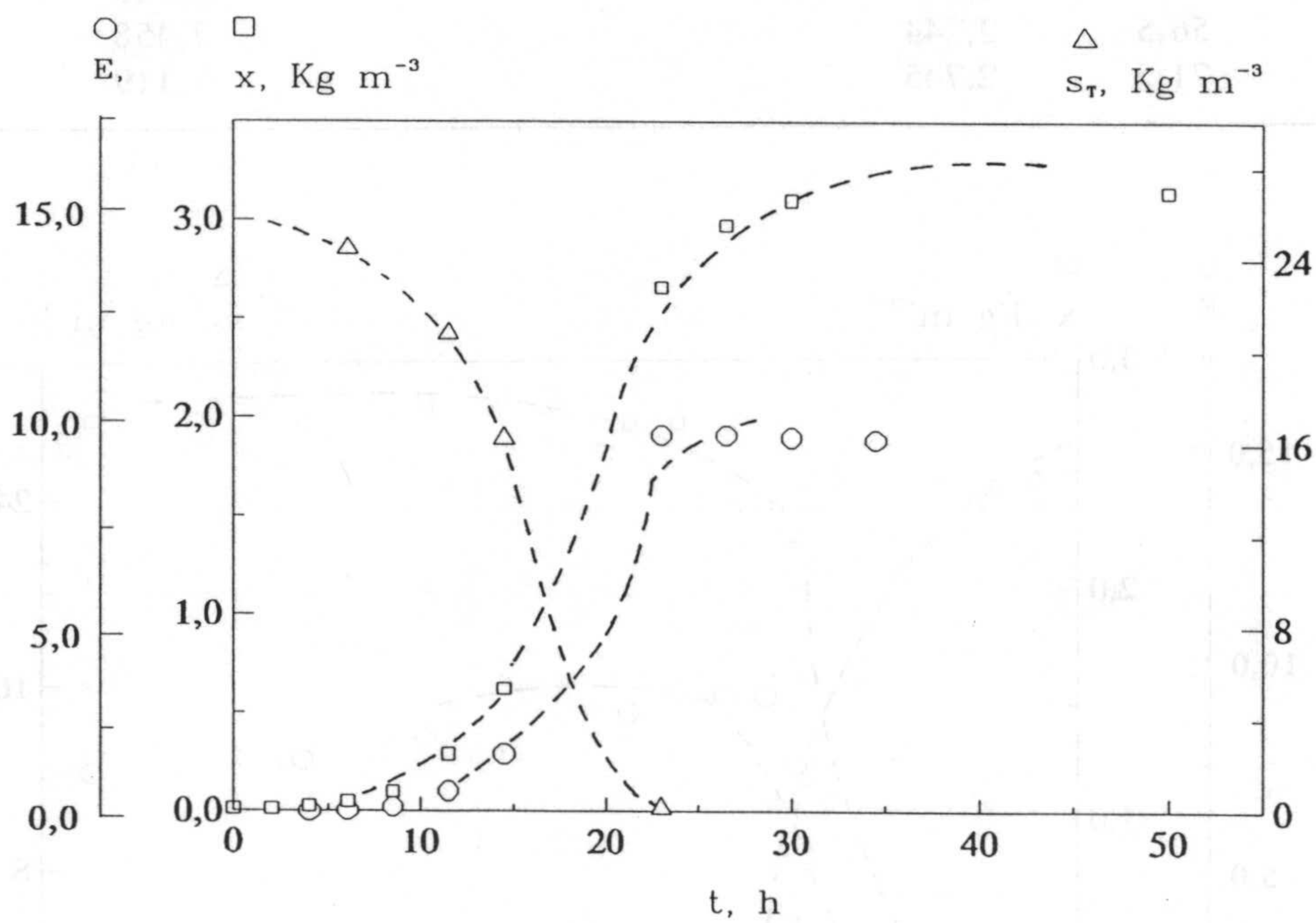


Fig. 4.28

TABLA 4.25

PRODUCCIÓN DE BIOMASA

EXPTO: P-M8 $\text{pH}_i = 4,5$ $Q = 0,000 \text{ v/v/min}$

$s_0 = 0 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $g_0 = 0 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,010
1,0	0,011
2,0	0,014
3,5	0,021
5,5	0,035
7,5	0,044
9,5	0,055
11,5	0,056
13,0	0,059
16,0	0,059
27,0	0,064
32,0	0,063
36,0	0,063
51,5	0,064

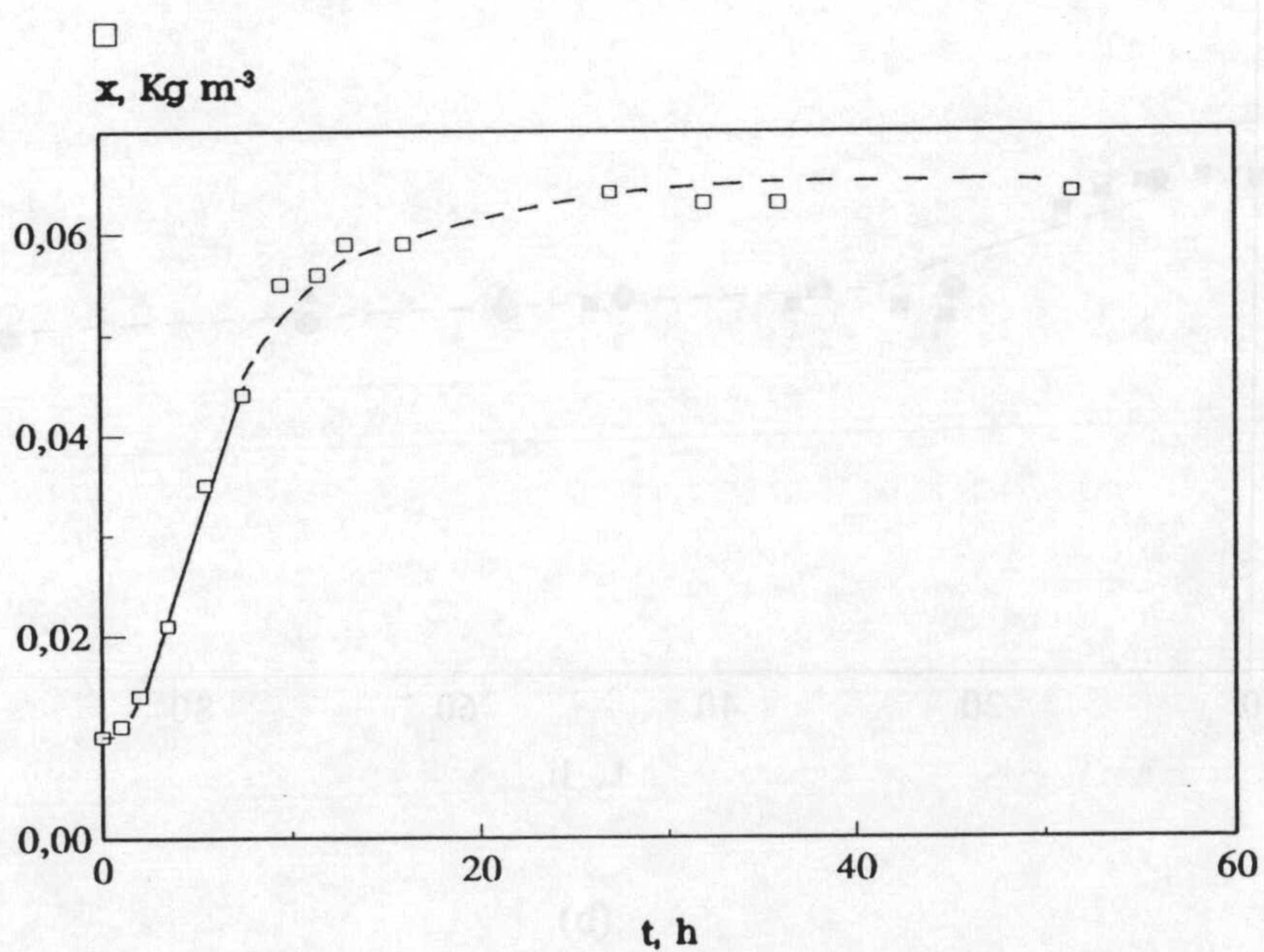


Fig. 4.29

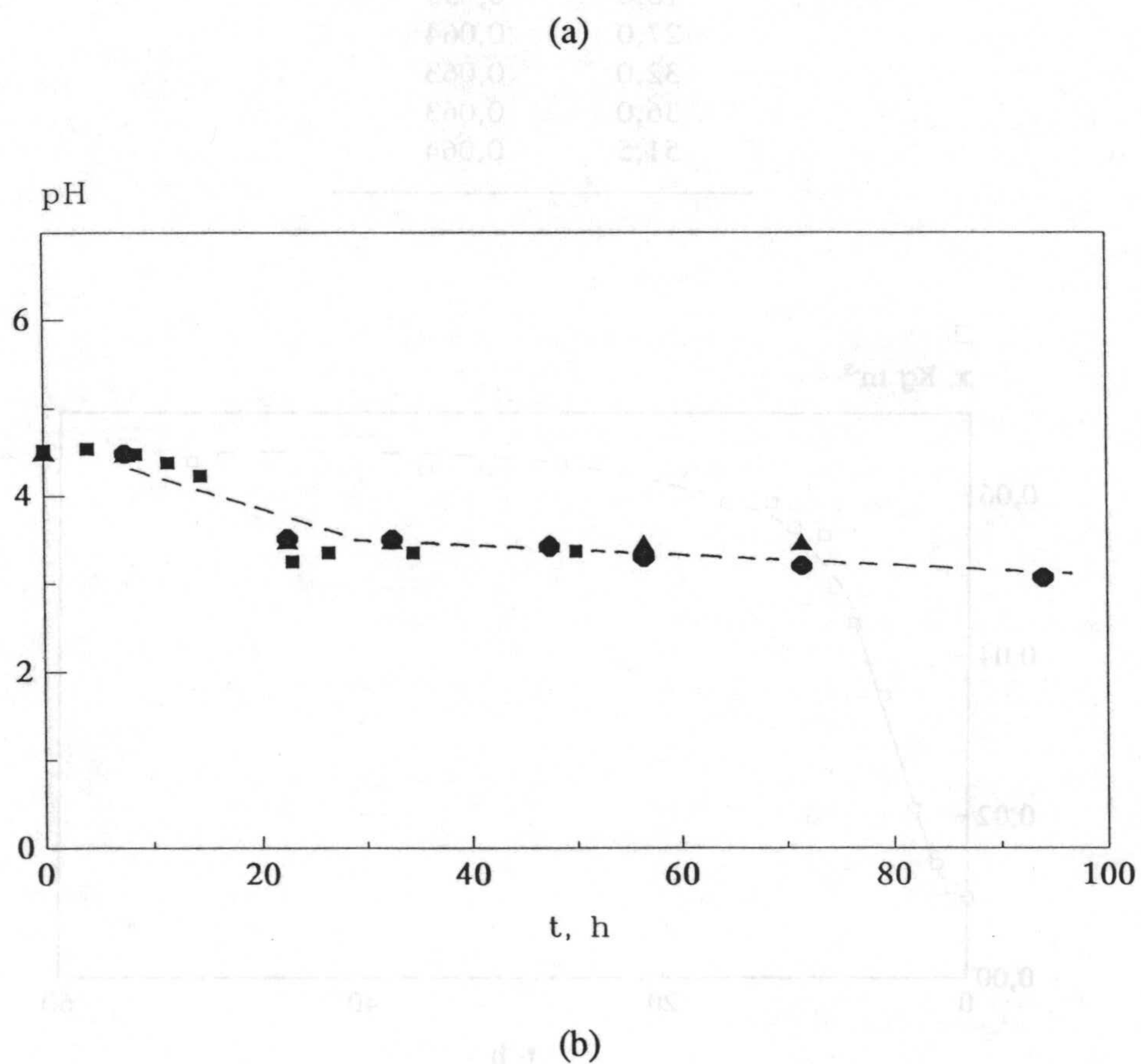
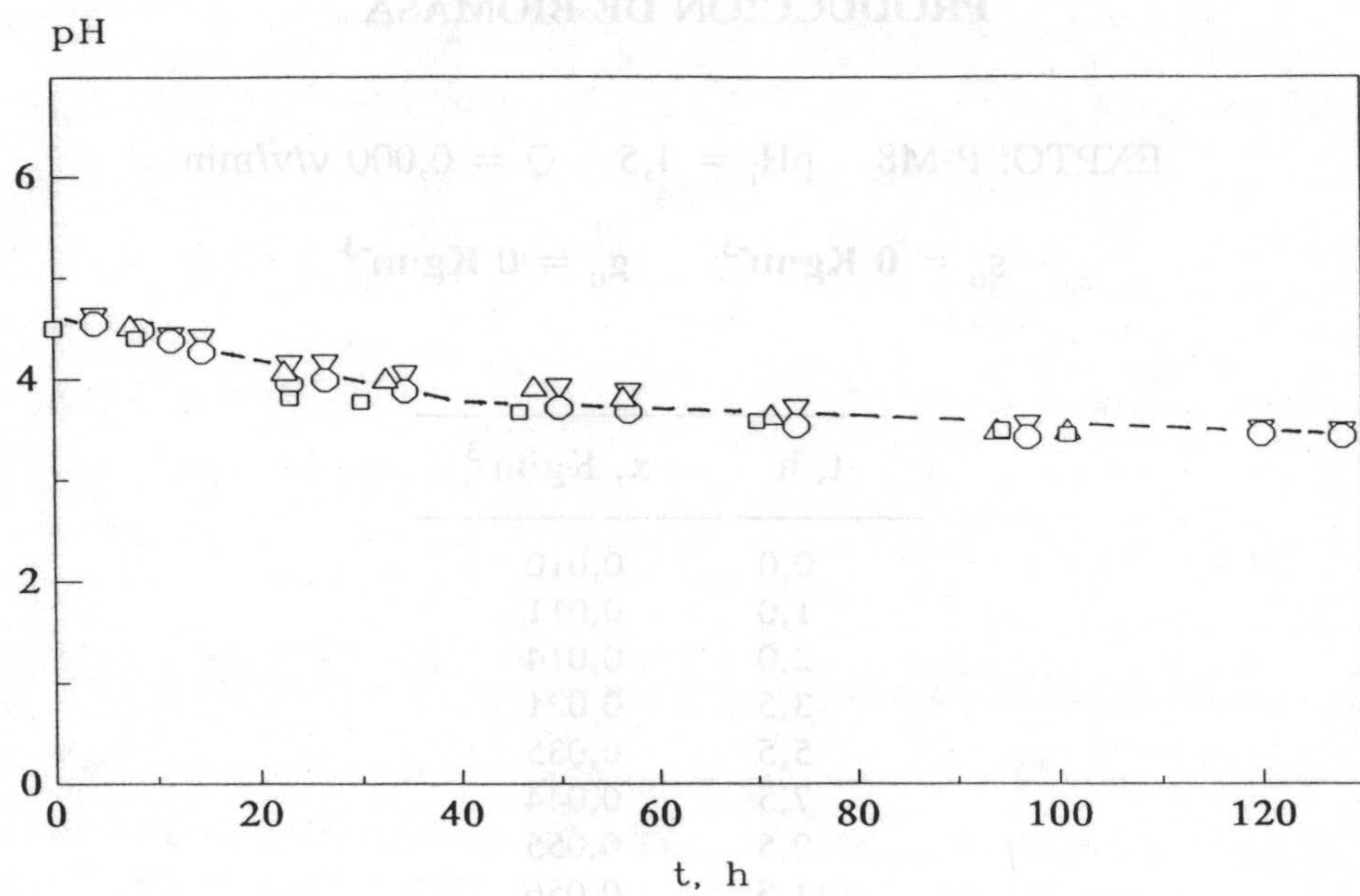


Fig. 4.30. Variación del pH en el transcurso de los experimentos:
 (a) P-M1 (∇), P-M2 (\circ), P-M3 (Δ) y P-M4 (\square)
 (b) P-M5 (\bullet), P-M6 (\blacktriangle) y P-M7 (\blacksquare).

4.3 CANDIDA SHEHATAE

Para el estudio de la fermentación discontinua de disoluciones de D-xilosa y D-glucosa con *C. shehatae* se han realizado tres series experimentales en las que se ha estudiado respectivamente la influencia del nivel de aireación (serie C-A), del pH inicial (serie C-P) y de la composición del medio de cultivo, en cuanto a la proporción de los dos sustratos empleados (serie C-M).

Para todos los experimentos, la temperatura de operación ha sido 30°C y la concentración de sustrato total inicial, es decir, xilosa o xilosa más glucosa en la serie de mezclas, ha sido de 25 Kg·m⁻³, a excepción del experimento C-M5, que se ha llevado a cabo en ausencia de sustrato.

Los resultados experimentales obtenidos se reflejan en las Tablas 4.26 a 4.38, así como en las Figuras 4.31 a 4.46, en las cuales se recoge la variación temporal de la producción de biomasa, etanol y xilitol y el sustrato residual. También se muestra la evolución temporal del pH para todos los cultivos realizados.

4.3.1 Influencia del nivel de aireación

En las Tablas 4.26 a 4.28 aparecen los resultados experimentales correspondientes a la serie C-A, en la que se ha modificado el nivel de aireación suministrado al cultivo, mientras que se ha mantenido constante, en 4,5, el pH inicial. Las correspondientes representaciones (Figuras 4.31 a 4.33) muestran la evolución temporal de las concentraciones de xilosa, biomasa, etanol y xilitol durante el transcurso de los cultivos.

Los valores del nivel de aireación ensayados para esta serie han sido 0,000, 0,075 y 0,300 v/v/min.

Por otra parte, en la Figura 4.34 aparece la representación del pH del medio de cultivo frente al tiempo. Se puede constatar que no existe influencia significativa de la

variable en estudio, aunque, dentro de las pequeñas diferencias observadas, la ligera disminución del pH en todos los cultivos aumenta con el nivel de aireación. Igualmente, se aprecia para todos ellos una bajada más importante en el valor del pH para tiempos de cultivo próximos a 25-30 horas, que coinciden con una apreciable disminución de la concentración de sustrato y con un aumento en la formación de bioproductos, especialmente etanol.

4.3.1 Influencia del nivel de aireación

En las Tablas 4.26 a 4.28 aparecen los resultados experimentales correspondientes a la serie C-A, en la que se ha modificado el nivel de aireación suministrado al cultivo, mientras que se ha mantenido constante, en 4,7, el pH inicial. Las correspondientes representaciones (Figuras 4.31 a 4.33) muestran la evolución temporal de las concentraciones de *x*-xilosa, dióxido de carbono y etanol durante el transcurso de los cultivos.

Los valores del nivel de aireación estudiados para esta serie han sido 0,000, 0,075 y 0,500 v/v/min.

Por otra parte, en la Figura 4.34 aparece la evolución temporal del pH del medio de cultivo frente al tiempo. Se puede observar que no existe influencia significativa de la

TABLA 4.26

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: C-B

pH_i = 4,5

Q = 0,000 v/v/min

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,005			
1,5	0,008			
3,5	0,011			
5,0	0,016			
6,5	0,024		0,007	
9,0	0,067			
11,0	0,097	24,22	0,059	
14,5	0,140	23,83	0,379	
20,0	0,300	21,55	1,158	0,14
24,0	0,453	17,10	2,158	
28,0	0,586	15,03	3,441	
33,0	0,685	10,45	5,198	1,14
46,5	0,924	0,65	9,775	
56,0	1,063	0,21	10,227	1,87
68,5		0,19	9,549	

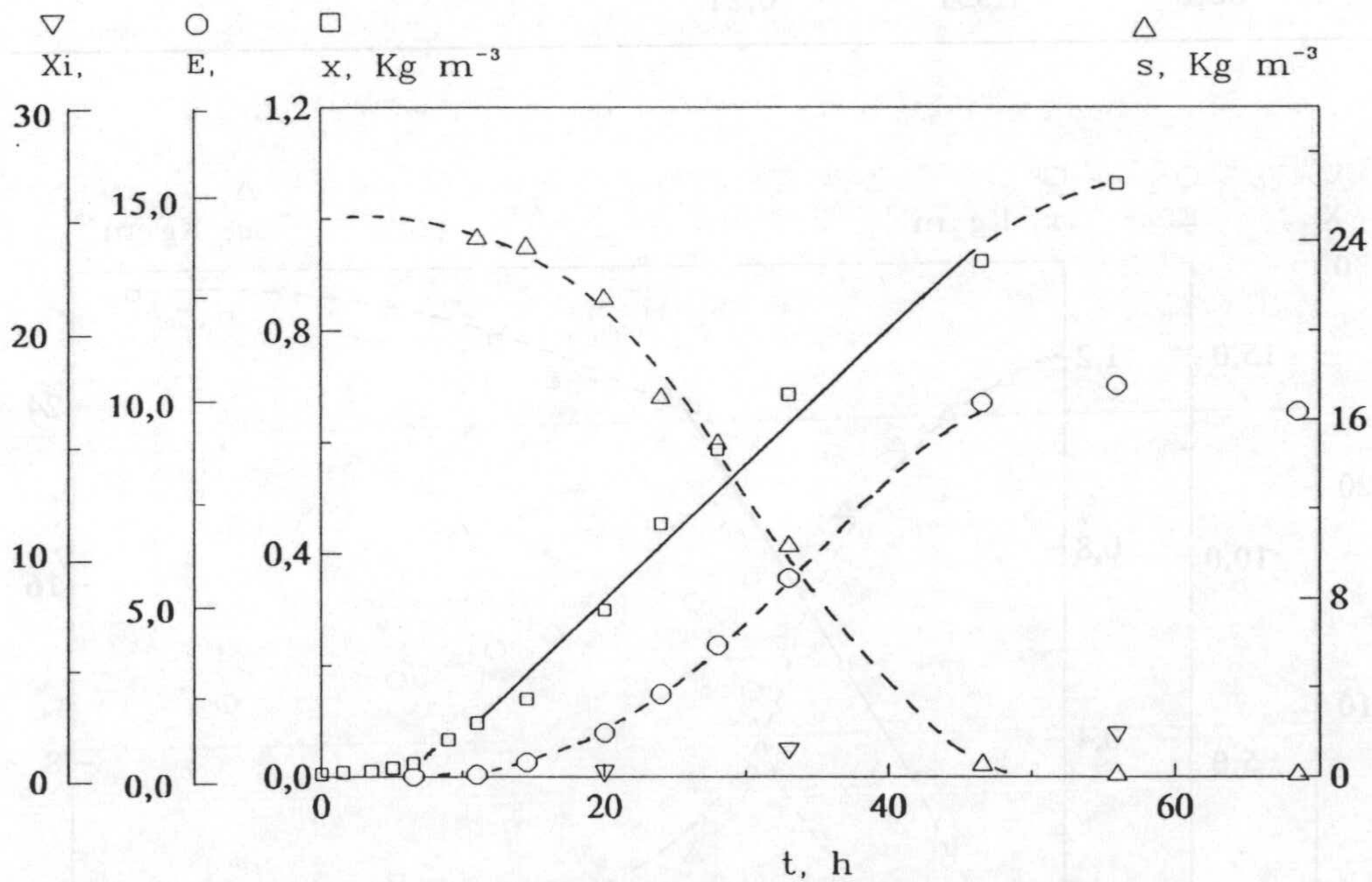


Fig. 4.31

TABLA 4.27

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: C-A1

pH_i = 4,5

Q = 0,075 v/v/min

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,010			
3,0	0,017			
4,0	0,022			
5,0	0,028	24,80		
6,0	0,034			
7,0	0,049			
8,0	0,059			
10,0	0,147	23,28	0,034	
12,5	0,323			
14,5		21,93	0,723	
19,0	0,558	19,00	1,062	0,61
27,0	0,743	7,34	6,351	1,28
32,0	1,102	3,59	8,701	1,52
44,0	1,157	2,05	7,877	
49,0	1,247	0,68	7,503	
57,5		0,60	6,735	2,47
72,0	1,301	0,27	6,192	
80,0	1,351	0,21		

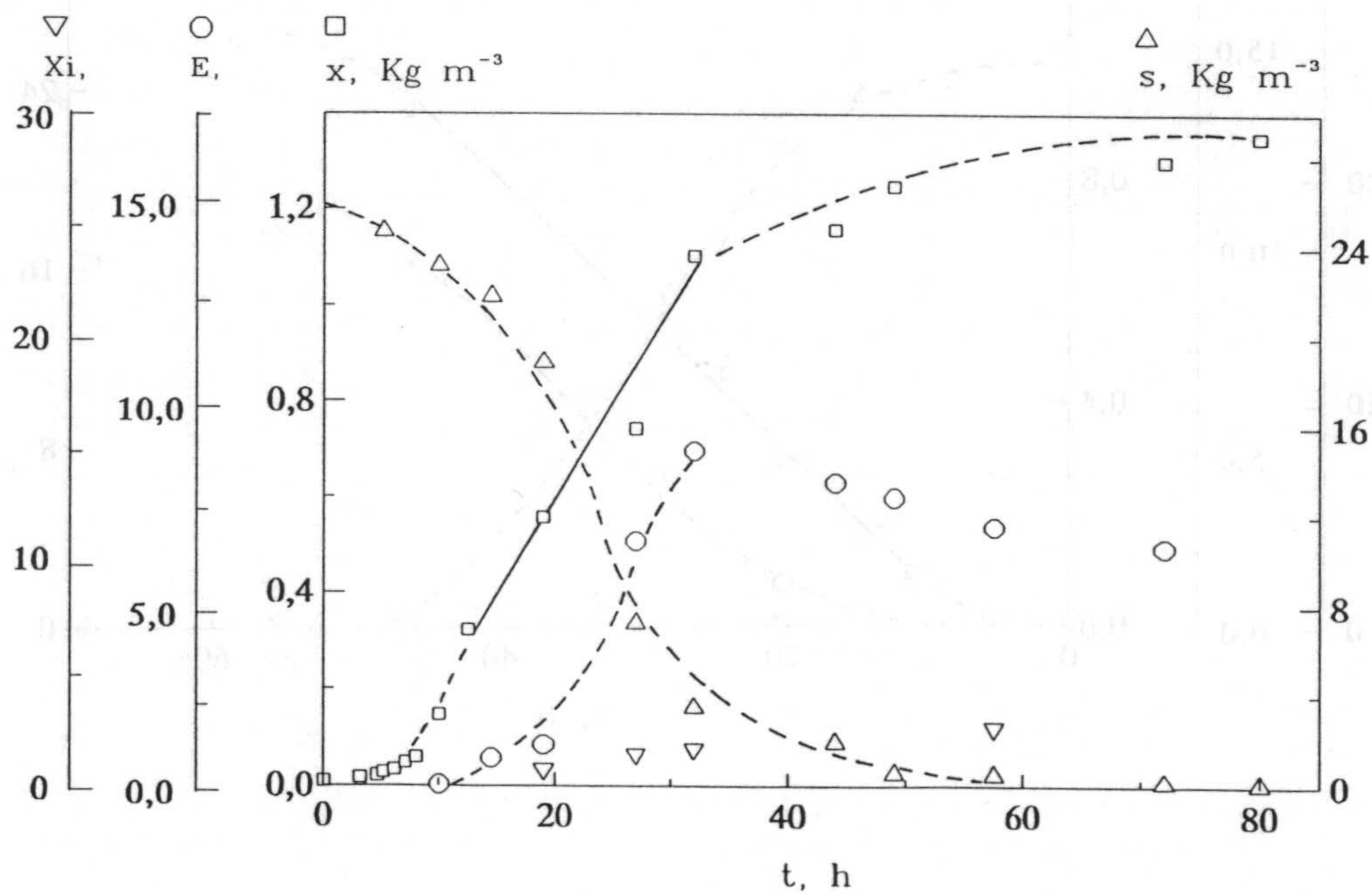


Fig. 4.32

TABLA 4.28

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: C-A2

pH_i = 4,5

Q = 0,300 v/v/min

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,012			
2,0	0,017			
3,0	0,020			
4,0	0,024			
5,0	0,030	24,63		
7,0	0,042			
8,0	0,061			
10,0	0,127	24,24	0,041	
12,5	0,199			
14,5	0,175	23,47	0,497	0,65
19,0	0,361	21,27	1,507	
27,0		15,55	2,599	
32,0		14,94	3,028	1,68
44,0		11,06	2,288	
49,0	0,424	9,78	1,266	
57,5		7,28		
72,0	0,407	4,68		
80,0	0,434	3,66		
95,0	0,447	2,52	0,499	2,59

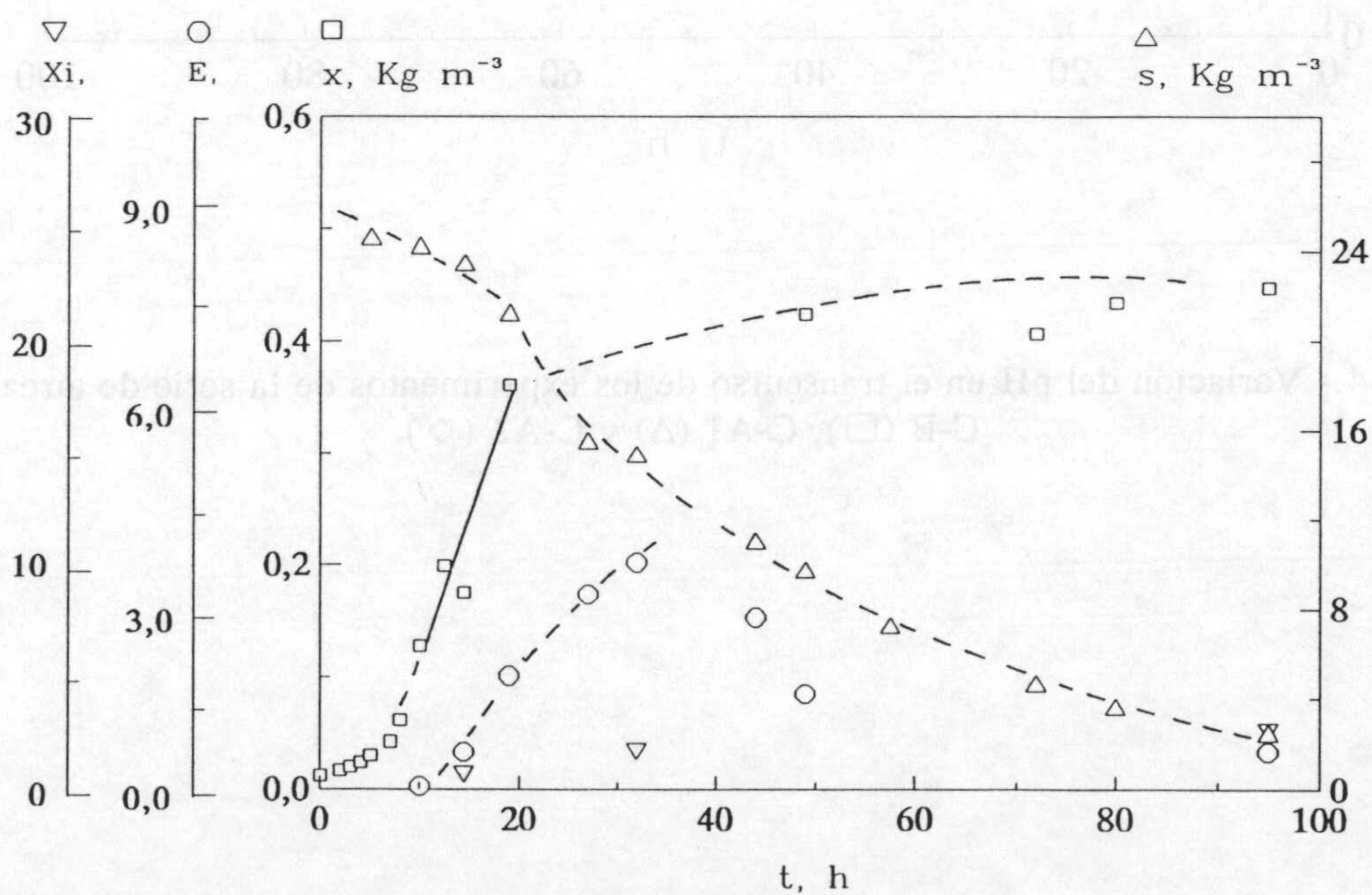


Fig. 4.33

TABLA 4.32
 PRODUCCION DE BIOMASA, TITULO Y XILITOL
 RESIDUAL

EXPTO: C-A2 $\mu = 0.42$

$Q = 0.350 \text{ v/v/min}$

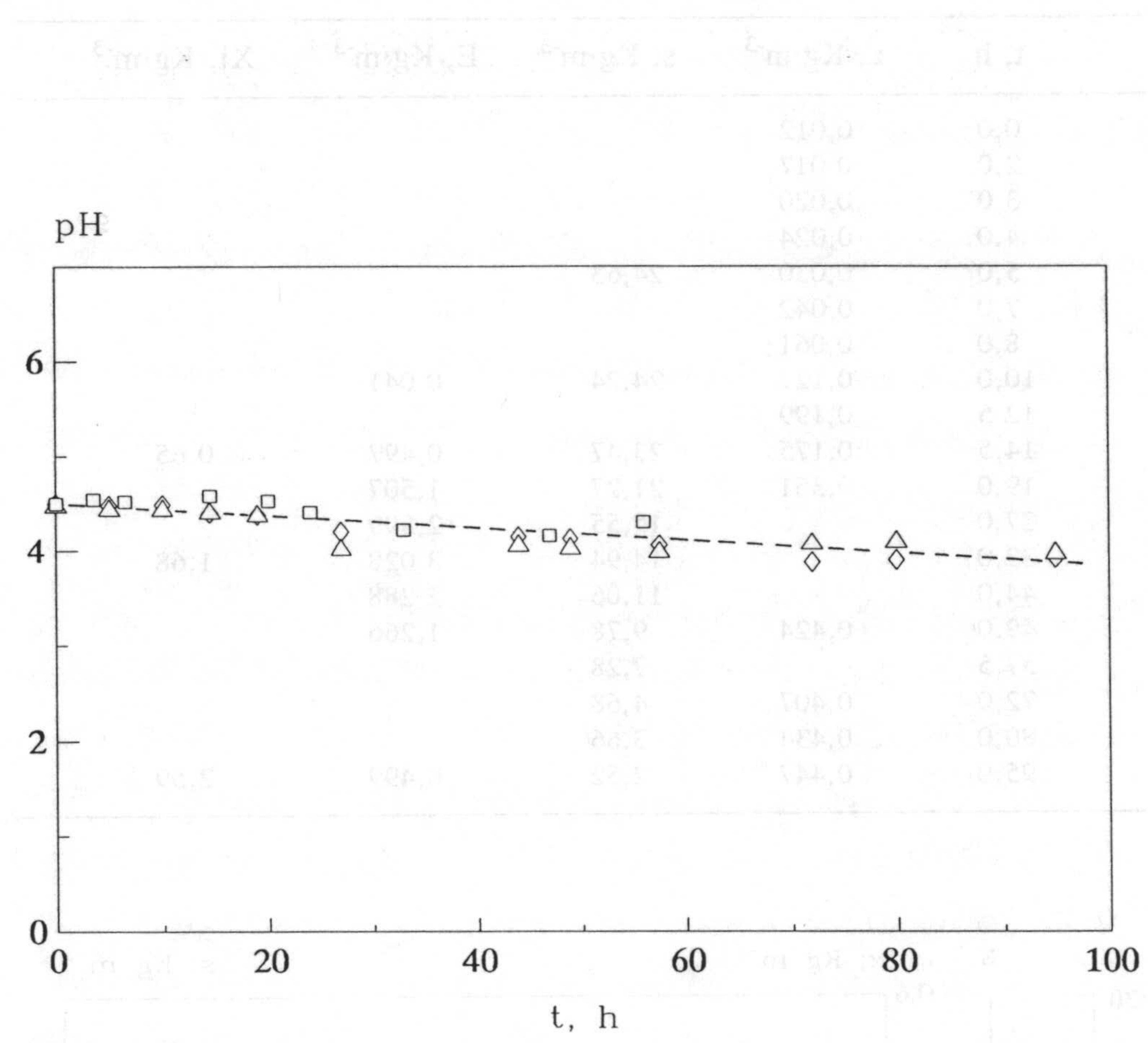


Fig. 4.34.- Variación del pH en el transcurso de los experimentos de la serie de aireación: C-B (□), C-A1 (Δ) y C-A2 (◇).

4.3.2 Influencia del pH inicial

Los resultados experimentales correspondientes a la serie C-P, en la que se ha estudiado la influencia sobre el cultivo del pH inicial del mismo, se recogen en las Tablas 4.29 a 4.33.

El nivel de aireación ha sido mantenido constante en 0,0 v/v/min, es decir, sólo se ha suministrado aire por el vórtice de agitación. Los valores de pH inicial estudiados han sido: 2,5; 3,5; 4,0; 4,5; 5,5 y 6,5.

En las Figuras 4.35 a 4.39 aparecen las representaciones gráficas de los datos experimentales en el transcurso del tiempo.

La evolución del pH para todos los cultivos de la serie aparece en la Figura 4.40. En general, se observan muy pequeñas diferencias para los experimentos de menor pH inicial, mientras que en los de mayor valor de esta variable se produce una disminución con el tiempo del orden de 0,5 unidades como máximo.

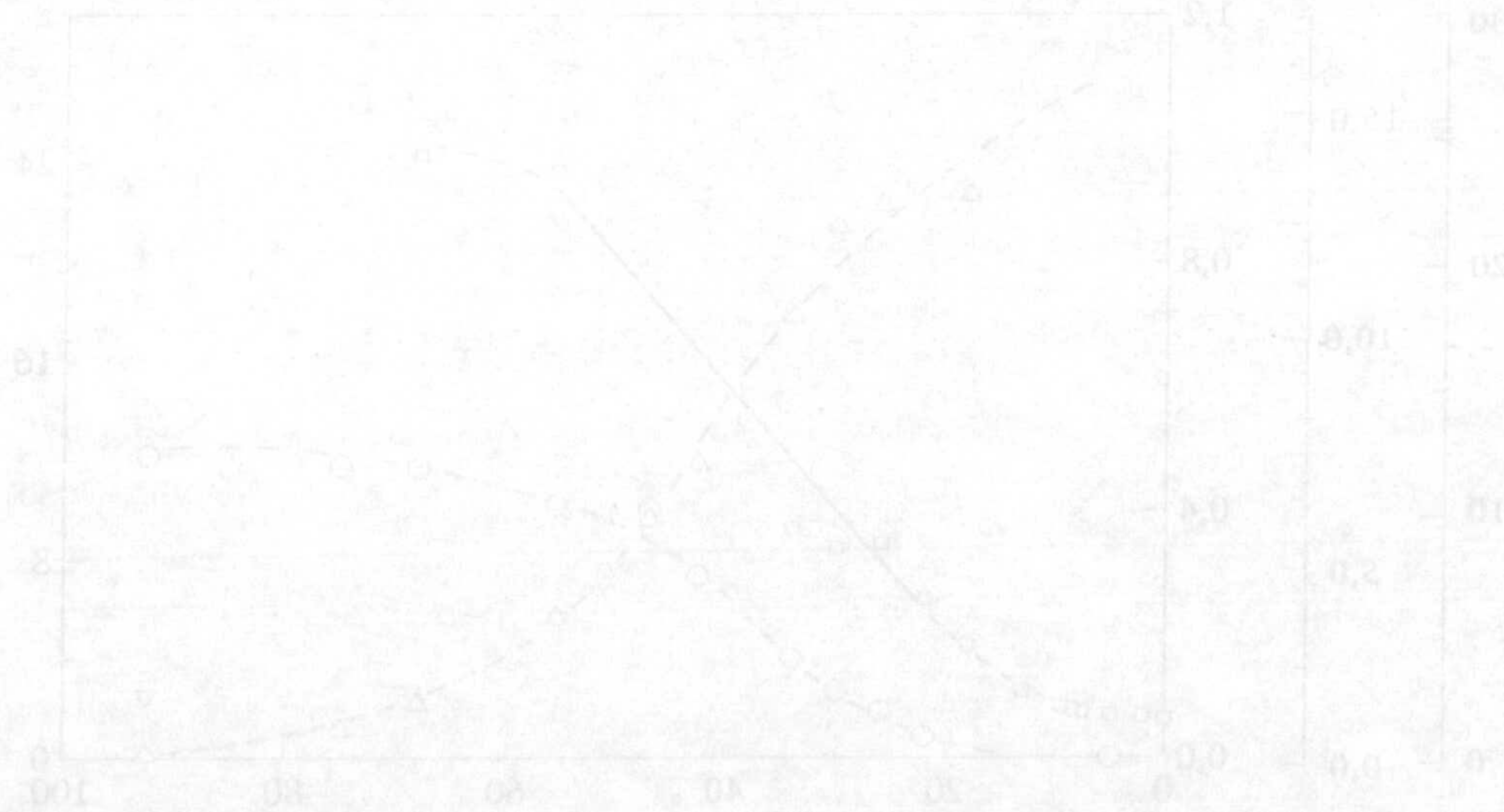


TABLA 4.29

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: C-P1

Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 2,5

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,063			
2,0	0,067			
5,0	0,070		0,003	
7,5	0,076			
8,5	0,079			
9,5	0,084			
13,0	0,108			
18,0	0,181	22,83		
22,0	0,258		0,493	
26,0	0,347	22,42	1,113	
30,0	0,341	21,54	1,593	
34,0	0,374	17,92	2,339	
42,5		12,00	4,305	
47,0		9,76	5,876	
51,0		7,70		
55,5	0,947	5,78	5,966	
68,0	0,973	2,29	6,839	
75,0		1,24	6,893	
92,5		0,23	7,119	2,43

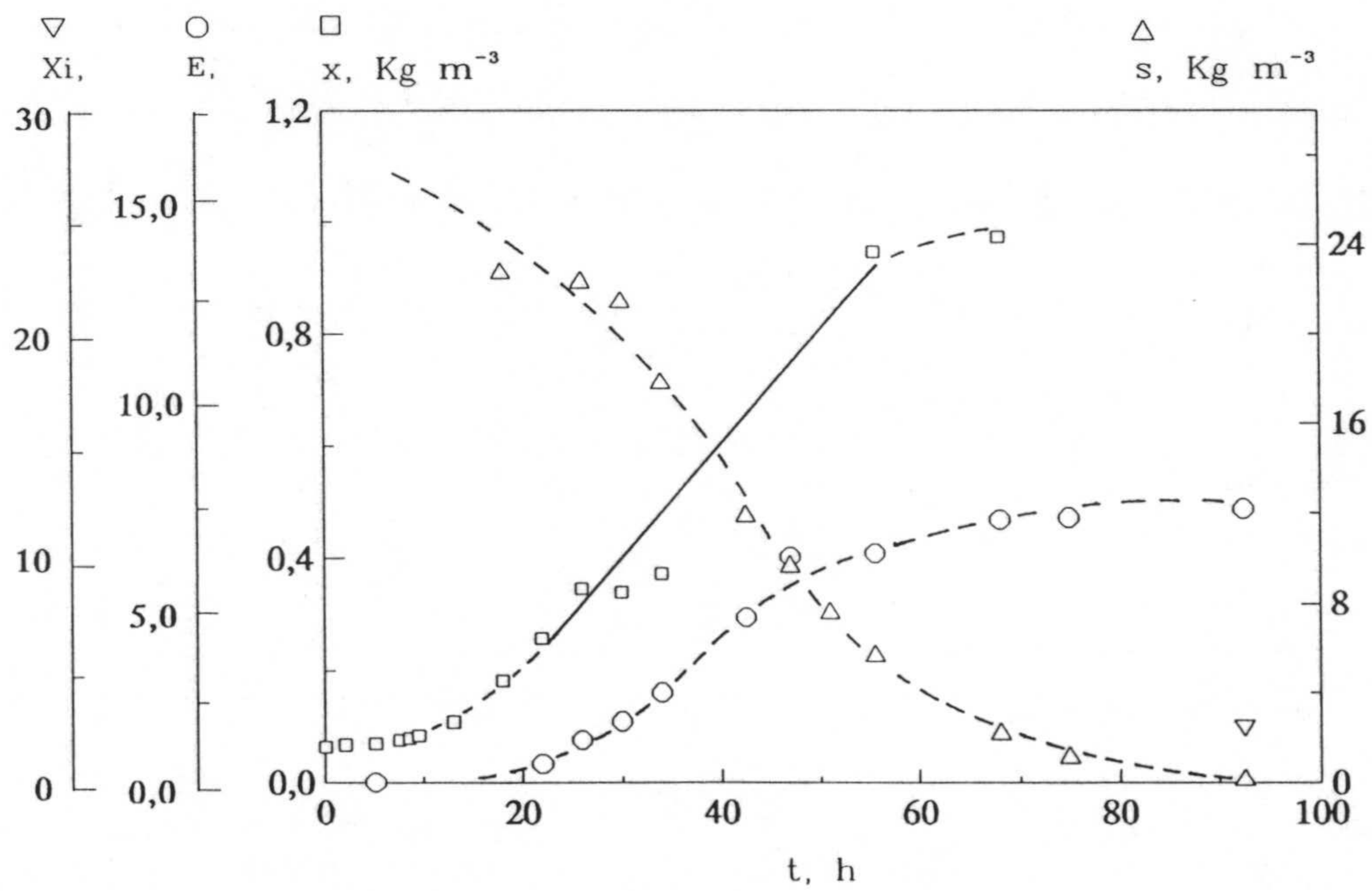


Fig. 4.35

TABLA 4.30

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: C-P2

Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 3,5

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,005			
1,5	0,007			
3,5	0,011			
5,0	0,017			
6,5	0,024	24,59	0,006	
9,0	0,058			
11,0	0,078		0,045	
14,5	0,158	24,22		
20,0	0,298	21,74	0,873	0,05
24,0	0,383	19,32	1,650	
28,0	0,446	16,94	2,582	
33,0	0,624	13,26	4,379	0,91
46,5	0,902	2,54	8,532	
56,0	1,209	0,14	8,136	
68,5		0,18	7,390	1,38
82,0	1,264	0,16		

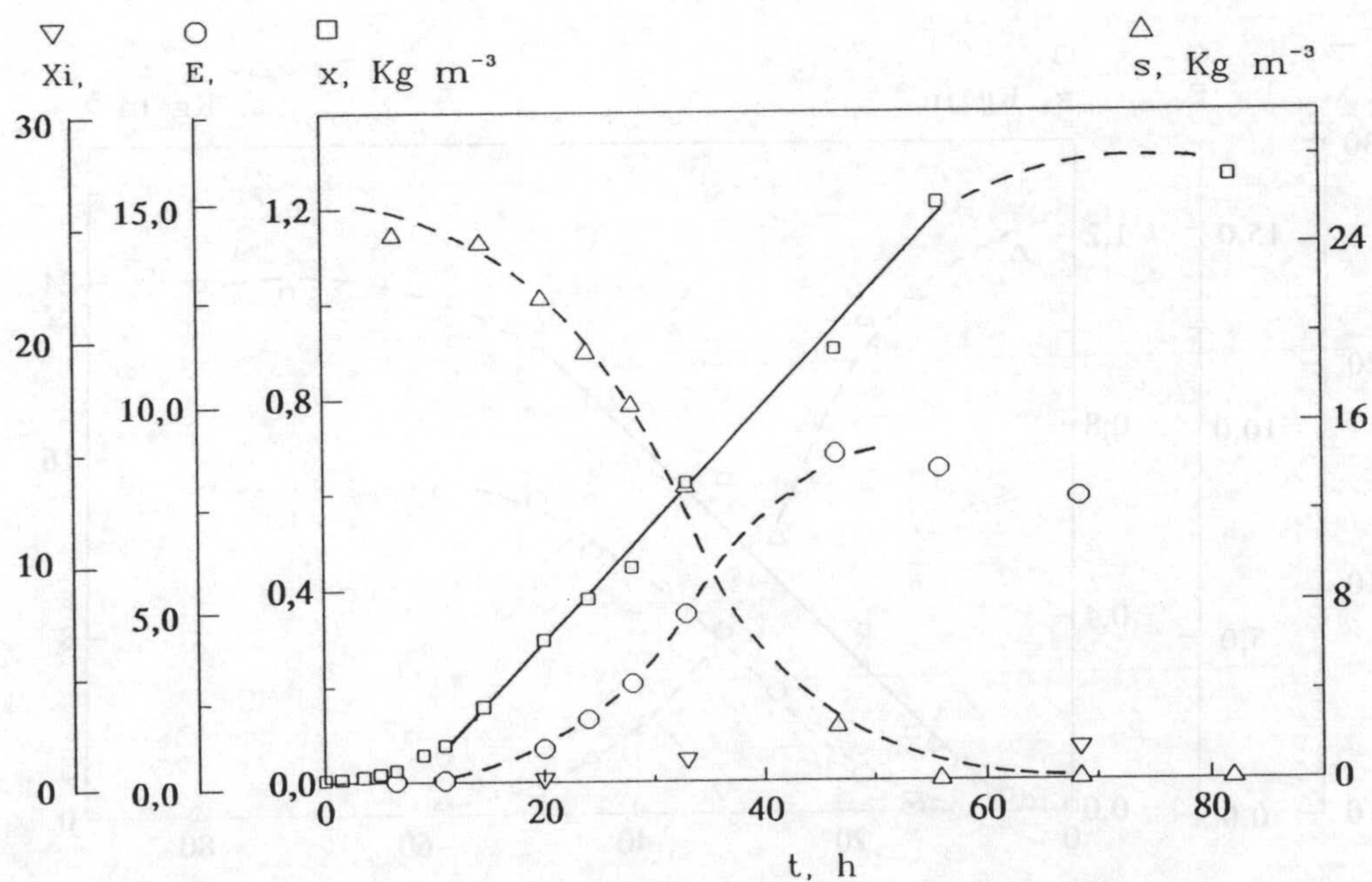


Fig. 4.36

TABLA 4.31

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: C-P3

Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 4,0

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,006			
3,0	0,012			
4,0	0,016			
5,0	0,019	24,99		
6,0	0,032			
7,0	0,040			
10,0	0,097	23,76	0,033	
12,5	0,134			
14,5	0,163	23,28	0,140	0,46
19,0	0,376	22,12	0,983	
27,0		12,31	3,130	
32,0	0,695	8,19	4,712	0,89
44,0	0,856	2,62	6,825	
49,0	0,960	1,15	8,159	
57,5	1,031	0,58	8,407	2,36
72,0	1,094	0,33	7,774	
80,0	1,112	0,28		

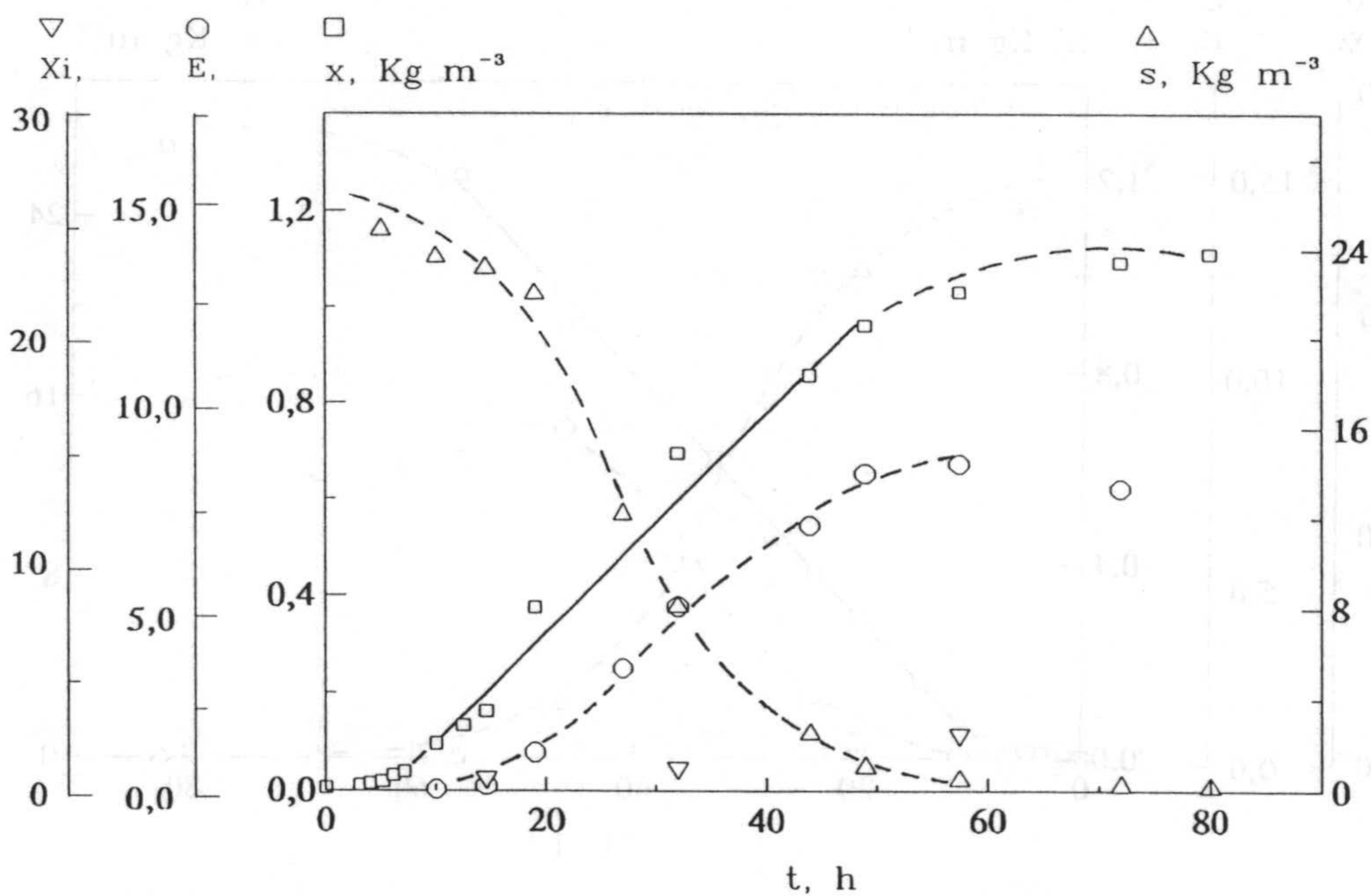


Fig. 4.37

TABLA 4.32

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: C-P4

Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 5,5

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,006			
1,5	0,008			
3,5	0,013			
5,0	0,022			
6,5	0,030	24,21	0,007	
9,0	0,071			
11,0	0,097	23,46	0,070	
14,5	0,175	20,79	0,384	
20,0	0,386	19,88	1,226	0,16
24,0	0,590	16,03	2,102	
28,0	0,702	12,55	4,091	
33,0	0,938	7,15	6,611	0,96
46,5	1,155	0,23	8,701	
56,0	1,434	0,19		
68,5		0,17		
82,0			8,995	1,96

UNIVERSIDAD DE GRANADA
26 MAR. 1993
COMISION DE DOCTORADO

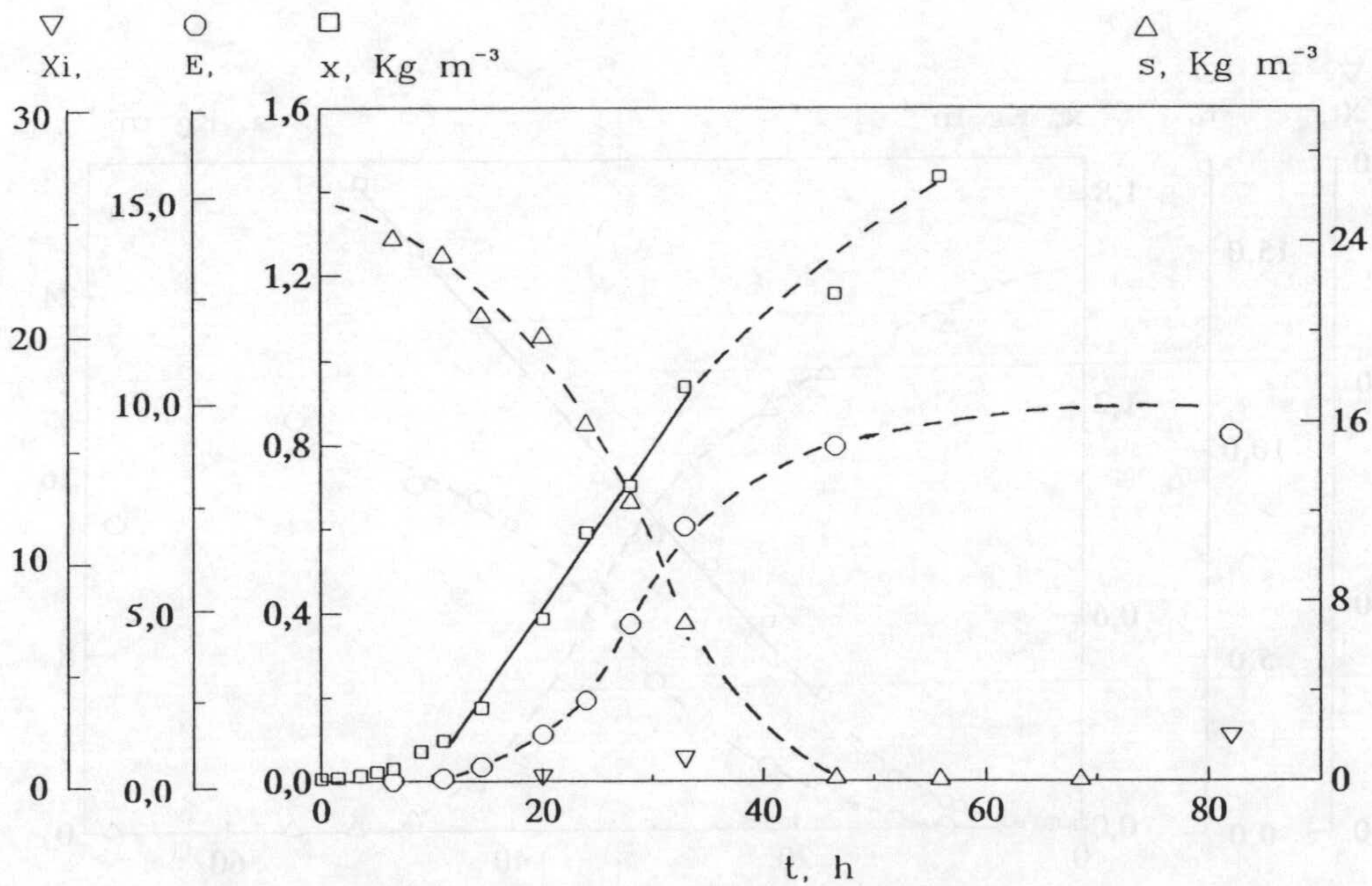


Fig. 4.38

TABLA 4.33

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: C-P5

Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 6,5

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,007			0,0
2,0	0,010			0,1
3,5	0,013			0,2
5,0	0,017		0,004	0,2
8,5	0,060			0,2
9,5	0,073	22,52	0,050	0,2
13,0	0,148		0,232	0,1
18,0	0,380	20,44	0,932	0,1
22,0	0,590	18,88	1,627	0,05
26,0	0,754	17,61		0,05
30,0	0,834	13,56	3,865	0,05
34,0	1,001	10,90	5,740	0,05
42,5	1,531	2,15	8,645	0,05
47,0	1,649	0,65	9,040	0,05
51,0	1,839	0,22		0,05
55,5		0,22	10,735	1,59
68,0	1,760	0,19	8,080	

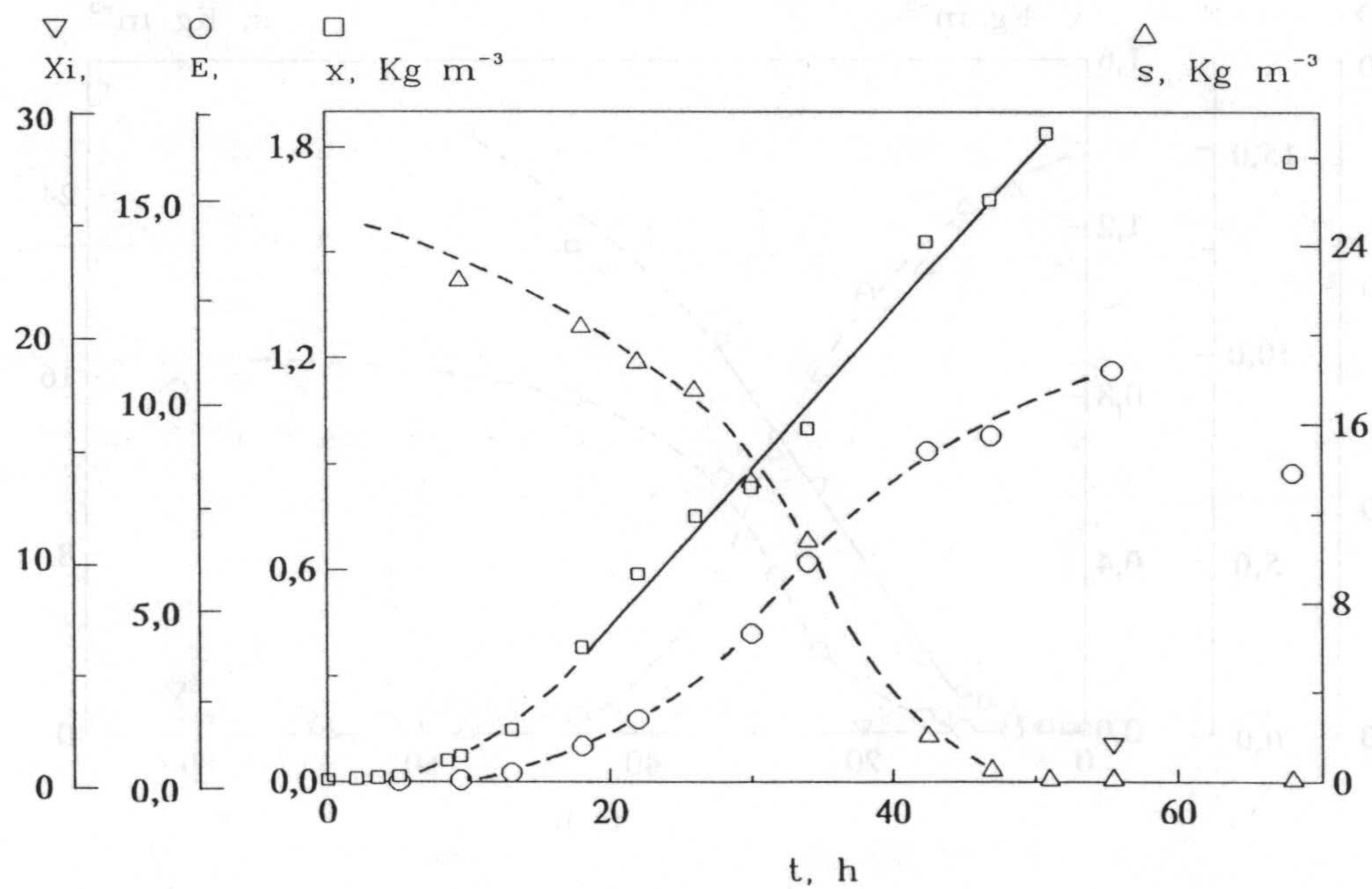


Fig. 4.39

Fig. 4.39.- Variación del pH en los experimentos de la serie de pH inicial: C-P1 (□), C-P2 (Δ), C-P3 (○), C-B (■), C-P4 (◇) y C-P5 (▽).

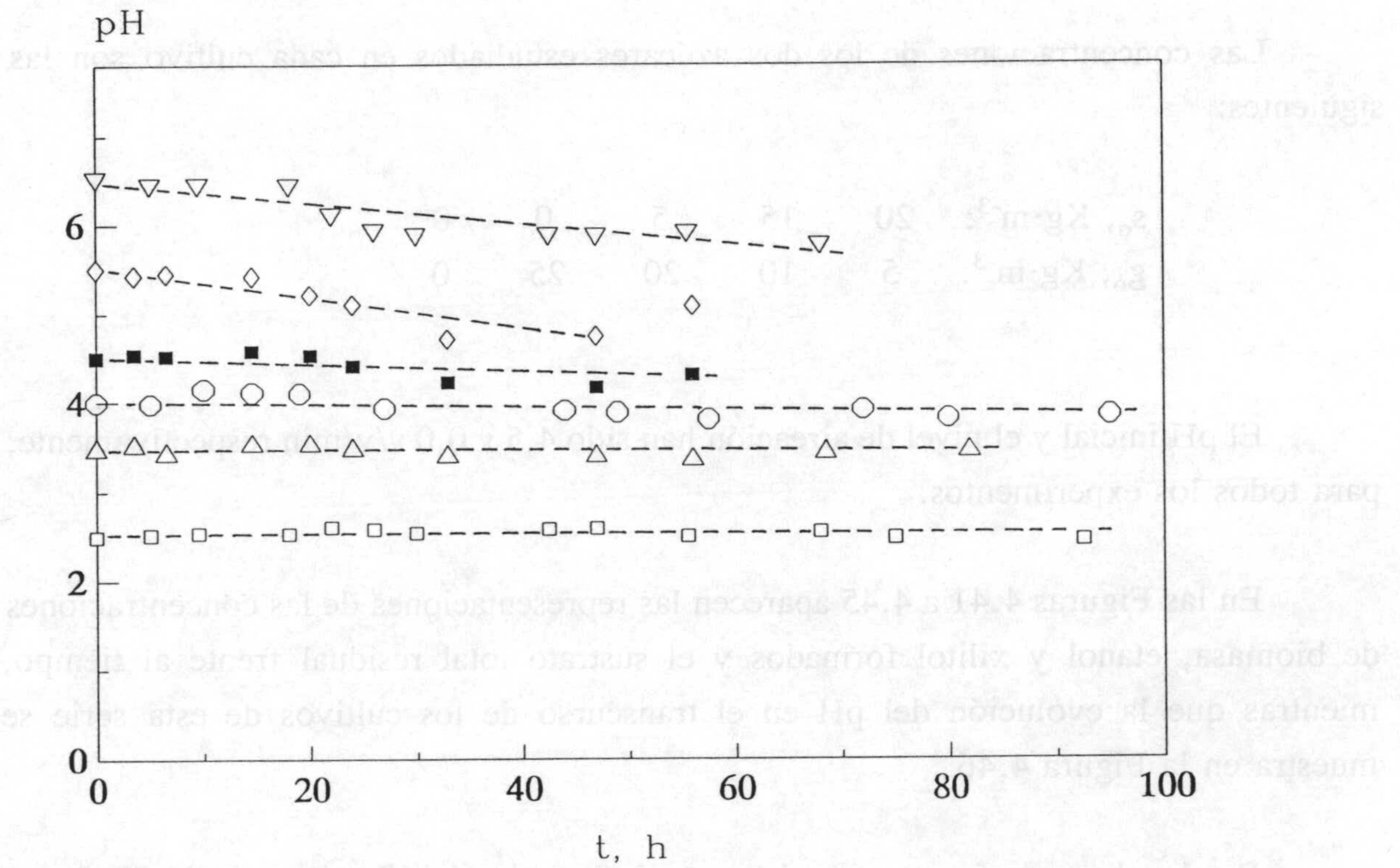


Fig. 4.40.- Variación del pH en los experimentos de la serie de pH inicial: C-P1 (□), C-P2 (Δ), C-P3 (○), C-B (■), C-P4 (◇) y C-P5 (▽).

4.3.3 Influencia de la composición del medio de cultivo. Mezclas xilosa-glucosa

Las Tablas 4.34 a 4.38 recogen los resultados experimentales obtenidos en la fermentación con mezclas de xilosa y glucosa en distintas proporciones. El experimento CM-5 corresponde al cultivo realizado en ausencia de sustrato.

Las concentraciones de los dos azúcares estudiados en cada cultivo son las siguientes:

$s_0, \text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$:	20	15	5	0	0
$g_0, \text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$:	5	10	20	25	0

El pH inicial y el nivel de aireación han sido 4,5 y 0,0 v/v/min respectivamente, para todos los experimentos.

En las Figuras 4.41 a 4.45 aparecen las representaciones de las concentraciones de biomasa, etanol y xilitol formados y el sustrato total residual frente al tiempo, mientras que la evolución del pH en el transcurso de los cultivos de esta serie se muestra en la Figura 4.46.

Puede observarse que no existe una influencia significativa en el pH de las distintas proporciones de xilosa y glucosa ensayadas y que, en general, se obtienen ligeros descensos a tiempos de experimento que coinciden con consumos apreciables de la mezcla de sustratos y con la formación de bioproductos. Este descenso en el pH puede ser debido a la excreción de bioproductos de carácter ácido, tales como ácido acético, glicerol y otros alcoholes, Du Preez y col. (1988). Posteriormente, el pH se mantiene prácticamente constante; este comportamiento puede atribuirse, al menos parcialmente, al efecto inhibitorio creado por el propio etanol formado.

TABLA 4.34

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO RESIDUAL

EXPTO: C-M1 $pH_i = 4,5$ $Q = 0,000$ v/v/min

$s_0 = 20 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $g_0 = 5 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	g, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	X_i , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,011				
2,0	0,014				
3,0	0,018				
5,0	0,028		4,94	0,010	
6,0	0,042				
7,0	0,055				
8,5	0,080				
10,0	0,082	24,40	4,49	0,355	
13,0	0,249		1,62	0,784	0,04
15,0	0,356			1,475	0,06
22,0		17,46		3,571	
24,0	0,780	14,81		3,729	0,27
27,0		11,91		4,746	
31,0	0,856	8,62		6,690	0,36
34,0	0,942	5,62	0,38	7,119	0,44
38,0	1,018	2,13	0,41	7,628	0,51
47,5	1,207	0,32		6,441	
51,0	1,207	0,23			
58,0	1,229	0,21			

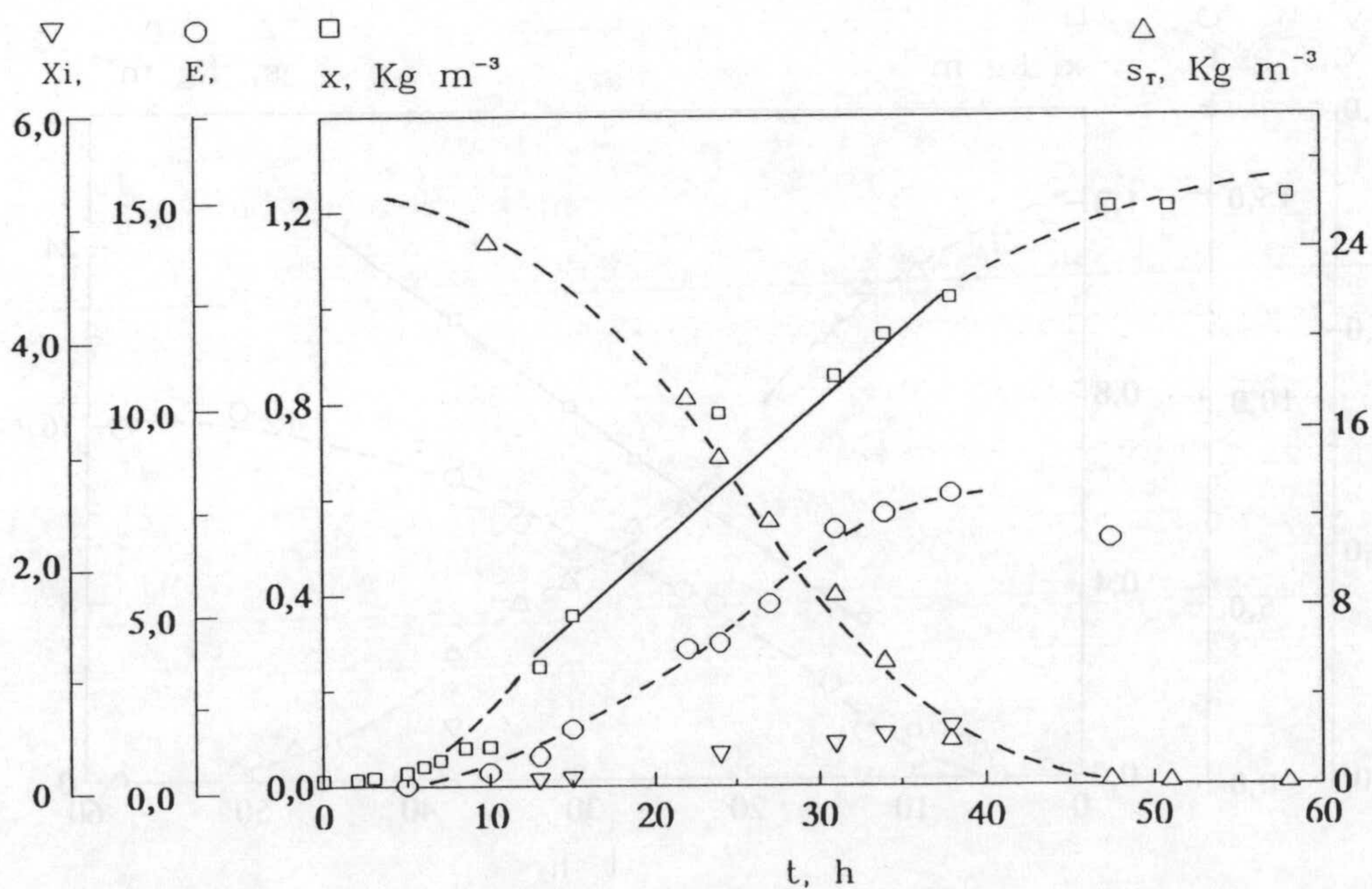


Fig. 4.41

TABLA 4.35

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO RESIDUAL

EXPTO: C-M2 $\text{pH}_i = 4,5$ $Q = 0,000 \text{ v/v/min}$

$s_0 = 15 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $g_0 = 10 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	g, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	X_i , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,015				
2,0	0,024				
3,0	0,026				
5,0	0,044	24,69		0,010	
6,0	0,060				
7,0	0,074				
8,5	0,102				
10,0	0,098	22,77	8,93	0,486	
13,0	0,333	22,02	5,18	1,215	0,02
15,0		19,77	3,00	2,486	0,03
22,0		13,33	0,03	4,565	
24,0		12,18	0,04	4,916	
27,0	0,668	11,36		5,650	
31,0	0,780	8,93		6,159	0,33
34,0		7,98		6,667	
38,0	0,964	5,74		7,910	0,46
47,5	1,207	1,53			
51,0	1,193	0,68		9,662	
58,0	1,162	0,20		9,210	
73,0	1,220				

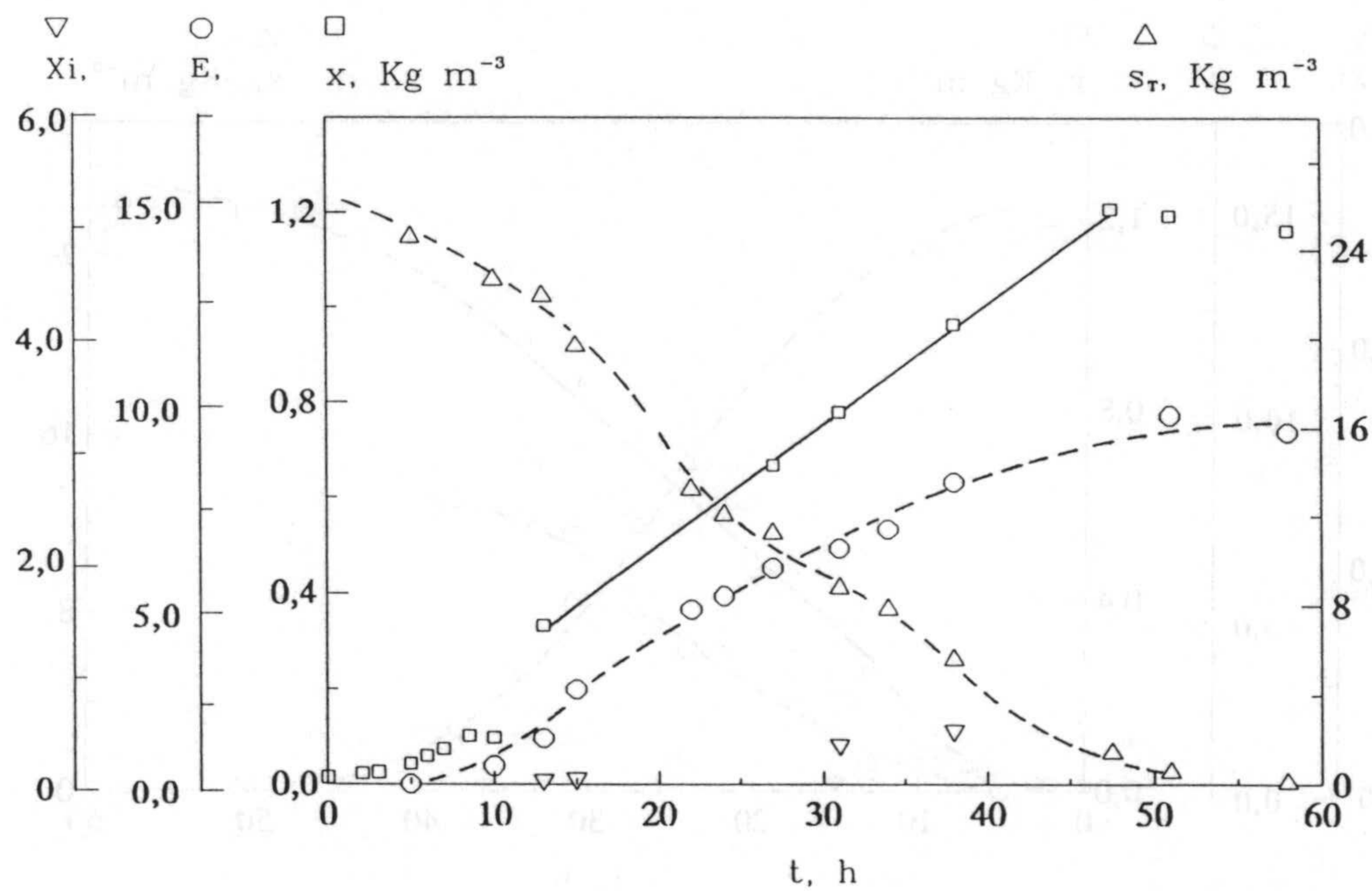


Fig. 4.42

TABLA 4.36

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SISTRATO RESIDUAL

EXPTO: C-M3 $pH_i = 4,5$ $Q = 0,000 \text{ v/v/min}$

$s_0 = 5 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $g_0 = 20 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	g, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	X_i , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,016				
2,0	0,024				
3,0	0,025				
5,0	0,038			0,009	
6,0	0,056				
7,0	0,068				
8,5	0,105				
10,0	0,141		19,26	0,435	
13,0	0,428	21,20	15,63	1,367	0,01
15,0	0,621	17,86	13,60	2,271	
22,0	1,112	5,89	0,03	7,096	
24,0	1,063	5,66	0,01	6,780	
27,0	1,081	5,50		7,006	
31,0	1,050	5,43		7,402	0,18
34,0	1,144	5,22		7,571	0,19
38,0	1,117	4,78		7,515	0,22
47,5	1,243			6,780	0,20
51,0	1,301	4,46			
58,0	1,216	4,27			
73,0	1,310	3,16		7,119	

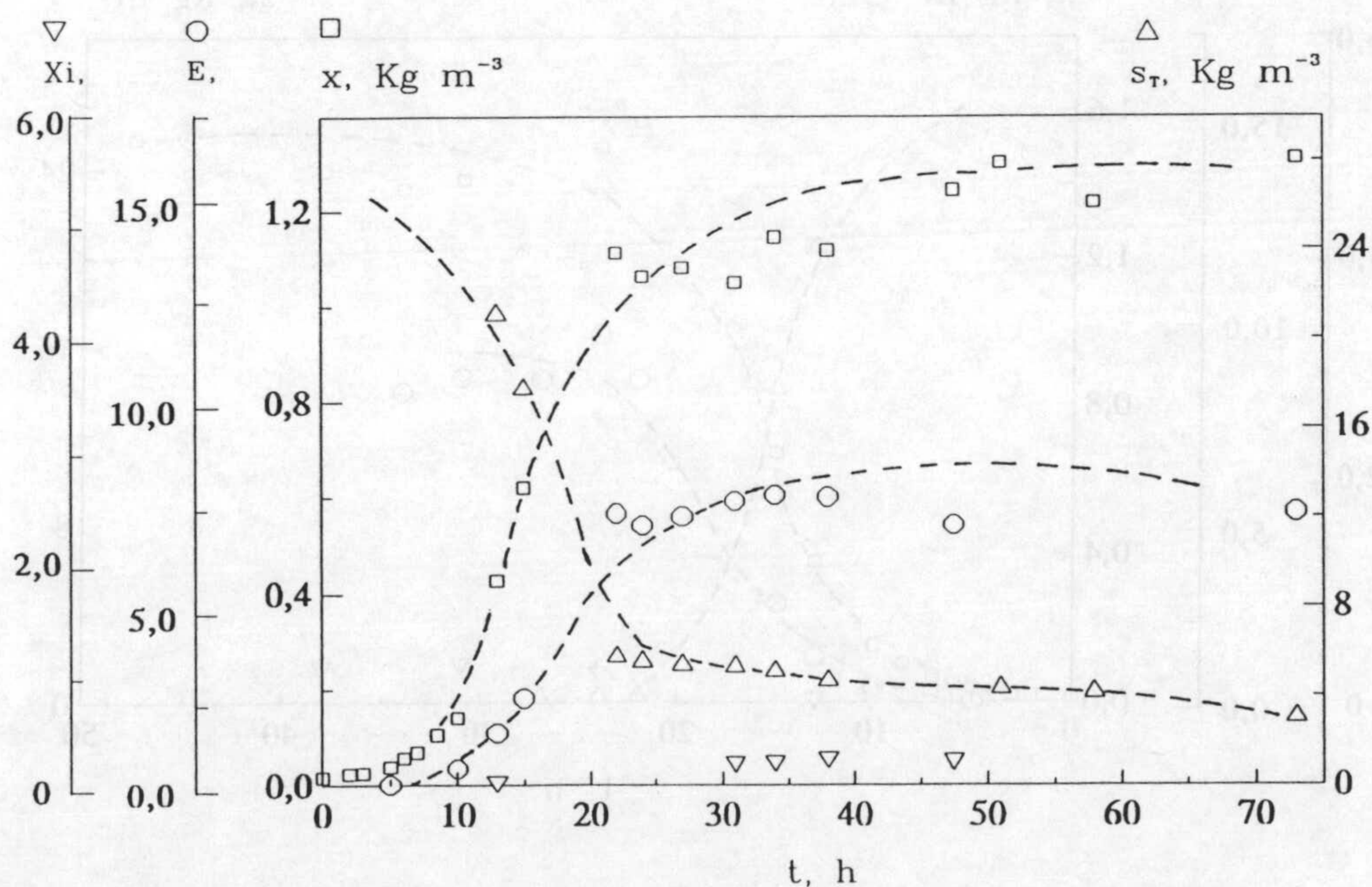


Fig. 4.43

TABLA 4.37

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SISTRATO RESIDUAL

EXPTO: C-M4 $pH_i = 4,5$ $Q = 0,000 \text{ v/v/min}$

$s_0 = 0 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $g_0 = 25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	g, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	X_i , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,013				
2,0	0,019				
3,0	0,024				
5,0	0,039			0,005	
6,0	0,054				
7,0	0,071				
8,5	0,105				
10,0	0,156			0,412	0,01
13,0	0,379	20,60		1,215	0,02
15,0	0,671	14,23		2,599	
22,0	1,571	0,46		8,475	
24,0	1,499	0,39		9,662	0,25
27,0		0,34		8,475	
31,0	1,414			8,532	0,33
34,0	1,387			8,136	
38,0	1,436				0,31
47,5	1,521				

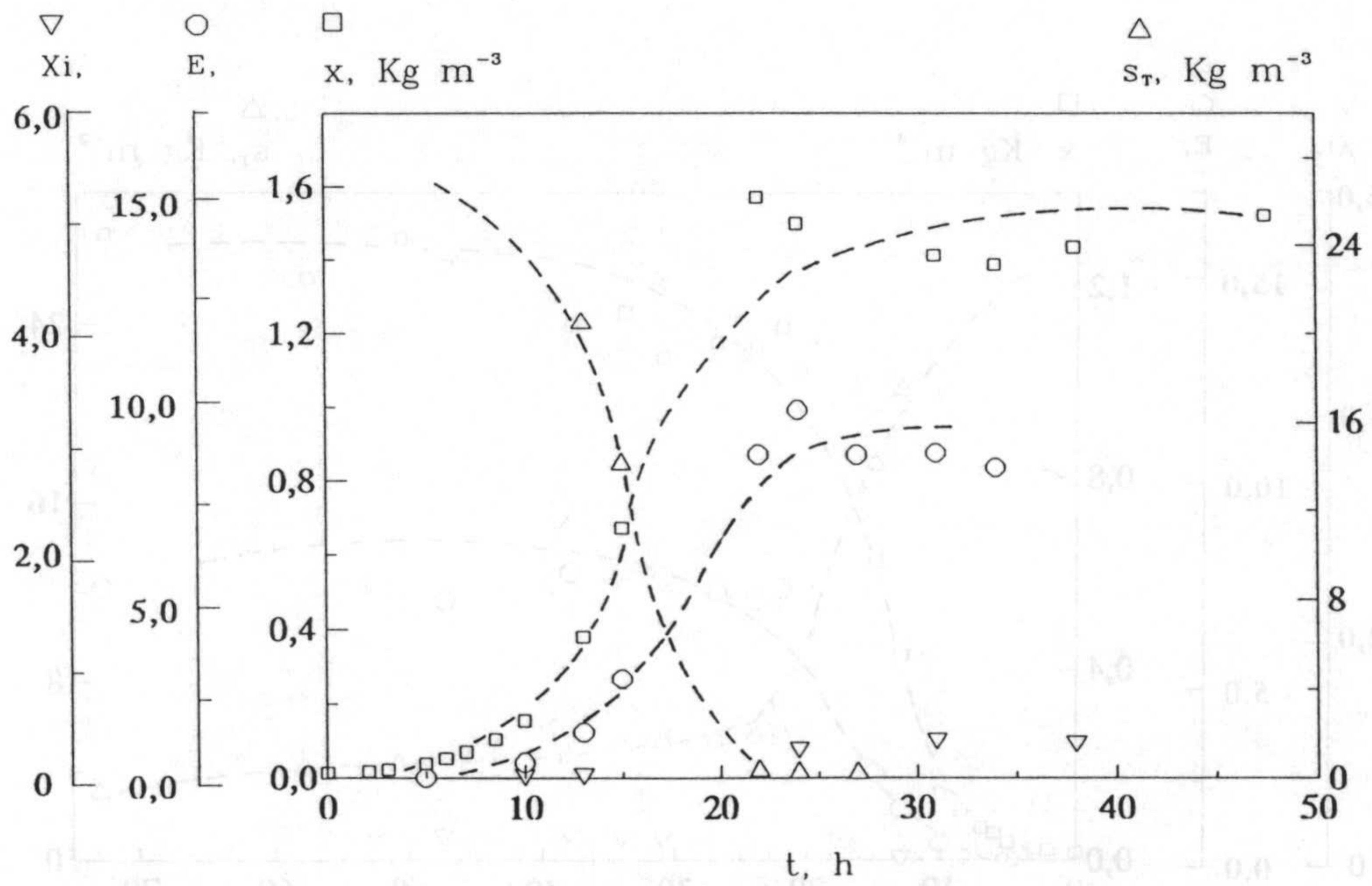


Fig. 4.44

TABLA 4.38

PRODUCCIÓN DE BIOMASA.
SUSTRATO RESIDUAL

EXPTO: C-M5 $pH_i = 4,5$ $Q = 0,000$ v/v/min

$$s_0 = 0 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3} \quad g_0 = 0 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$$

t, h	x, Kg·m ⁻³	s _T , Kg·m ⁻³
0,0	0,018	
1,0	0,019	
2,0	0,022	
4,0	0,029	0,18
5,0	0,038	
6,0	0,047	
7,5	0,063	
9,0	0,072	0,12
12,0	0,107	
14,0	0,157	
21,0	0,248	
26,0	0,311	
30,0	0,320	
33,0	0,410	
37,0	0,422	
46,5	0,548	0,10
50,0	0,628	
52,0	0,599	

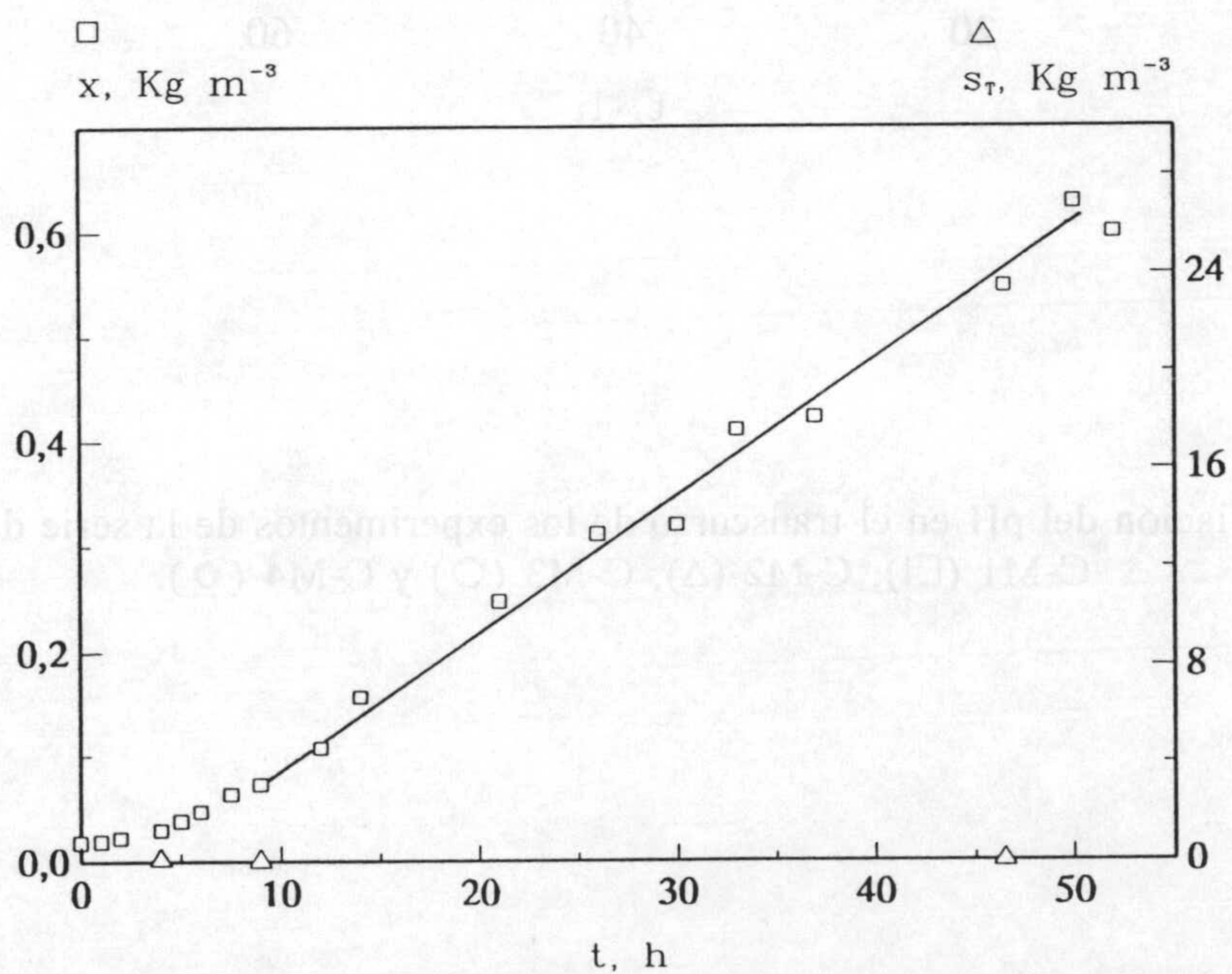


Fig. 4.45

PRODUCCION DE BIOMASA
SUSTRATO RESIDUAL

EXPTO: C-M2 $\mu_{max} = 4.5$ $Q = 0.000$ v_{max}

$\mu_{max} = 0.8$ $g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ $K_s = 0.8$ $g \cdot g^{-1}$

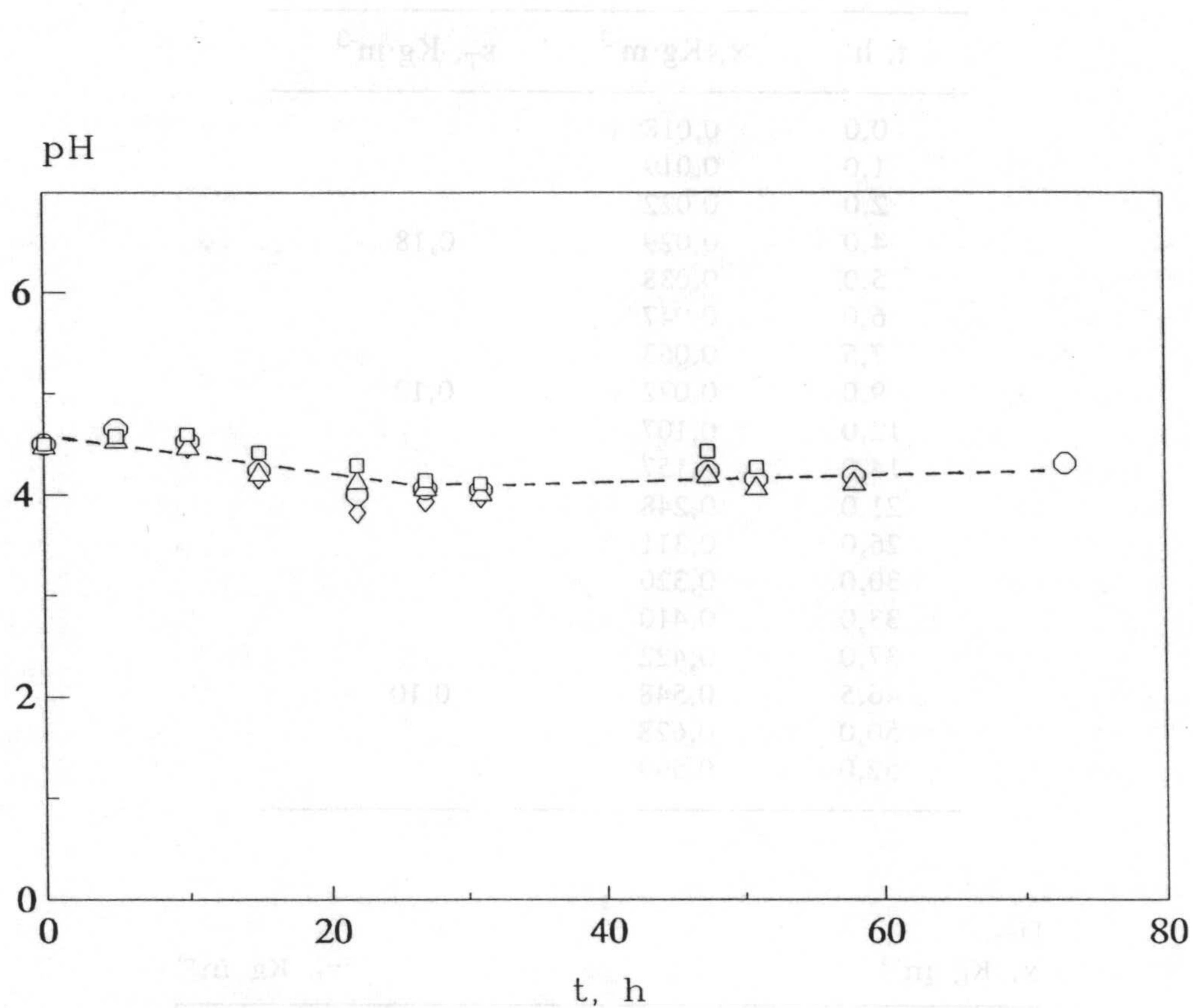


Fig. 4.46.- Variación del pH en el transcurso de los experimentos de la serie de mezclas: C-M1 (□), C-M2 (Δ), C-M3 (○) y C-M4 (◇).

4.4 PICHIA STIPITIS

Al igual que en las dos levaduras precedentes, el estudio de la fermentación etanólica de D-xilosa y D-glucosa con *Pichia stipitis* se ha abordado mediante la realización de tres series de experimentos, en las que se ha determinado respectivamente la influencia del nivel de aireación (serie Pi-A), del pH inicial (serie Pi-P) y de la composición del medio de cultivo en cuanto a la proporción de xilosa y glucosa en el mismo (serie Pi-M).

Los resultados experimentales aparecen en las Tablas 4.39 a 4.54 y en las correspondientes representaciones de las concentraciones de biomasa, etanol y xilitol y de sustrato residual de las Figuras 4.47 a 4.65, en las que también se incluye la evolución temporal del pH para todos los cultivos excepto para el desarrollado en ausencia de sustrato (experimento Pi-M8).

4.4.1 Influencia del caudal de aireación

Para el estudio de esta variable se han realizado cultivos en los que se ha mantenido constante el pH inicial, en 4,5, variándose el caudal de aireación en los siguientes valores: 0,000; 0,075; 0,150; y 0,300 v/v/min. Los resultados experimentales obtenidos se reflejan en las Tablas 4.39 a 4.42, mientras que en las Figuras 4.47 a 4.50 aparecen las representaciones de las concentraciones de biomasa, etanol y xilitol producidos y de xilosa residual.

En la Figura 4.51 se muestra la evolución del pH con el tiempo para los experimentos de esta serie. Se observa una disminución del valor de esta variable para los experimentos en los que se aporta un caudal de aire externo, mientras que para el experimento base, al que sólo se suministra aire por el vórtice de agitación, el pH es prácticamente constante a lo largo del cultivo. Por otra parte no se aprecia influencia significativa del nivel de aireación sobre la disminución del pH observada.

TABLA 4.39

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: Pi-B

pH_i = 4,5

Q = 0,000 v/v/min

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,002			
1,5	0,004			
3,0	0,011			
4,0	0,019			
5,0	0,035			
6,5	0,070			
8,0	0,111		0,044	
14,0	0,388		0,444	0,01
19,0	0,609			
25,0	1,049	18,75	2,328	
30,5	1,575	13,35	4,384	0,079
39,0	2,280	4,30	7,006	0,12
43,0	2,390	0,95	9,153	
47,0	2,475	0,33	8,984	
52,5	2,536	0,17	9,492	0,16
64,0	2,73	0,16	9,040	
71,0	2,597	0,16	8,984	

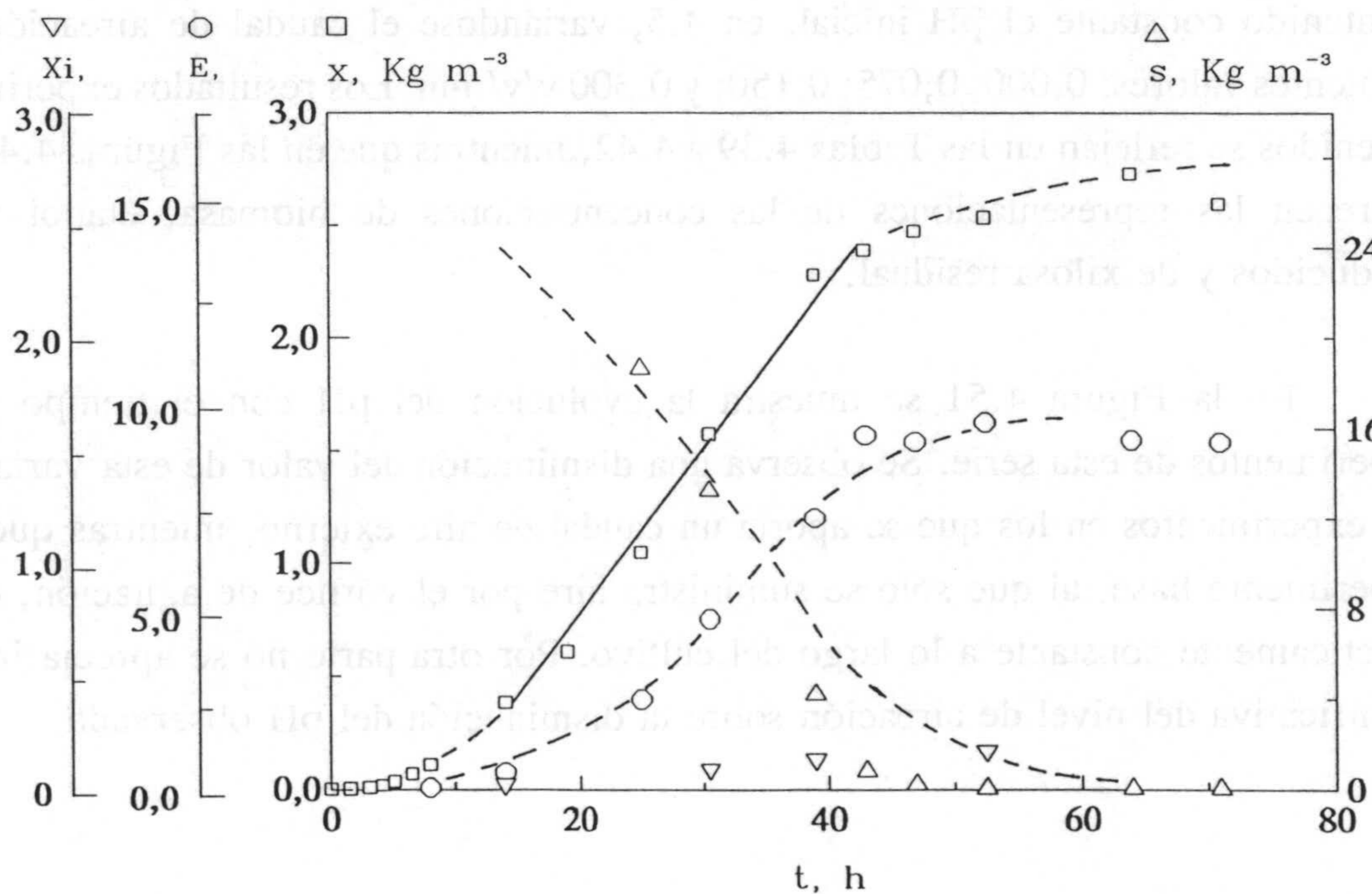


Fig. 4.47

TABLA 4.40

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: Pi-A1

pH_i = 4,5

Q = 0,075 v/v/min

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³
0,0	0,002		
2,0	0,008		
3,0	0,017		
4,0	0,034		
5,0	0,066		
7,0	0,160		
10,0	0,381		0,269
17,0	1,112	19,69	2,068
19,0	1,329	17,45	2,915
20,0	1,529	16,14	
21,0	1,657	14,24	4,012
22,0	1,782	12,62	
24,0	2,037	10,29	5,763
26,0	2,293	7,46	6,893
28,0	2,438	4,13	8,193
34,0	2,755	0,21	9,888
43,0	3,095	0,22	9,153

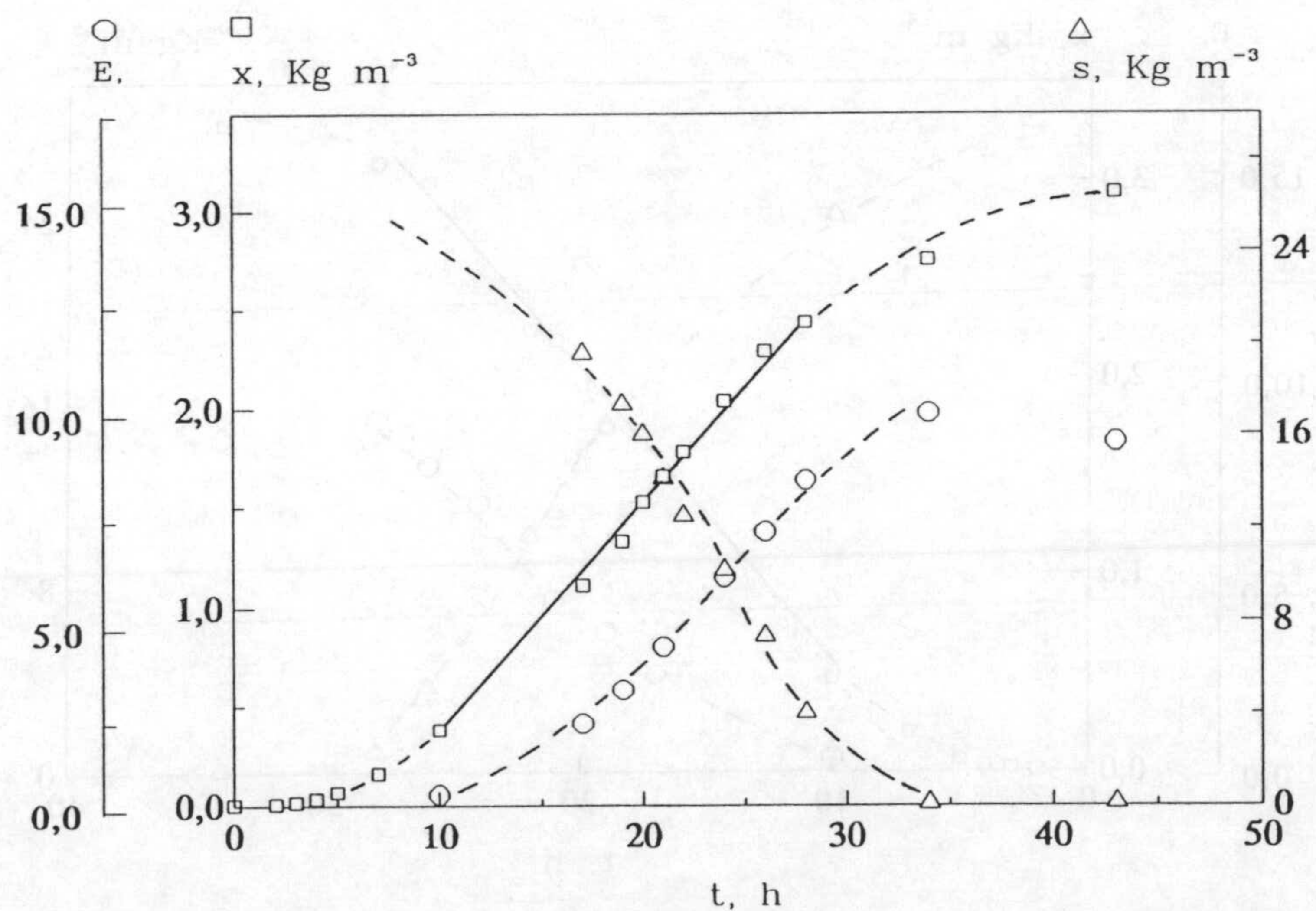


Fig. 4.48

TABLA 4.41

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: Pi-A2

pH_i = 4,5

Q = 0,150 v/v/min

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³
0,0	0,003		
2,0	0,007		
3,0	0,015		
4,0	0,028		
5,0	0,056		
7,0	0,195		
10,0	0,473	24,79	0,349
17,0	1,438	17,91	2,469
19,0	1,742	15,17	3,548
20,0	1,961	13,44	
21,0	2,192	11,36	4,362
22,0	2,244	10,38	
24,0	2,730	7,15	6,780
26,0	2,998	3,82	7,741
28,0	3,095	0,99	8,927
34,0	3,290	0,20	8,475

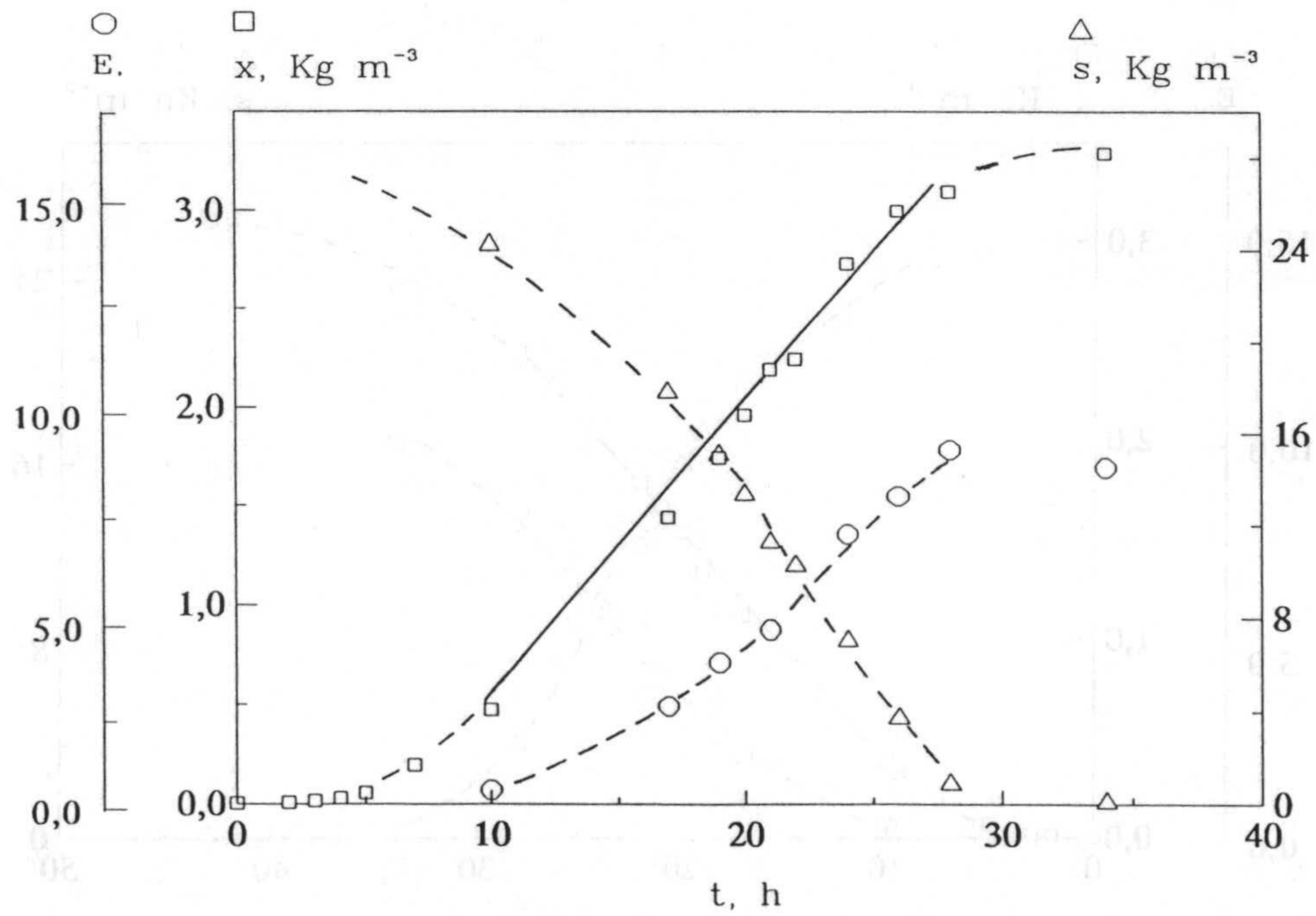


Fig. 4.49

TABLA 4.42

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: Pi-A3

pH_i = 4,5

Q = 0,300 v/v/min

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³
0,0	0,002		
2,0	0,010		
3,0	0,019		
4,0	0,035		
5,0	0,067		
7,0	0,235		
10,0	0,665	24,42	0,310
17,0	1,803	16,81	3,062
19,0	2,192	13,27	4,091
20,0	2,447	11,91	
21,0	2,691	10,03	5,311
22,0	3,132	8,09	
24,0	3,387	4,09	7,402
26,0	3,703	1,77	8,532
28,0	3,788	0,21	9,775
34,0	3,630	0,23	8,080
43,0	3,898	0,22	8,080

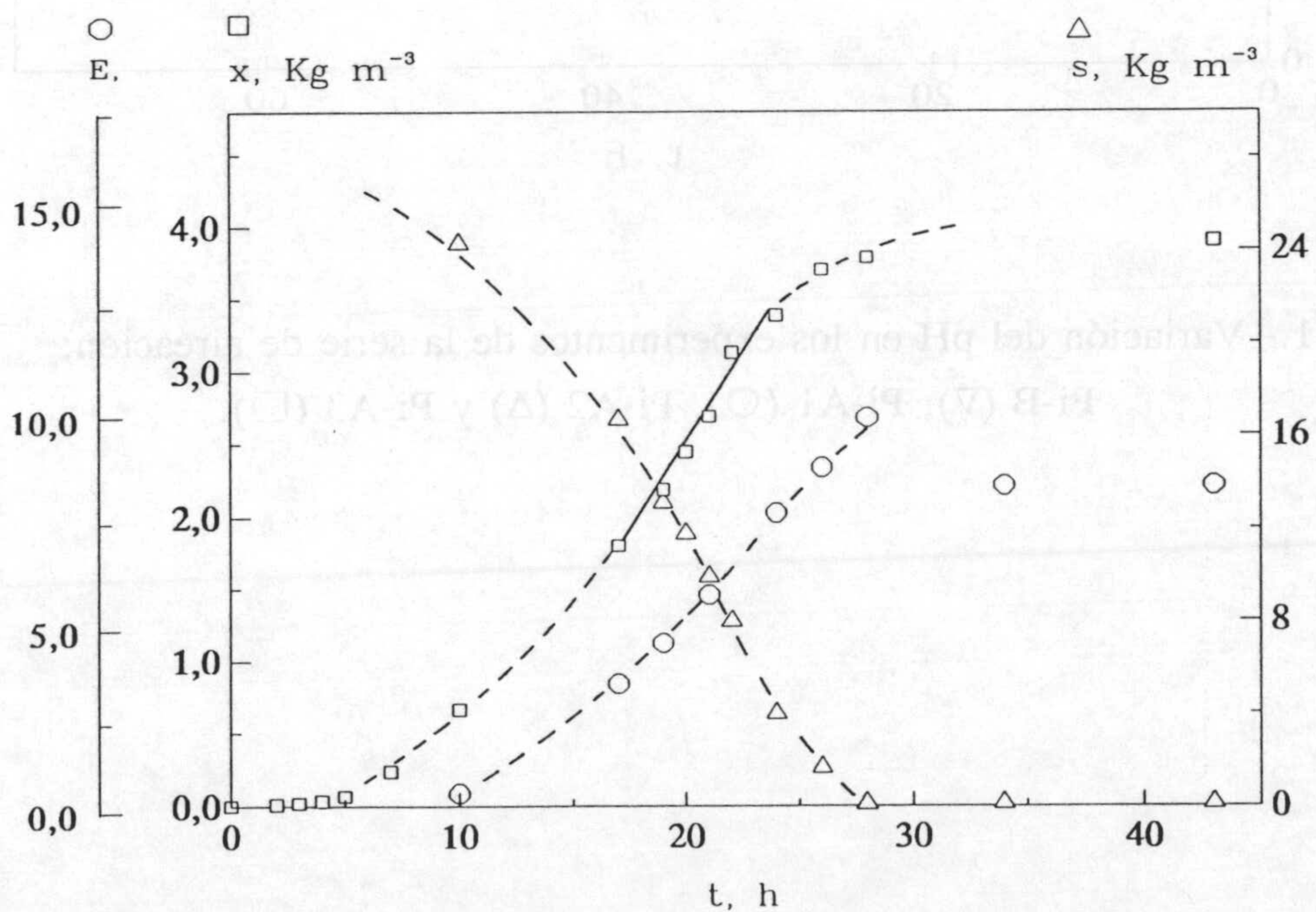


Fig. 4.50

TABLA 4.42
 PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL
 XILITOL RESIDUAL

EXPTO. PI-A3
 pH_i = 4.5
 Q = 0.300 v/v/min

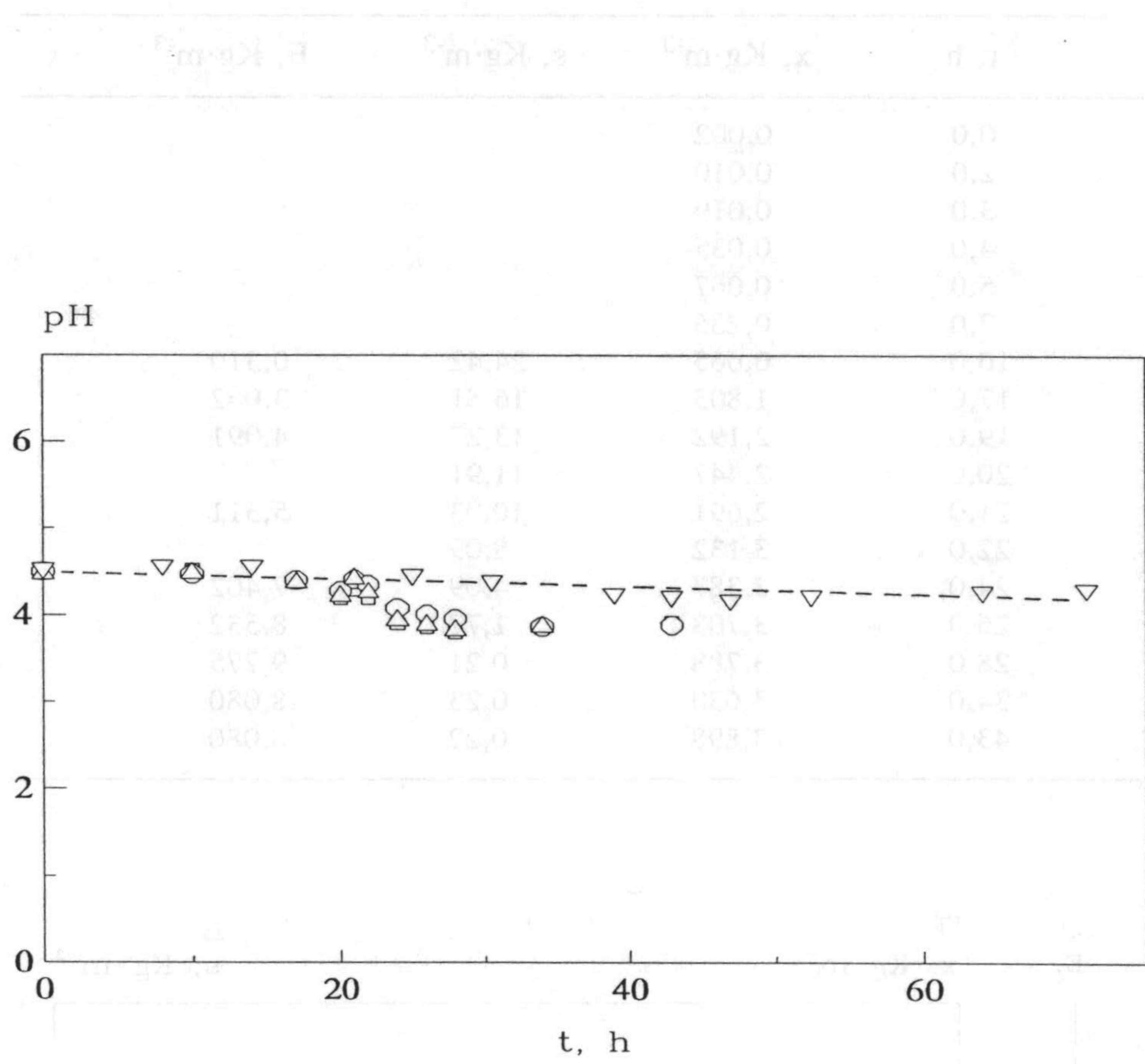


Fig. 4.51.- Variación del pH en los experimentos de la serie de aireación:
 Pi-B (∇), Pi-A1 (○), Pi-A2 (Δ) y Pi-A3 (□).

4.4.2 Influencia del pH inicial

La influencia del pH inicial sobre el cultivo se ha estudiado mediante la serie Pi-P, en la que se ha mantenido constante el caudal de aire aportado, en 0,0 v/v/min y se ha modificado el pH inicial en los siguientes valores: 2,5; 3,5; 4,5; 5,5 y 6,5. La concentración inicial de xilosa ha sido igual a 25 Kg·m⁻³.

Los resultados experimentales obtenidos aparecen en las Tablas 4.43 a 4.46 y se representan en las Figuras 4.52 a 4.55.

La Figura 4.56 muestra la variación temporal del pH para los experimentos de esta serie. Se observan ligeros descensos durante la mayor parte de los cultivos y un pequeño aumento en las últimas horas de los experimentos de pH inicial 5,5 y 6,5.

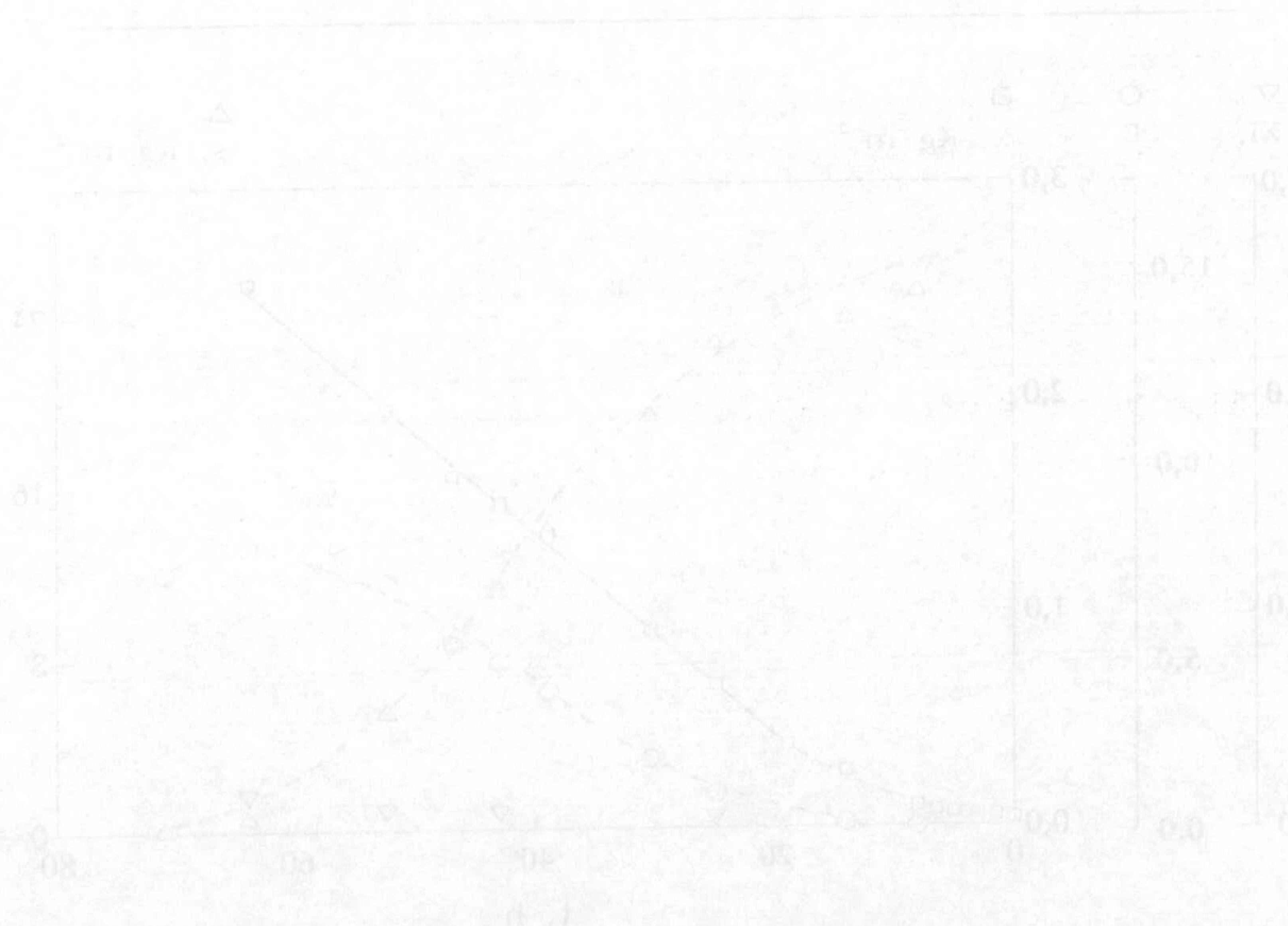


TABLA 4.43

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: Pi-P1

Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 2,5

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,034			
1,5	0,049			
3,0	0,054			
4,0	0,057			
5,0	0,059			
6,5	0,075			
8,0	0,097	24,94	0,004	
14,0	0,264	23,75	0,141	
19,0	0,388			
25,0	0,668	22,60	1,085	0,047
30,5	0,922	19,30	2,170	
39,0	1,361	14,00	4,294	
43,0	1,523	11,20	5,198	0,075
47,0	1,651	8,75	5,763	
52,5	1,961	5,62	7,684	0,086
64,0	2,548	0,70	8,814	0,16
71,0	2,305	0,19	8,023	
74,0	2,344			

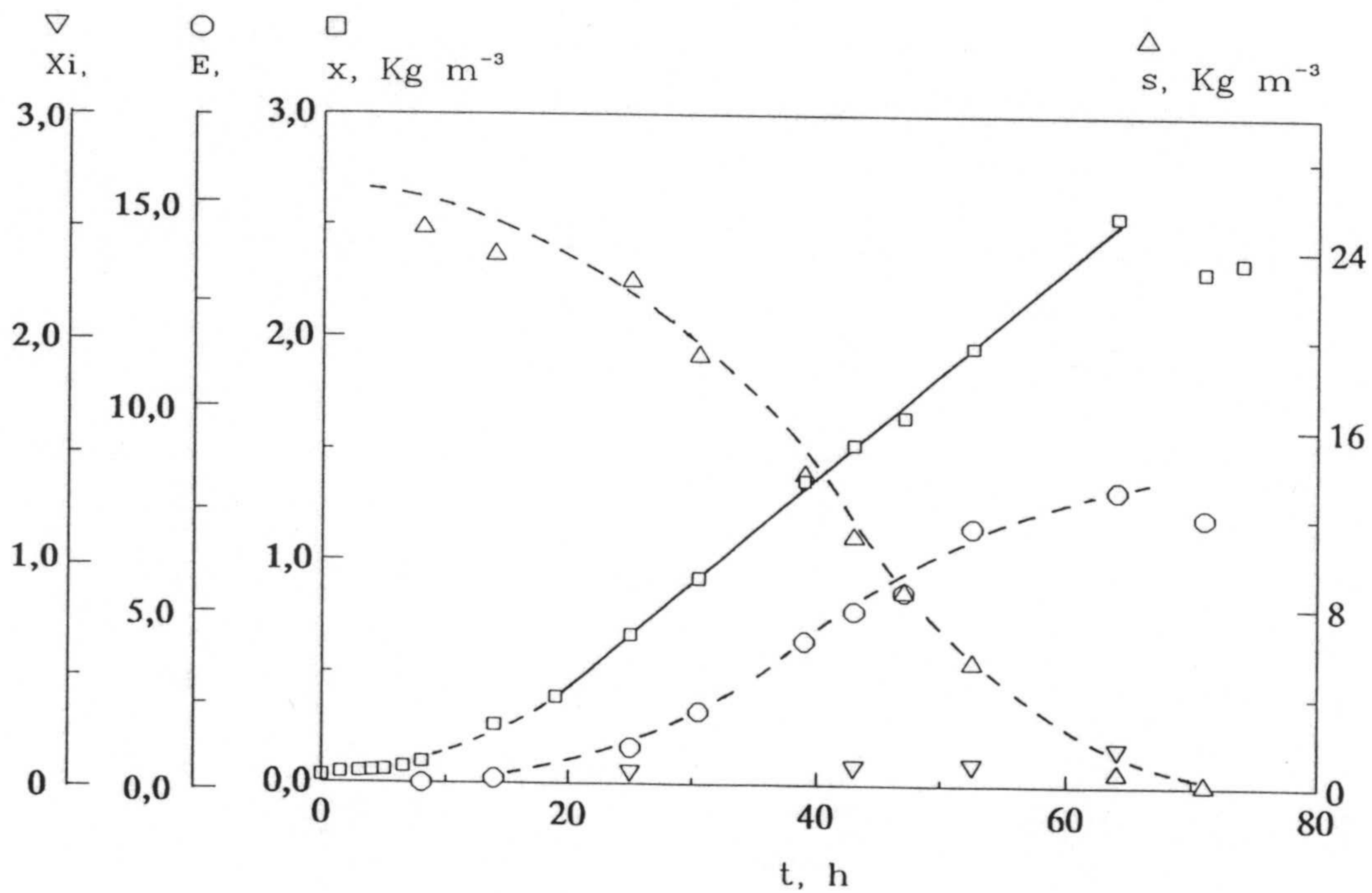


Fig. 4.52

TABLA 4.44

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: Pi-P2

Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 3,5

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,003			
1,5	0,007			
3,0	0,011			
4,0	0,018			
5,0	0,030			
6,5	0,062			
8,0	0,113		0,032	
14,0	0,407		0,426	
19,0	0,617			
25,0	1,061	17,89	2,441	
30,5	1,466	13,23	4,475	
39,0	2,110	4,21	7,402	
43,0	2,293	1,03	7,910	
47,0	2,487	0,33	8,475	0,21
52,5	2,524	0,17	8,543	
64,0		0,17	7,774	
71,0	2,669	0,16	6,916	
74,0	2,706			

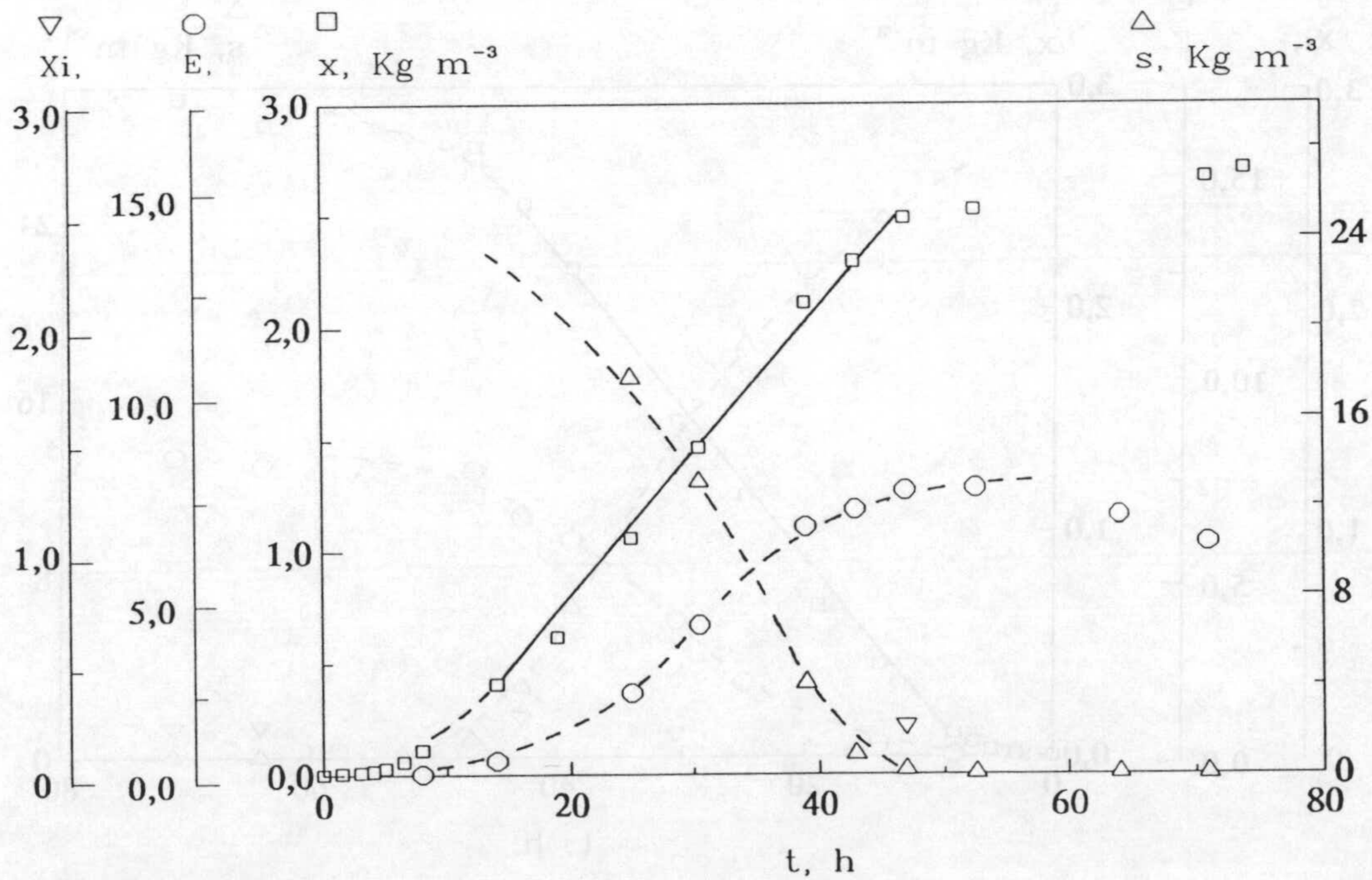


Fig. 4.53

TABLA 4.45

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: Pi-P3

Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 5,5

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,001			
1,5	0,004			
3,0	0,009			
4,0	0,016			
5,0	0,032			
6,5	0,067			
8,0	0,106		0,045	
14,0	0,415	24,17	0,393	0,023
19,0	0,668			
25,0	1,158	18,53	2,215	
30,5	1,502	14,00	4,068	0,098
39,0	2,183	6,80	6,441	
43,0	2,475	3,27	7,119	0,17
47,0	2,730	0,89	8,498	
52,5		0,17		
64,0	2,828	0,11	8,645	0,13
71,0	2,949	0,12	8,927	0,12

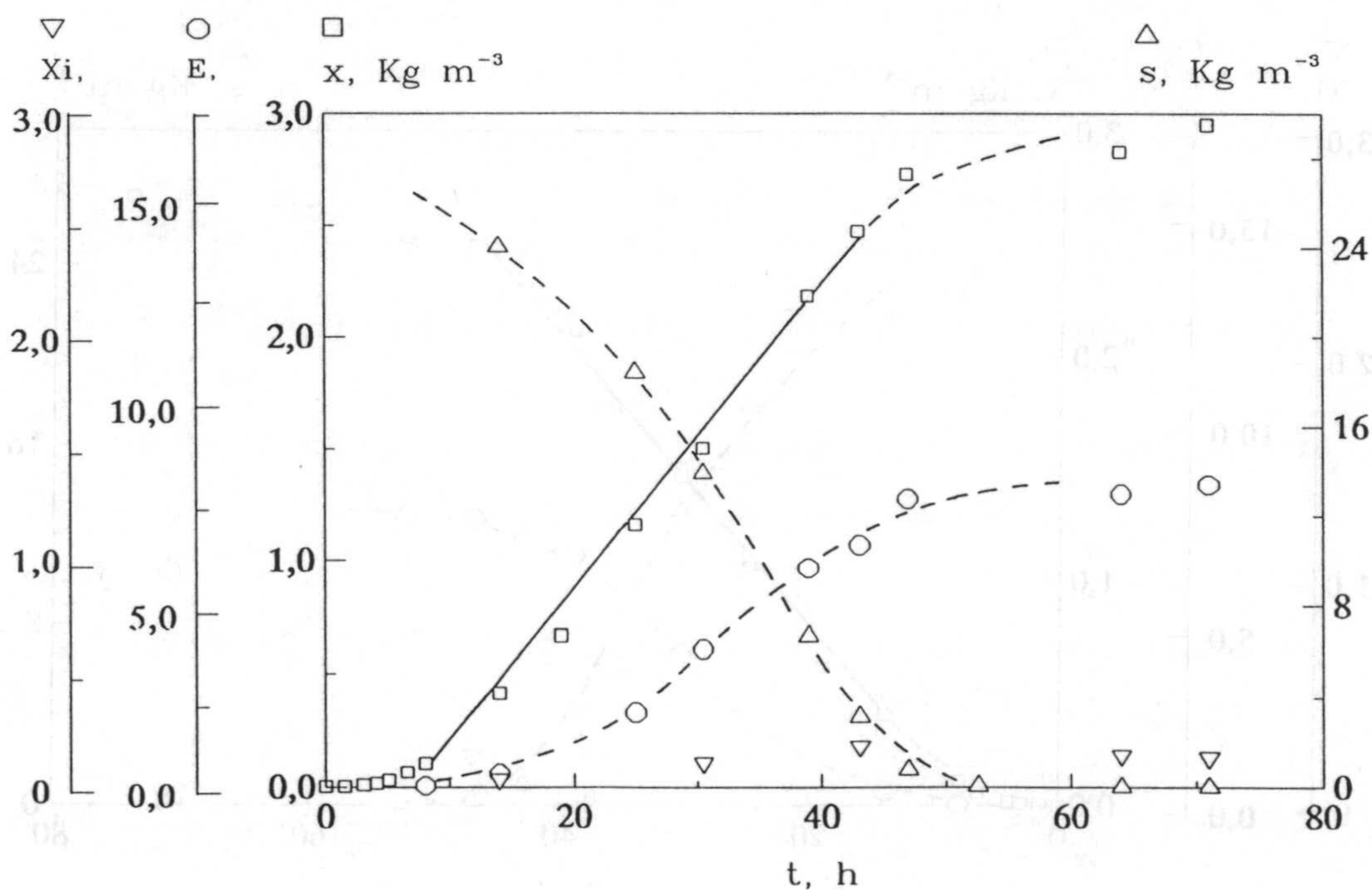


Fig. 4.54

TABLA 4.46

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
XILOSA RESIDUAL

EXPTO: Pi-P4

Q = 0,000 v/v/min

pH_i = 6,5

t, h	x, Kg·m ⁻³	s, Kg·m ⁻³	E, Kg·m ⁻³	Xi, Kg·m ⁻³
0,0	0,004			
1,5	0,008			
3,0	0,017			
4,0	0,025			
5,0	0,044			
6,0	0,066			
7,0	0,086			
8,0	0,130			
13,0	0,339	23,68	0,536	
20,0	0,763	21,61	1,254	0,11
25,0	1,048	18,88	2,328	
30,0	1,476	14,59	3,277	0,16
36,0	2,089	9,88	4,430	
45,0	2,584	2,41	7,345	0,26
53,0	2,913	0,34	9,097	0,28
80,0	3,229	0,14		
102,0	3,314			

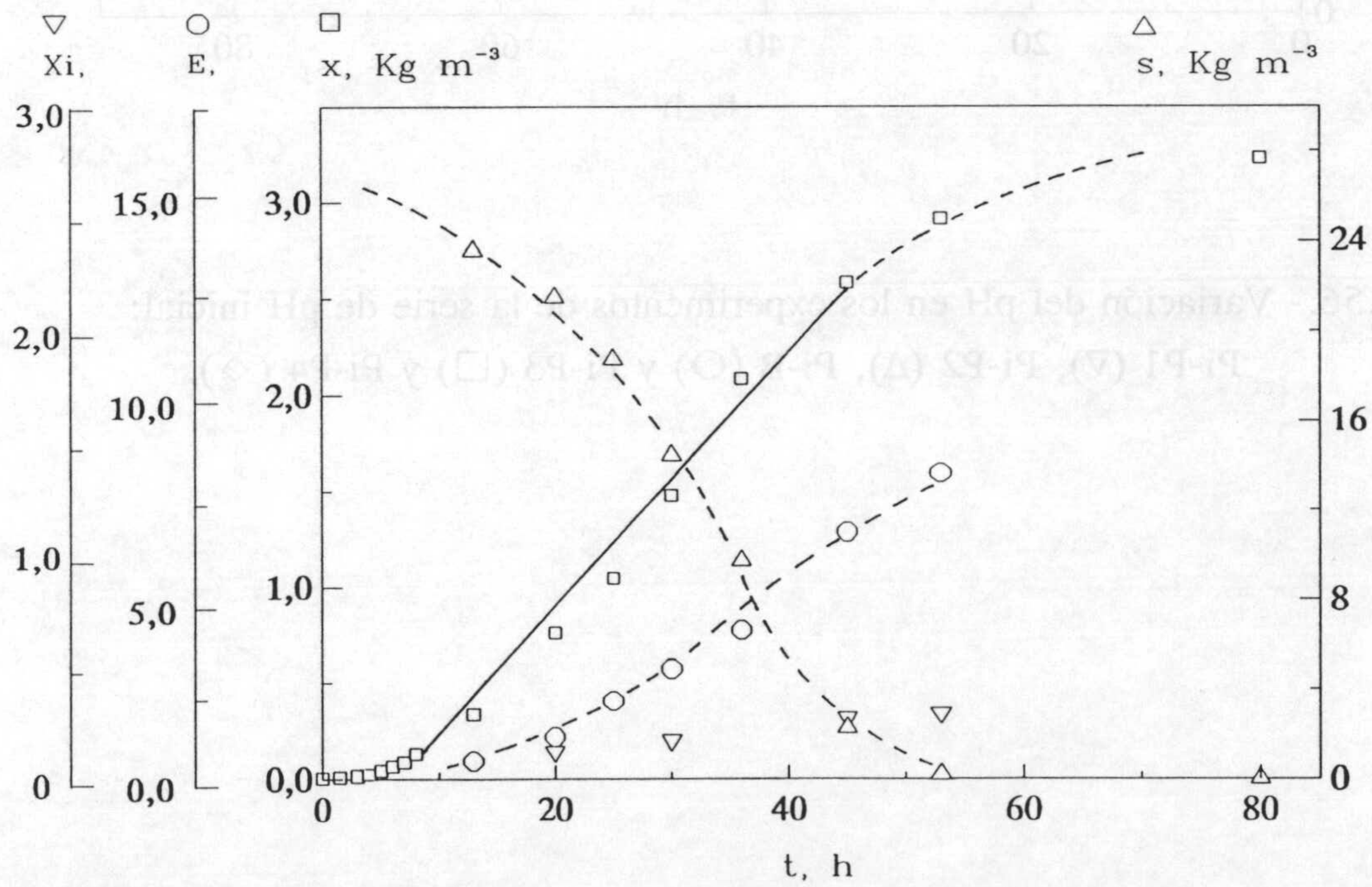


Fig. 4.55

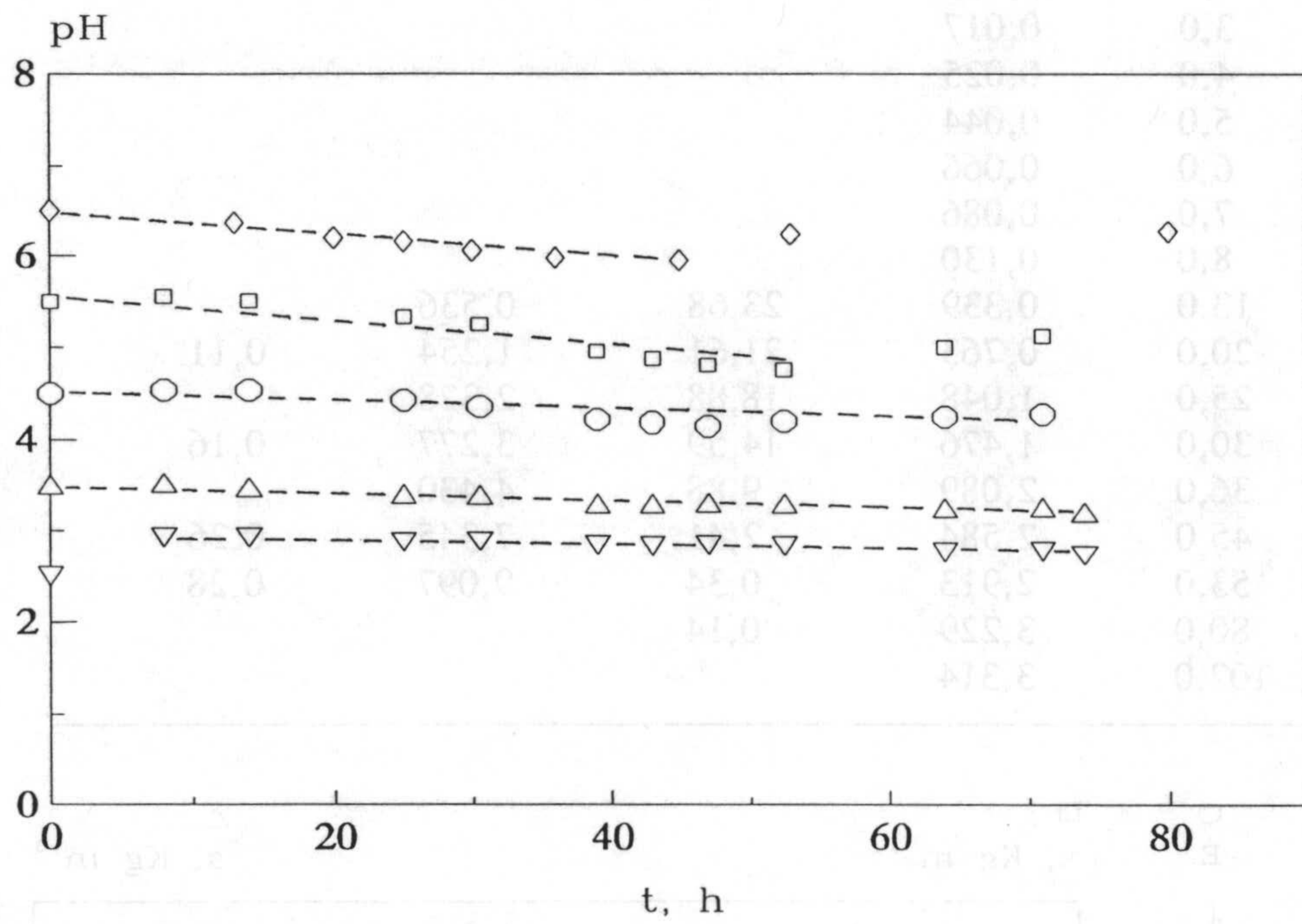


Fig. 4.56.- Variación del pH en los experimentos de la serie de pH inicial: Pi-P1 (▽), Pi-P2 (Δ), Pi-B (○) y Pi-P3 (□) y Pi-P4 (◇).

4.4.3 Influencia de la composición del medio de cultivo. Mezclas xilosa-glucosa

El estudio de la influencia de la composición del medio de cultivo, en cuanto a la proporción de xilosa y glucosa en el mismo, se ha llevado a cabo mediante los experimentos de la serie Pi-M, en la que se han empleado las siguientes concentraciones de ambos azúcares:

$s_o, \text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$:	24	20	15	10	5	1	0	0
$g_o, \text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$:	1	5	10	15	20	24	25	0

El pH inicial se ha mantenido en 4,5 y el caudal de aire ha sido el aportado exclusivamente por el vórtice de agitación ($Q = 0,0 \text{ v/v/min}$).

Los resultados experimentales obtenidos en esta serie se recogen en las Tablas 4.47 a 4.54. Las Figuras 4.57 a 4.64 muestran la variación con el tiempo de las concentraciones de sustrato residual y de biomasa, etanol y xilitol producidos.

En la Figura 4.65 se muestra la evolución del pH en el transcurso de los cultivos. Los experimentos con mayor proporción de xilosa están representados, en cuanto a esta variable, en la parte a) de esta Figura, en la que se observa que el pH permanece prácticamente constante durante todo el experimento e independiente de la proporción de azúcares empleada.

La Figura 4.65.b corresponde a los cultivos con mayor proporción de glucosa, donde nuevamente no se observa influencia significativa de la mezcla; por contra, existe un mayor descenso del pH en comparación con los restantes experimentos de la serie, fundamentalmente hasta tiempos de cultivo próximos a 30 horas, manteniéndose prácticamente constante a partir de ese momento. Este hecho podría ser debido a la aparición de fenómenos inhibitorios por la elevada concentración de etanol presente en el medio de cultivo a estos tiempos de experimento, que corresponden, por otra parte, al consumo total de glucosa.

TABLA 4.47

**PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO RESIDUAL**

EXPTO: Pi-M1 $\text{pH}_i = 4,5$ $Q = 0,000 \text{ v/v/min}$

$s_0 = 24 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $g_0 = 1 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	g, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	X_i , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,005				
1,0	0,011				
2,0	0,013				
3,0	0,019				
4,0	0,033				
5,5	0,067			0,009	
7,0	0,133				
8,0	0,220				
9,0	0,336	24,80	0,02	0,334	0,03
10,0	0,386				
12,0	0,484	24,25	0,01	0,674	
14,0	0,550				
16,0	0,769	22,32		1,401	
22,5	1,247	16,85		2,893	0,05
26,0	1,624	13,26		4,836	
30,5	2,159	8,41		6,837	
34,0	2,645	4,76		8,701	0,15
38,0	2,913	0,76		9,605	
46,0	2,961	0,21		10,170	0,16
51,0	3,107	0,21		9,584	

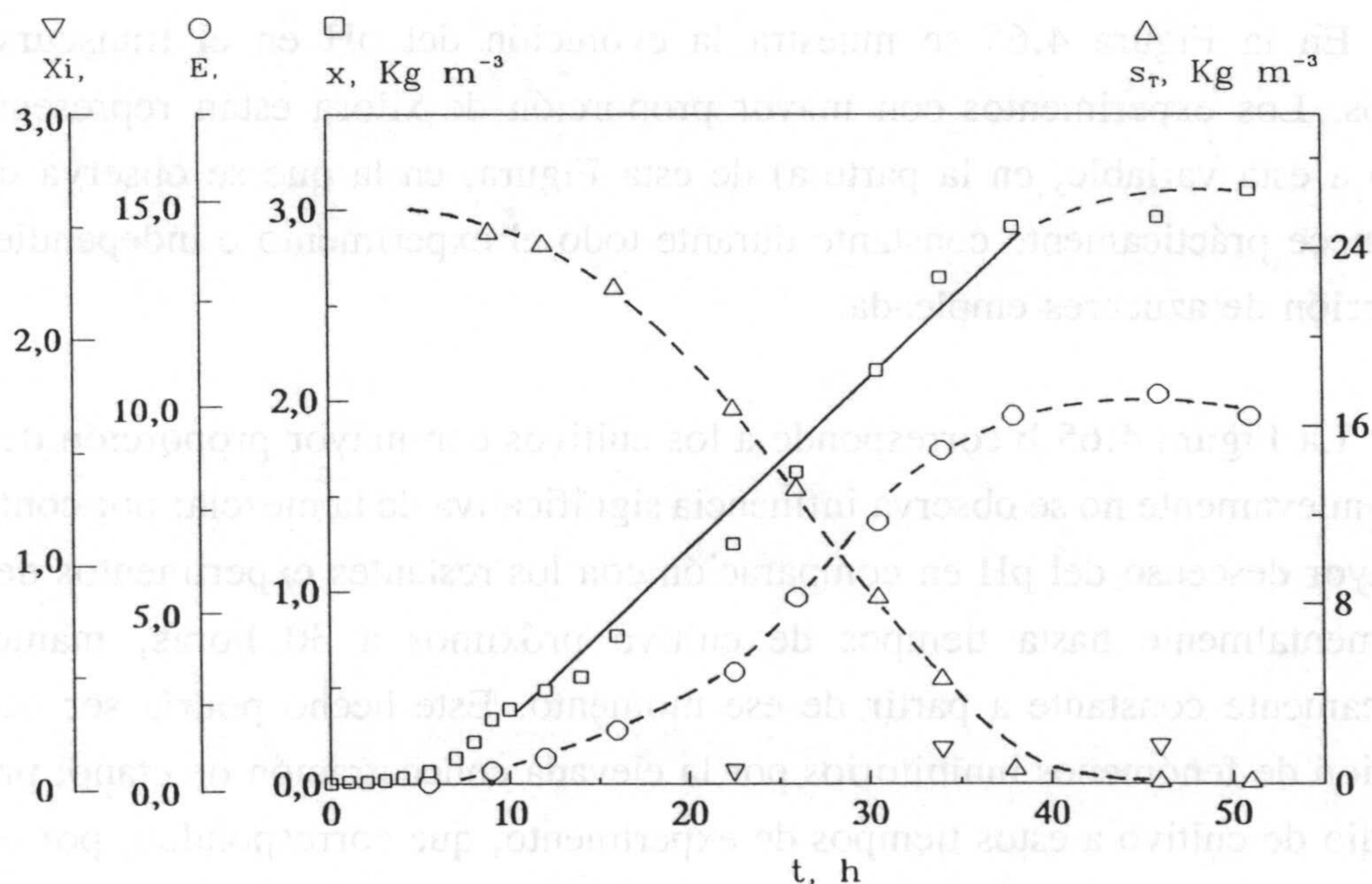


Fig. 4.57

TABLA 4.48

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SISTRATO RESIDUAL

EXPTO: Pi-M2 $pH_i = 4,5$ $Q = 0,000 \text{ v/v/min}$

$s_0 = 20 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $g_0 = 5 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	g, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	X_i , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,005				
1,0	0,007				
2,0	0,011				
3,0	0,019				
4,0	0,034				
5,5	0,078	24,97		0,008	
7,0	0,149				
8,0	0,269				
9,0	0,415	23,70		0,417	0,02
10,0	0,546				
12,0	0,922	21,68	0,366	1,559	
14,0	1,104				
16,0	1,250	20,16	0,016	2,283	
22,5	1,685	15,56		3,706	0,20
26,0	1,916	13,00		5,153	
30,5	2,402	9,03		6,385	
34,0	2,949	5,53		7,628	0,32
38,0	3,132	2,00		9,266	
46,0	3,326	0,23		9,323	
51,0	3,314	0,22		9,763	0,33
57,0	3,411			9,153	

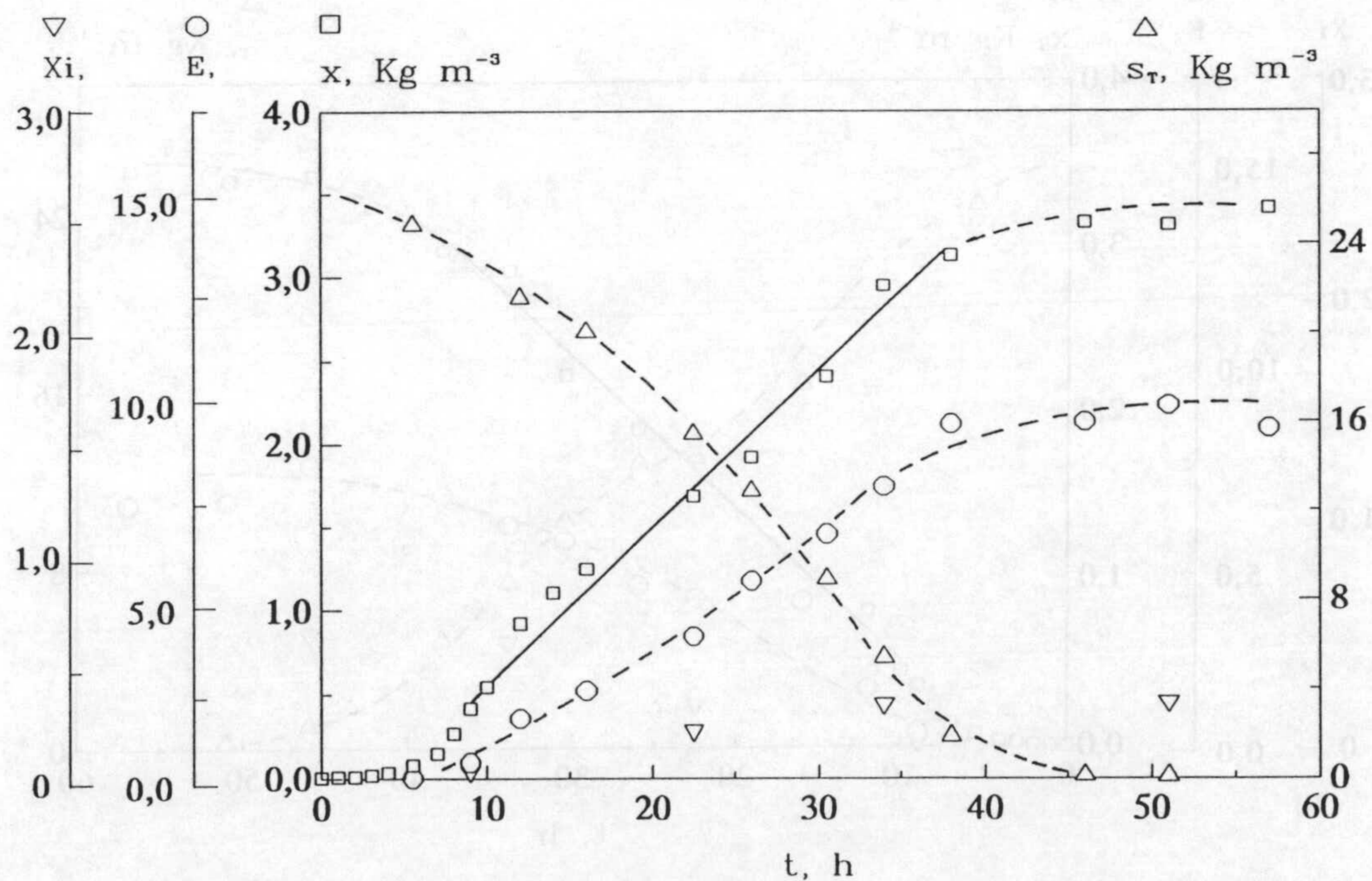


Fig. 4.58

TABLA 4.49

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO RESIDUAL

EXPTO: Pi-M3 $\text{pH}_i = 4,5$ $Q = 0,000 \text{ v/v/min}$

$s_0 = 15 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $g_0 = 10 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	g, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	X_i , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,002				
1,0	0,006				
2,0	0,009				
3,0	0,018				
4,0	0,032				
5,5	0,073	24,46		0,012	
7,0	0,136				
8,0	0,241				
9,0	0,367			0,400	0,01
10,0	0,461				
12,0	0,815	21,75		1,514	
16,0		16,39	0,51	3,797	
22,5	1,830	13,09	0,01	3,899	0,18
26,0	1,903	12,89		4,249	
30,5	2,232	10,27		5,424	
34,0	2,864	7,51		5,820	0,46
38,0	2,986	4,95		6,611	
46,0	3,436	1,13		7,402	0,50
51,0	3,411	0,39		6,464	
57,0	3,472			6,385	

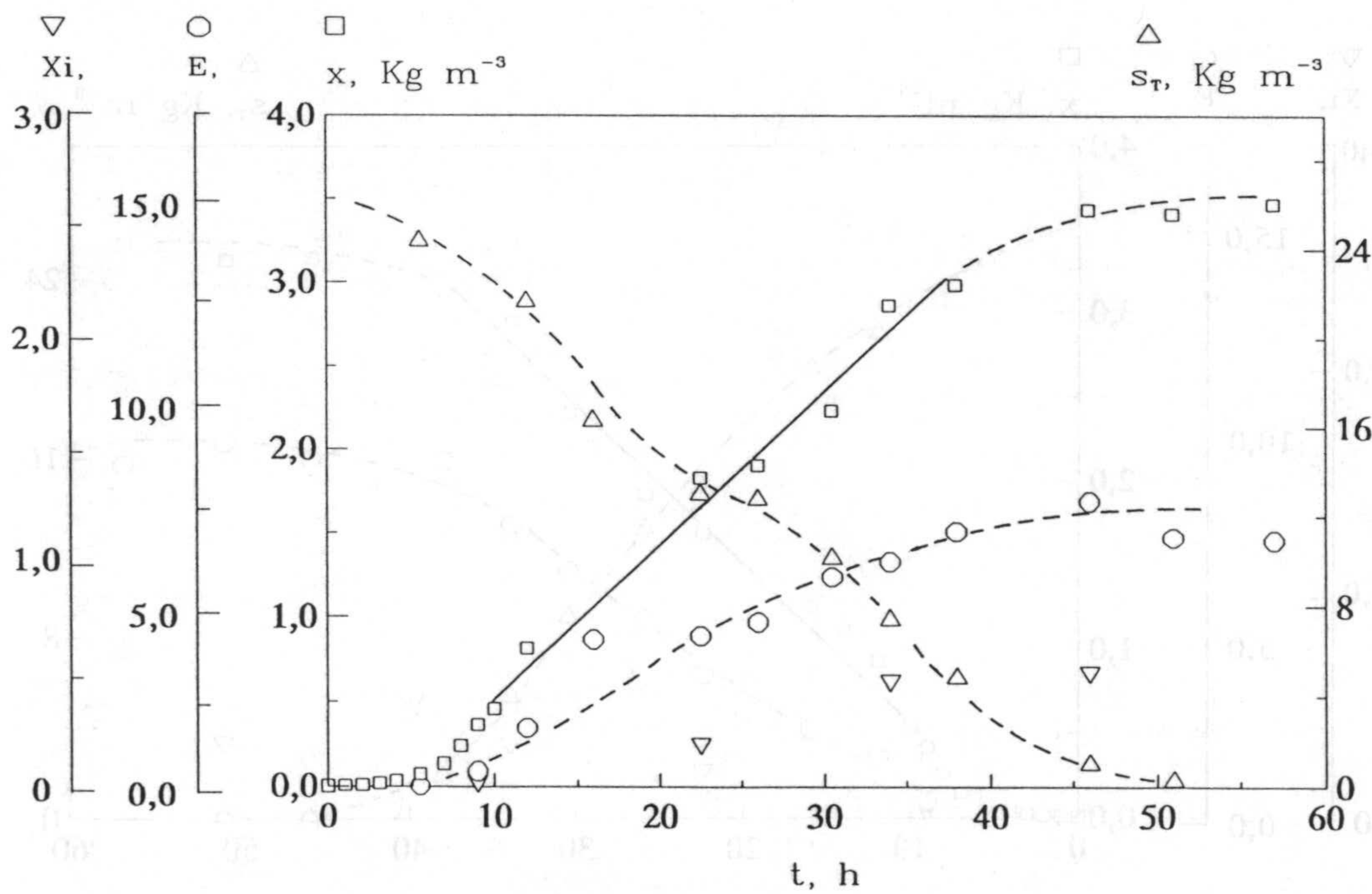


Fig. 4.59

TABLA 4.50

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SISTRATO RESIDUAL

EXPTO: Pi-M4 $\text{pH}_i = 4,5$ $Q = 0,000 \text{ v/v/min}$

$s_0 = 10 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $g_0 = 15 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	g, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	X_i , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,008				
1,0	0,011				
2,0	0,013				
3,0	0,020				
4,0	0,027	24,00			
5,0	0,042				
6,0	0,067			0,012	
7,0	0,078				
8,0	0,144	22,65		0,112	0,01
9,0	0,274	21,91		0,262	
10,0	0,353			0,396	
11,0	0,551			0,616	
13,0	0,901	20,27		0,668	
15,0	1,374	18,66	8,55	1,728	0,03
19,0	1,925	13,20	2,03	3,708	0,16
21,0	2,496	10,62		4,995	0,20
23,0	2,600	10,15	0,02	4,701	
26,0	2,438	9,30	0,01	4,249	
30,0	2,475	8,82			
32,0	2,414	7,68		4,497	
34,0	2,560	7,85			0,32
46,0	3,375	3,01		4,012	
50,0	3,387	1,67		3,673	0,48
54,0	3,423	0,91		3,096	0,53
71,0	3,533	0,28			

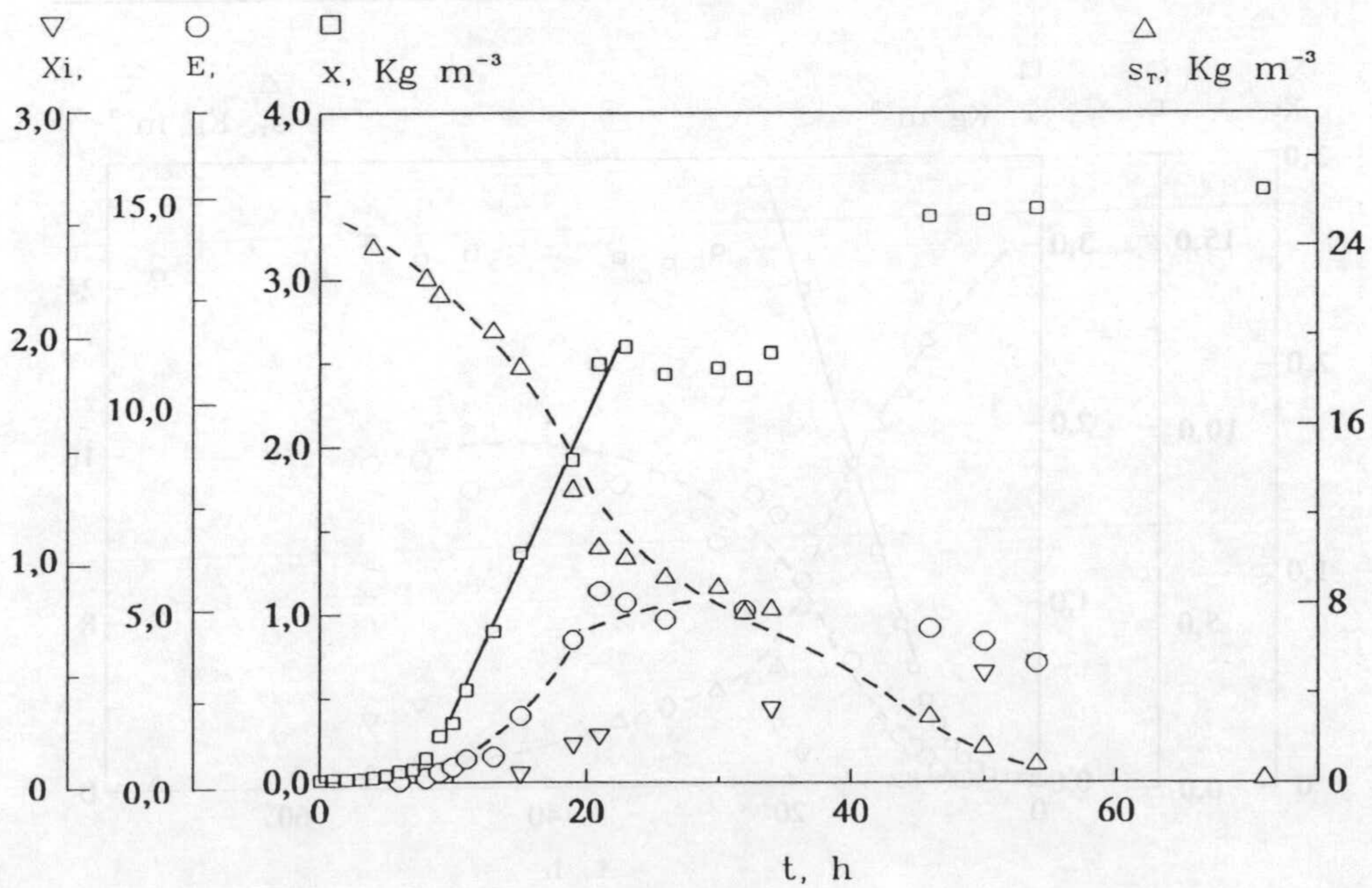


Fig. 4.60

TABLA 4.51

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO RESIDUAL

EXPTO: Pi-M5 $pH_i = 4,5$ $Q = 0,000 \text{ v/v/min}$

$s_0 = 5 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $g_0 = 20 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	g, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	X_i , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,013				
1,0	0,019				
2,0	0,022				
3,0	0,035				
4,0	0,056			0,010	
5,0	0,090				
6,0	0,141			0,086	
7,0	0,212				
8,0	0,331	22,32		0,387	
9,0	0,473	21,25	17,62	0,774	
10,0	0,646			1,006	
11,0	0,888	18,83		1,333	0,01
13,0	1,306	17,22		1,589	
15,0	1,791	14,85	10,54	3,432	0,05
19,0	2,767	8,54	3,67	5,695	0,14
21,0	3,363	5,72		7,548	0,28
23,0	3,375	5,17	0,05	8,091	
26,0	2,986	4,59		6,780	
30,0	2,913	4,02	0,04		0,35
32,0	2,840	3,36			
34,0	2,949	3,20		8,419	
46,0	2,973	1,84		8,317	
50,0	2,949	1,41		9,153	0,39
54,0	3,060	0,84		9,040	0,32
58,0	2,864				
71,0	2,876	0,34			

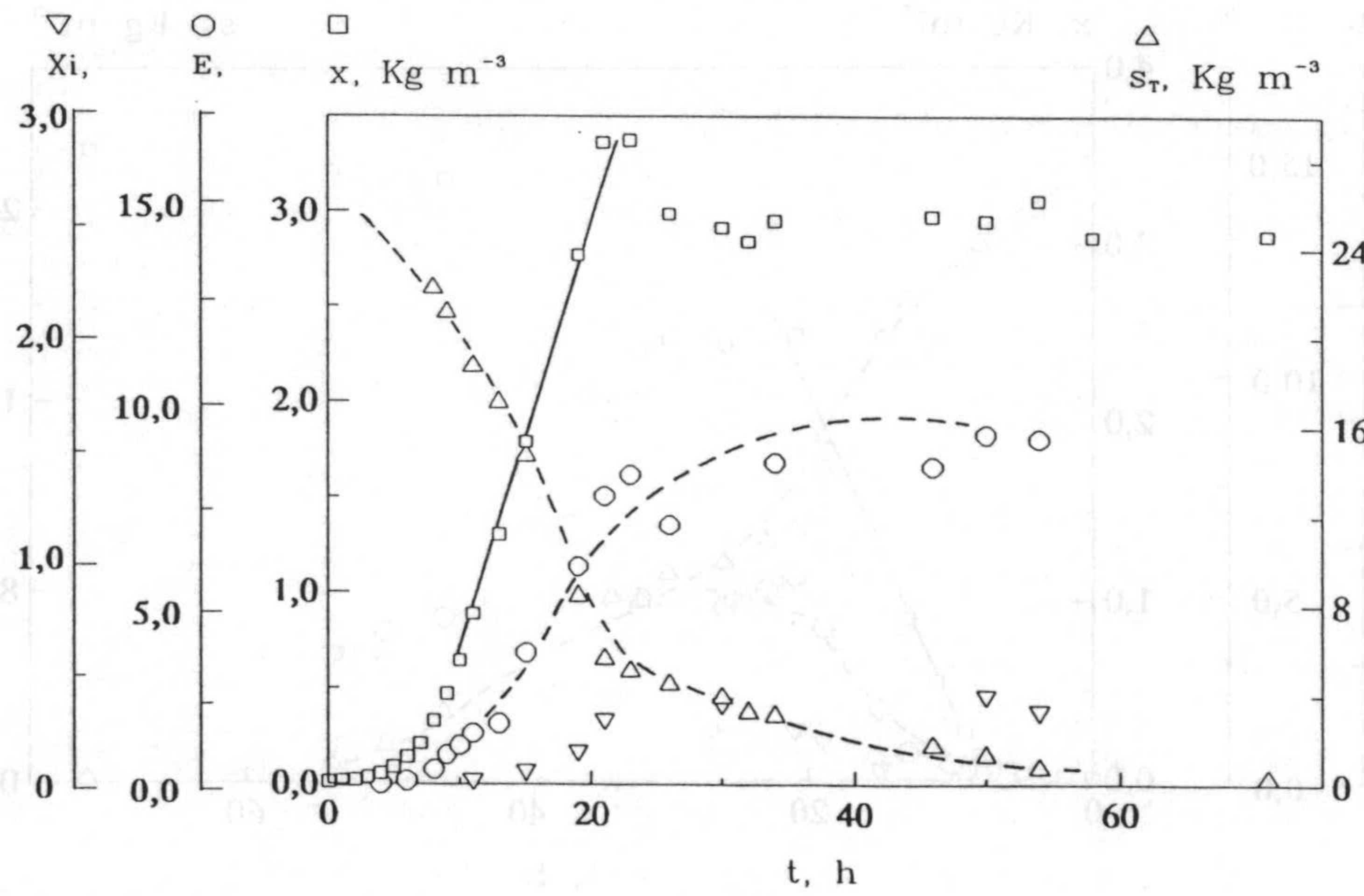


Fig. 4.61

TABLA 4.52

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SISTRATO RESIDUAL

EXPTO: Pi-M6 $\text{pH}_i = 4,5$ $Q = 0,000 \text{ v/v/min}$

$s_0 = 1 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $g_0 = 24 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	g, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	X_i , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,010				
1,0	0,014				
2,0	0,019				
3,0	0,033				
4,0	0,054			0,010	
5,0	0,088				
6,0	0,132			0,108	
7,0	0,195				
8,0	0,307			0,390	0,02
9,0	0,512	18,91		0,768	
10,0	0,600			1,044	
11,0	0,757	18,63	17,45	1,316	0,02
13,0	1,151	14,67		2,300	
15,0	1,590	15,05	14,94	2,948	0,04
19,0	2,570	8,72	8,10	5,206	0,15
21,0	3,168	5,68		6,893	
23,0	3,496	2,21	1,00	8,753	0,30
26,0	3,277	1,42	0,00	8,532	
27,0	3,253				
28,5	3,290	1,19			0,41
30,0	3,156	0,96		9,402	
32,0	3,132	0,72		10,034	0,50
34,0	2,998	0,43		9,153	
46,0	3,132	0,29		9,402	0,39

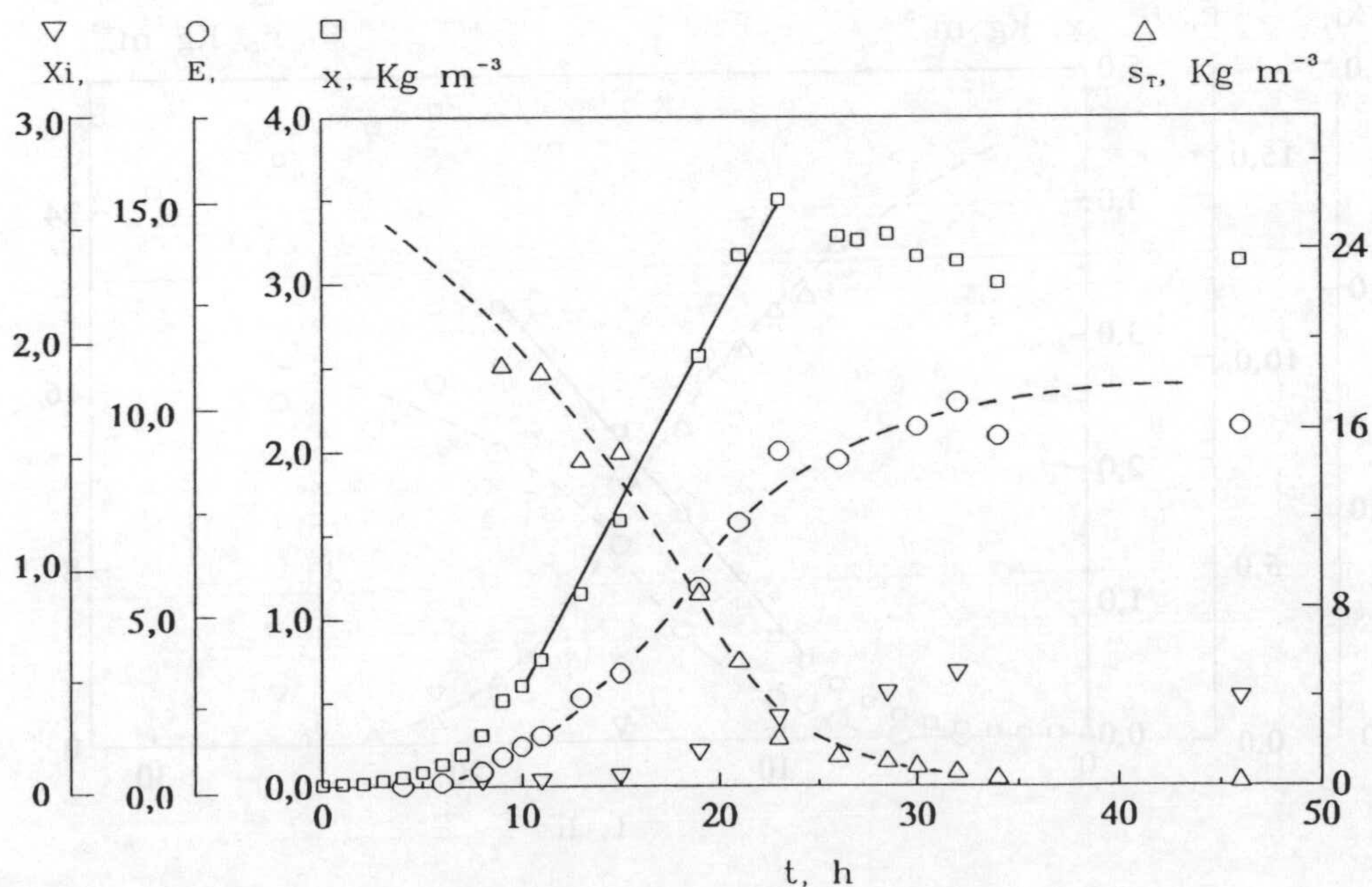


Fig. 4.62

TABLA 4.53

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO RESIDUAL

EXPTO: Pi-M7 $\text{pH}_i = 4,5$ $Q = 0,000 \text{ v/v/min}$

$s_0 = 0 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $g_0 = 25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	g, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	X_i , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,012				
1,0	0,021				
2,0	0,022				
3,0	0,036				
4,0	0,062			0,006	
5,0	0,105				
6,0	0,168	23,23	21,51	0,040	
7,0	0,265				
8,0	0,406	22,16		0,413	
9,0	0,575	19,98	19,59	0,893	
10,0	0,765	19,30		1,051	0,01
11,0	1,029	17,56		1,582	
13,0	1,690	14,08		2,870	
15,0	2,326	12,13	11,25	5,160	0,07
19,0	3,265	2,84		7,601	
21,0	4,749	1,01		9,436	0,22
23,0	4,615	0,32		8,292	
26,0	4,384			8,984	0,23
30,0	4,141				

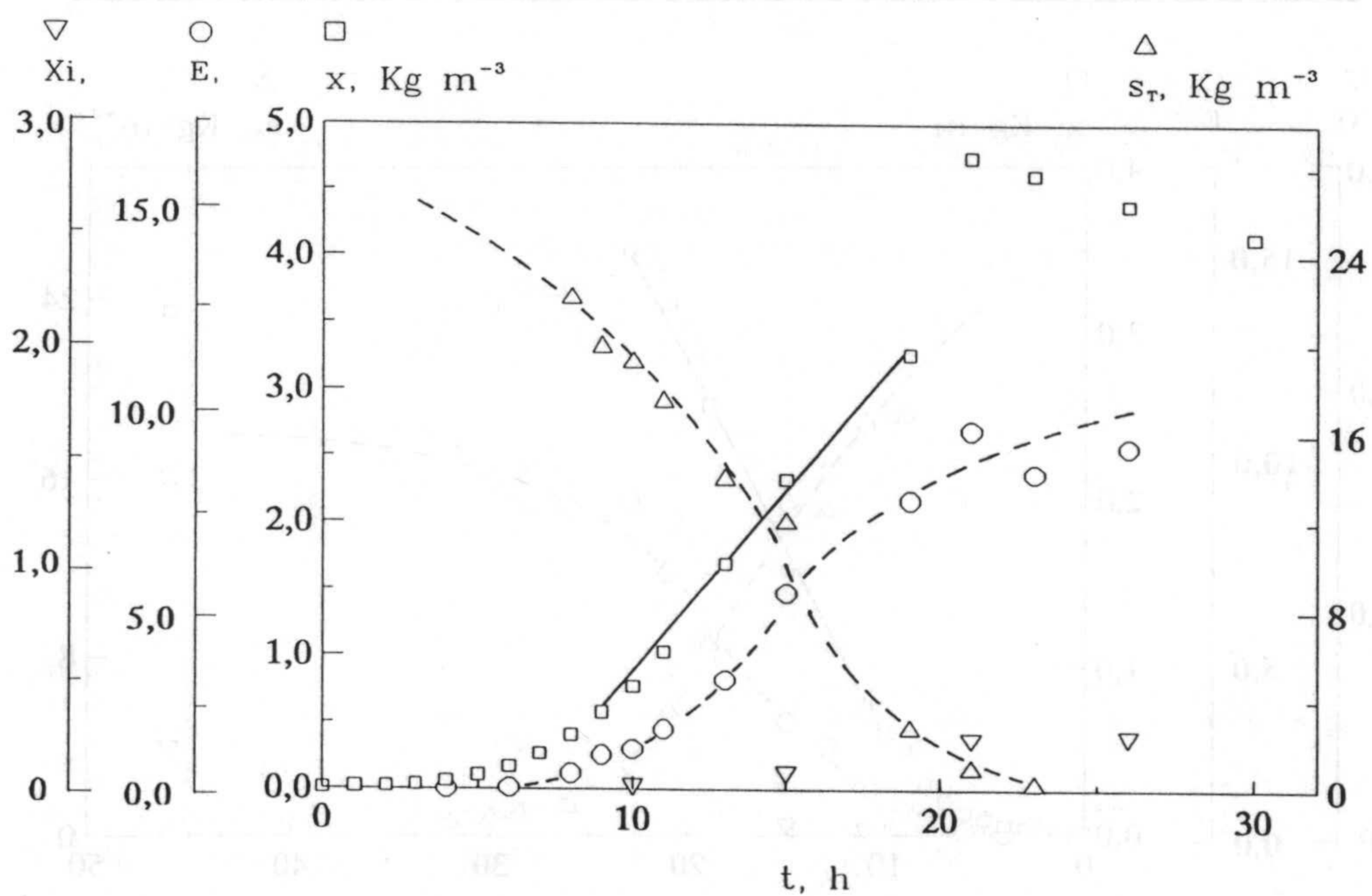


Fig. 4.63

TABLA 4.54

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
SUSTRATO RESIDUAL

EXPTO: Pi-M8 $\text{pH}_i = 4,5$ $Q = 0,000 \text{ v/v/min}$

$s_0 = 0 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $g_0 = 0 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$

t, h	x, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	s_T , $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$	E, $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
0,0	0,005		
1,0	0,008		
2,0	0,013		
3,0	0,015		
4,0	0,018		
5,5	0,033		
7,0	0,053		
8,0	0,076		
9,0	0,084	0,11	0,004
10,0	0,113		
12,0	0,166	0,18	
14,0	0,207		
16,0	0,296		
22,5	0,421		
26,0	0,470		
30,5	0,609		
34,0	0,697		
38,0	0,784		
46,0	0,916		
51,0	1,008		
57,0	1,071	0,11	0,009

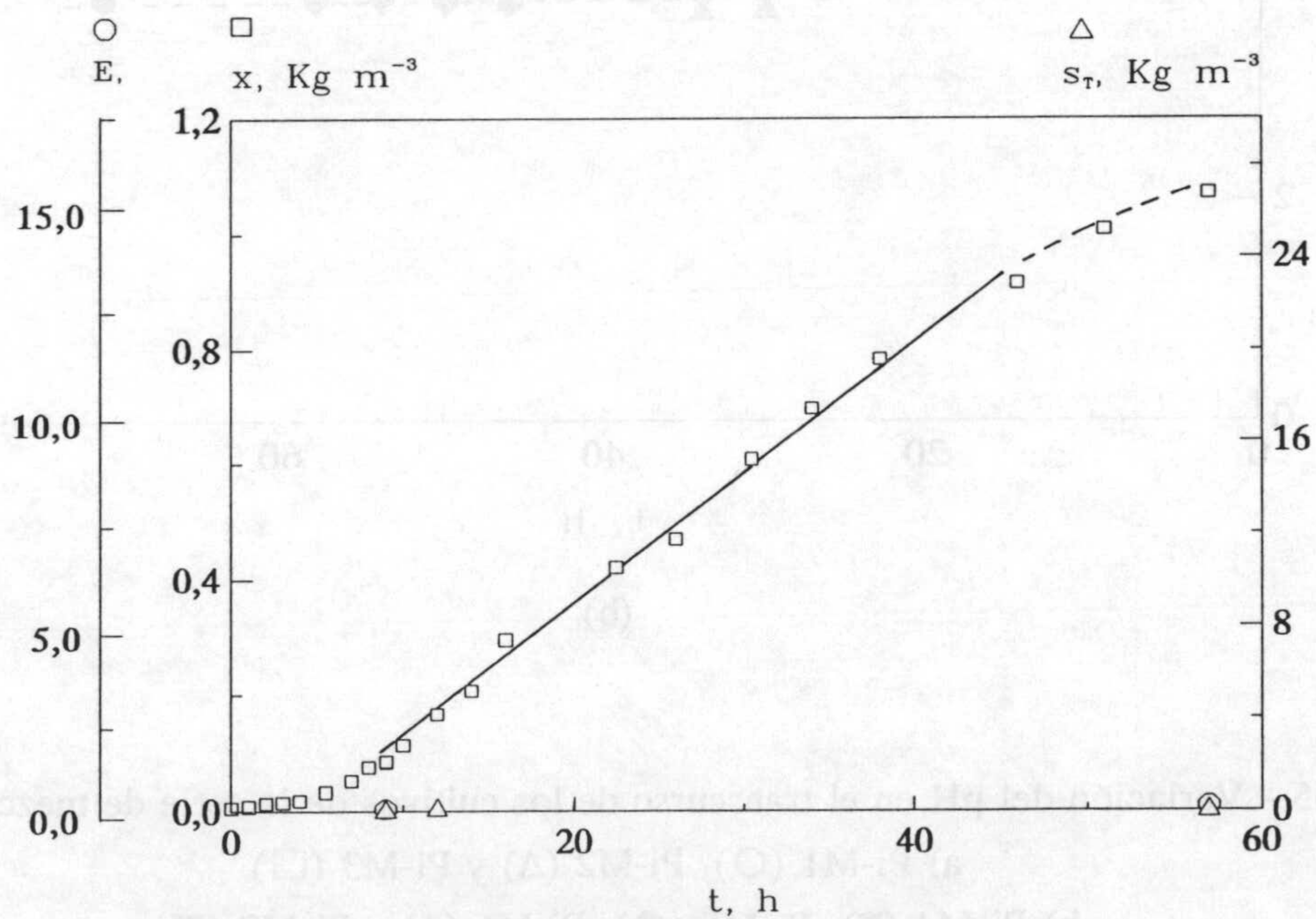
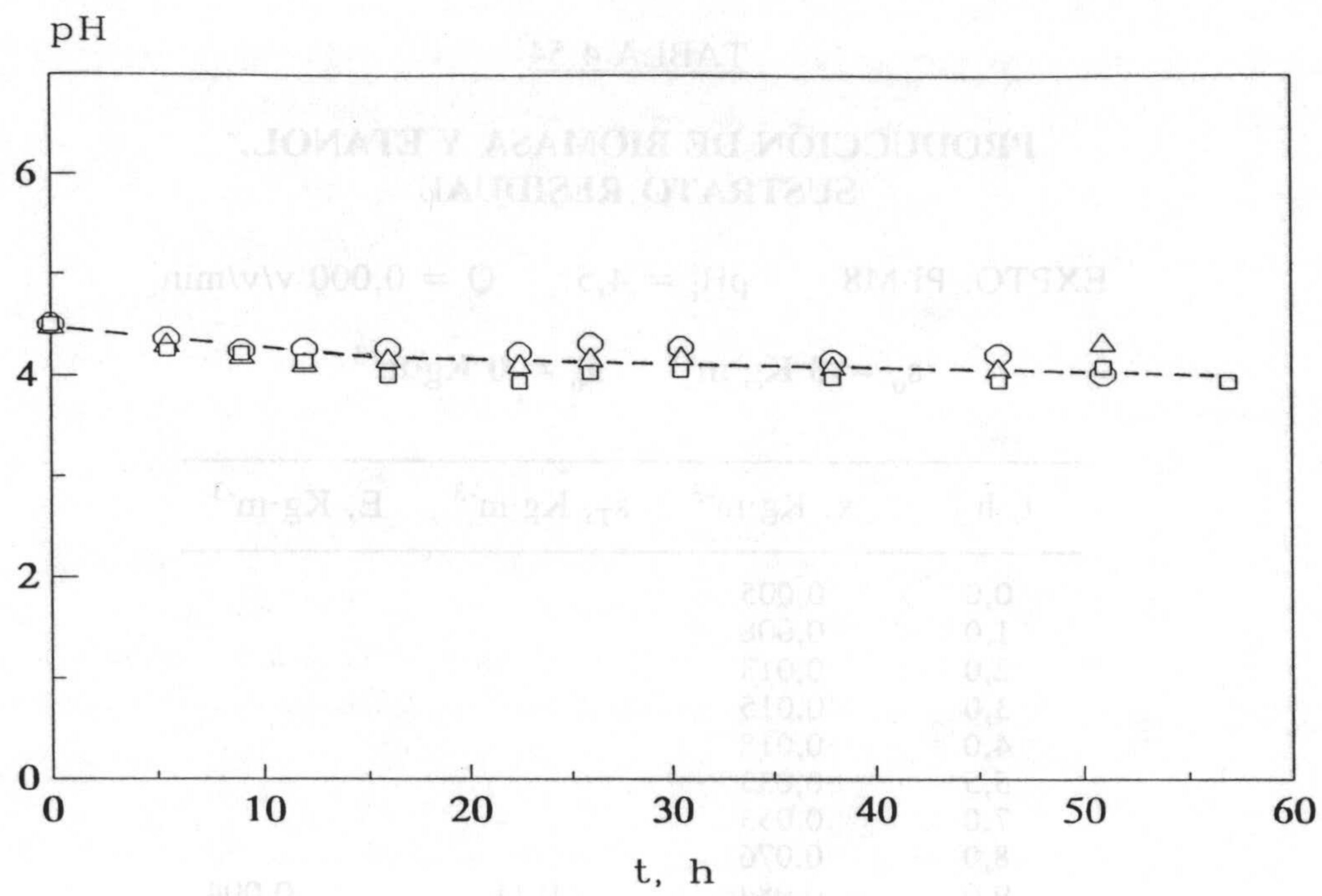
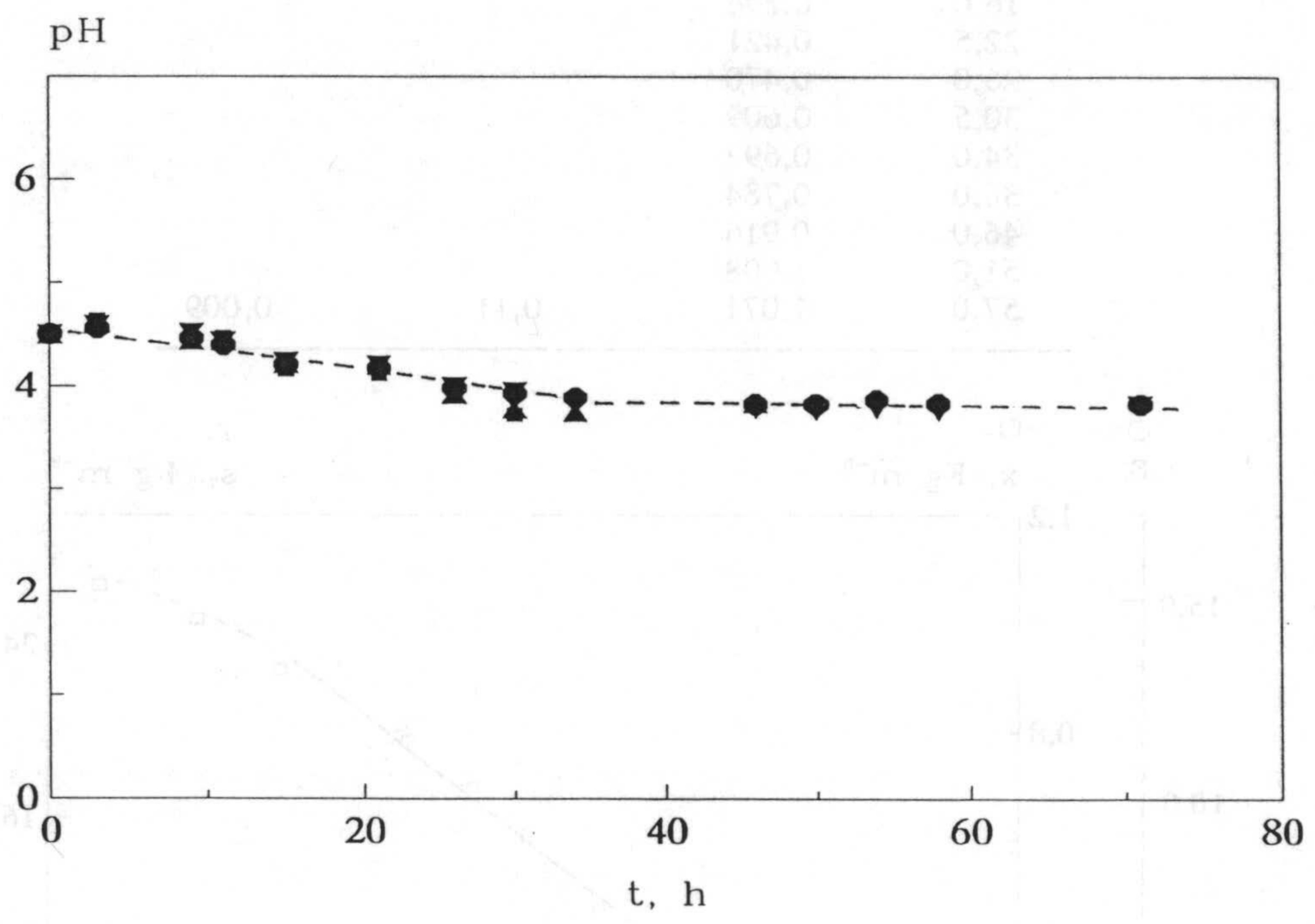


Fig. 4.64

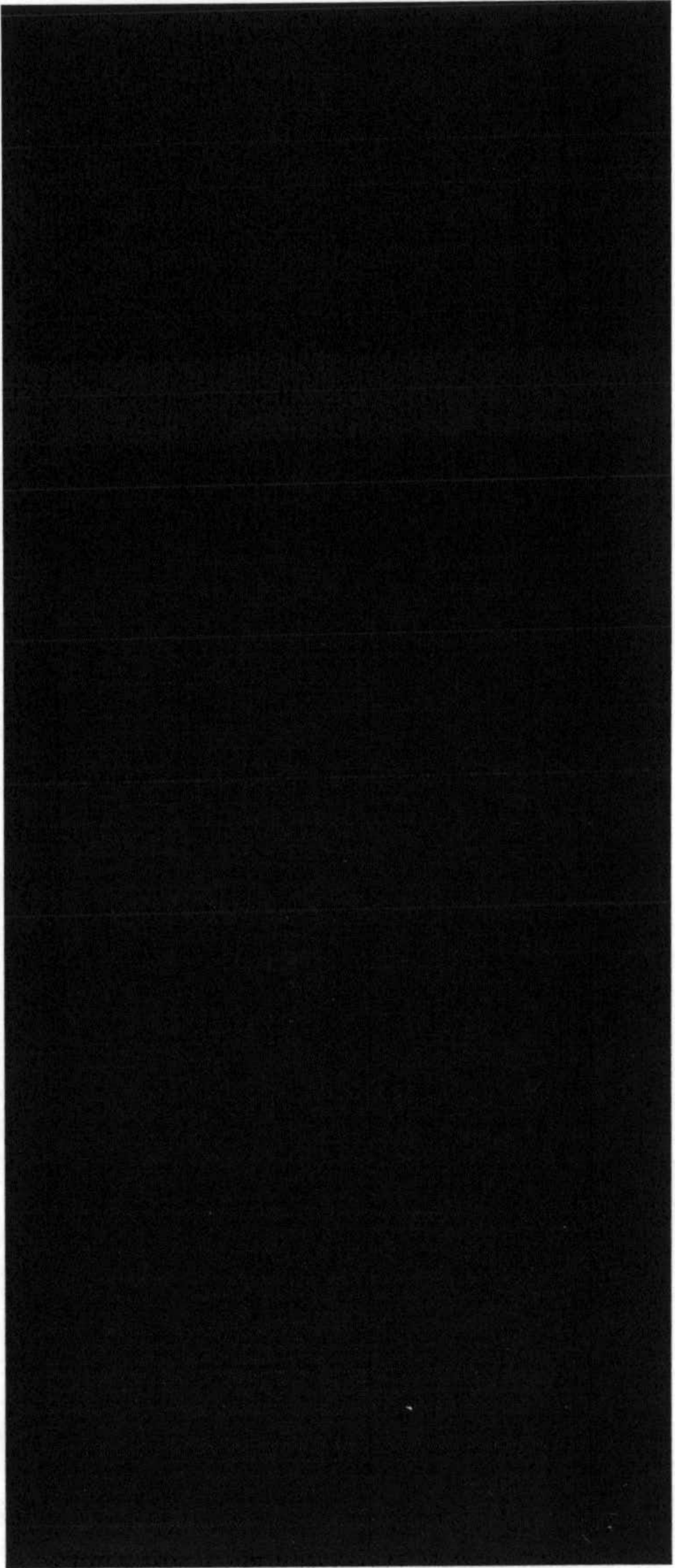


(a)

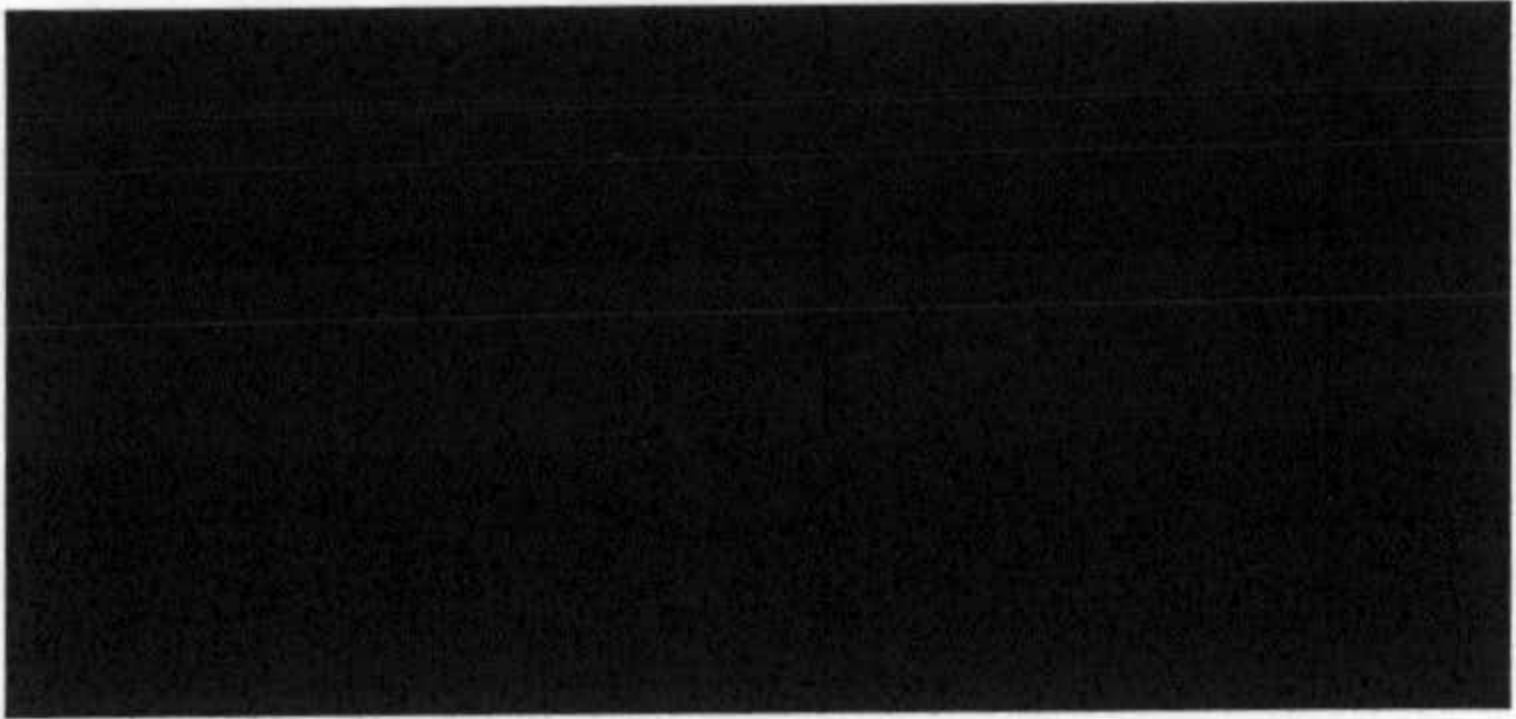


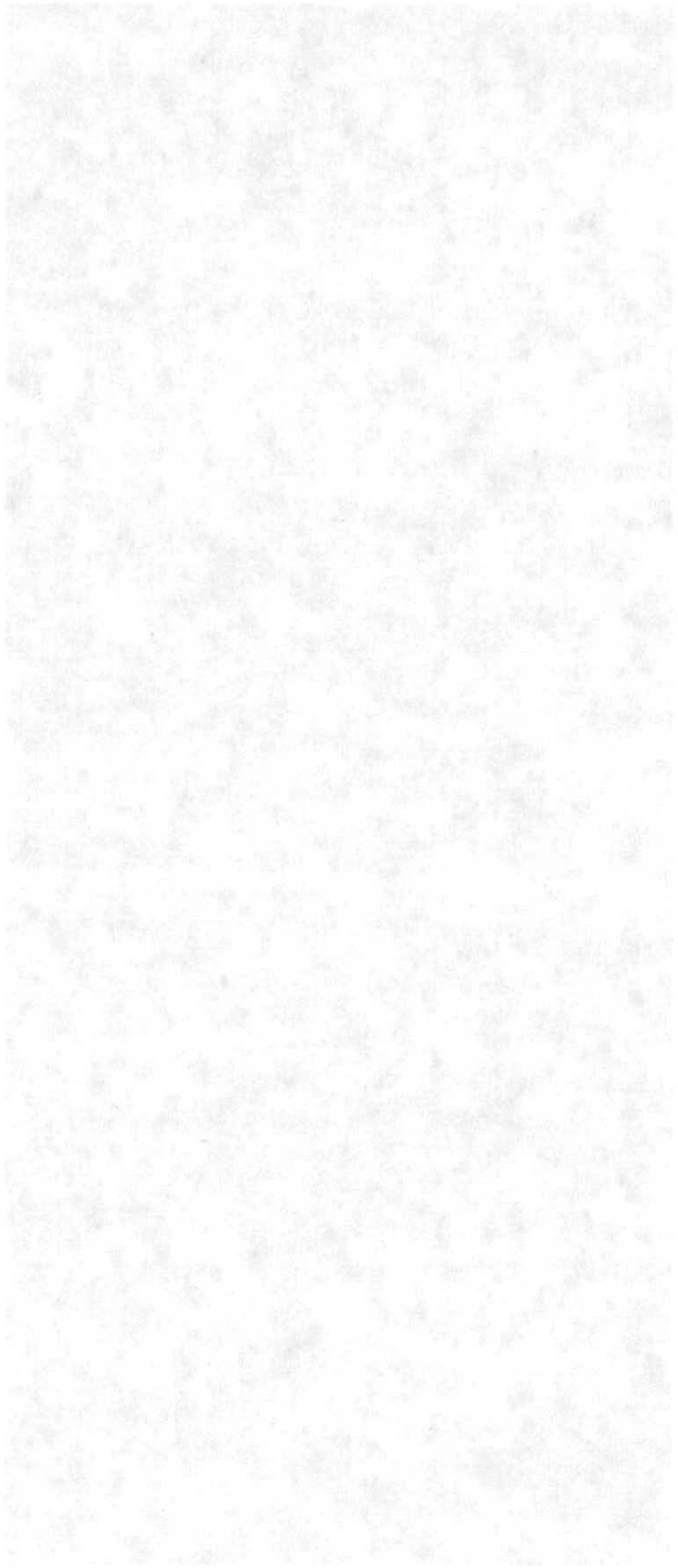
(b)

Fig. 4.65.- Variación del pH en el transcurso de los cultivos de la serie de mezclas:
 a) Pi-M1 (○), Pi-M2 (△) y Pi-M3 (□)
 b) Pi-M4 (▼), Pi-M5 (●), Pi-M6 (▲) y Pi-M7 (■).



5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS





2011年11月11日



5.1 PARÁMETROS CINÉTICOS Y DE RENDIMIENTOS

El estudio de la fermentación con las levaduras ensayadas se ha centrado en la modificación de dos variables de operación: nivel de aireación suministrado y pH inicial del medio de cultivo y en el empleo de disoluciones de xilosa y glucosa (excepto para el caso de *Hansenula polymorpha*).

Con estas variables se ha analizado, en el transcurso de los experimentos, la formación de biomasa, el sustrato residual y la formación de bioproductos mayoritarios, etanol y xilitol. Este último no se determinó en los cultivos con *Pachysolen tannophilus*.

5.1.1 Velocidades específicas de crecimiento

Una vez realizada la inoculación en un biorreactor discontinuo, el número de células viables varía con el tiempo; el crecimiento comienza con una "fase lag" o de latencia, durante la cual el microorganismo adapta los sistemas enzimáticos para metabolizar el nuevo sustrato, pero no se desarrolla. En general, la duración de esta fase depende de la magnitud de las diferencias entre las condiciones del inóculo y las del medio. Posteriormente, tiene lugar un rápido crecimiento donde el número de células aumenta exponencialmente con el tiempo. Esta etapa, llamada fase de crecimiento exponencial, puede ser cuantificada por la ecuación:

$$x = x_I \exp(\mu_m \cdot t) \quad [5.1]$$

donde x_I corresponde a la concentración de biomasa al inicio de la fase exponencial. Esta ecuación se puede expresar de la forma:

$$\ln(x/x_I) = \mu_m \cdot t \quad [5.2]$$

con lo que una representación de los valores del primer miembro frente al tiempo debe conducir a una línea recta que pasa por el origen de coordenadas, de cuya pendiente puede evaluarse el valor de la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m . Sin embargo, puesto que x_1 no es un valor previamente conocido, la ecuación [5.2] suele modificarse según:

$$\ln(x/x_0) = a + \mu_m \cdot t \quad [5.3]$$

donde se ha sustituido la concentración de biomasa al inicio de la fase exponencial por la correspondiente al inicio del experimento, x_0 , que sí es conocida a priori, con lo que aparece una ordenada en el origen no nula, a . Si la fase lag o de adaptación fuese totalmente despreciable, x_1 tendería a x_0 y por lo tanto a sería nula.

Naturalmente, en una fermentación discontinua el número de células no puede aumentar indefinidamente, por lo tanto, a la fase de crecimiento exponencial sigue una fase de desaceleración, en la que algún nutriente del medio de cultivo empieza a limitar el crecimiento. Con frecuencia, en esta fase puede admitirse un crecimiento lineal durante un intervalo de tiempo relativamente amplio, de forma que puede caracterizarse por:

$$x = c + b \cdot t \quad [5.4]$$

donde b representa la productividad en biomasa ($\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) durante ese período de tiempo.

Este período de comportamiento lineal, posterior a la fase de crecimiento exponencial, es observable en los datos proporcionados por diferentes autores, Jeffries (1982) y Detroy y col. (1982), siendo característica de las fermentaciones cinéticamente controladas por etapas de naturaleza física. Así, se ha determinado por Slininger y col. (1982) que en la fermentación de disoluciones de xilosa con *Pachysolen tannophilus* la concentración de oxígeno disuelto, incluso cuando se airea el medio de cultivo, se anula rápidamente, aproximadamente al final de la fase exponencial, por lo que el crecimiento

celular llega a estar limitado por la disponibilidad de oxígeno en el medio de forma que el control cinético reside en la transferencia de oxígeno en la suspensión de células.

La fase de desaceleración es seguida por la fase estacionaria, en la que el nivel de biomasa alcanzado es máximo y prácticamente constante durante un intervalo de tiempo determinado. Esta estabilización puede ser debida a varios factores.

En primer lugar, puede que se agote el sustrato u otros nutrientes necesarios para el crecimiento; en tal caso, se produce un período de metabolismo endógeno, en el que las células metabolizan su propio protoplasma para mantenerse vivas. También es posible que el crecimiento disminuya y se detenga debido al aumento de la concentración en el medio de algún inhibidor. Por último, y éste es el caso más frecuente, es posible que las velocidades de crecimiento y de muerte del microorganismo se contrarresten durante un cierto tiempo.

En este último caso, la lisis de las células muertas libera carbohidratos, aminoácidos y otros componentes que pueden ser usados por las células activas para mantener su población, aunque la biomasa no puede sustentarse a sí misma indefinidamente, por lo que la fase estacionaria suele ser, en tal caso, de duración relativamente reducida.

Finalmente, sucede una fase de muerte, durante la cual el número de células que mueren en la unidad de tiempo es superior al de las que se generan, detectándose un descenso neto de la población microbiana. En esta investigación se daban por concluidos los experimentos en la fase estacionaria, antes de iniciarse la fase de muerte, puesto que el sustrato ya se ha consumido y los bioproductos se han formado en su máxima concentración.

Con frecuencia se ha observado que, una vez consumido el sustrato (xilosa y/o glucosa), el propio bioproducto formado disminuía su concentración con el tiempo, lo cual indica que éste era consumido por las células viables; es decir, que durante parte de la fase estacionaria, el sustrato utilizado por la levadura era el bioproducto de la fermentación.

5.1.2 Velocidad específica de consumo de sustrato

Para determinar la velocidad específica de consumo de sustrato, q_s , se ha aplicado el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos. Como es conocido, la velocidad de consumo de sustrato se define por:

$$q_s = \frac{1}{x} \frac{d(s_0 - s)}{dt} \quad [5.5]$$

por lo que para su determinación directa por el método diferencial es necesario evaluar la velocidad de consumo de sustrato por unidad de volumen (tasa volumétrica de consumo de sustrato, $d(s_0 - s)/dt$) a cada tiempo y posteriormente dividir por la concentración de biomasa, x . La dificultad intrínseca de un método diferencial reside en la evaluación de esta derivada; aunque se podría aplicar un método gráfico, cuando el número de puntos experimentales no es muy elevado, el trazado de la curva $(s_0 - s)$ es dificultoso y la precisión en la evaluación de la pendiente es pequeña. Por ello, se ha optado por efectuar un ajuste empírico de los datos experimentales a una ecuación que proporcione la variación de la concentración de sustrato con el tiempo, para posteriormente determinar analíticamente la derivada.

5.1.3 Velocidad específica de formación de etanol

Para calcular la velocidad específica de producción de etanol, q_E , al igual que para q_s , se ha aplicado el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos. En este caso la velocidad específica de producción de etanol se define por:

$$q_E = \frac{1}{x} \frac{dE}{dt} \quad [5.6]$$

También aquí la dificultad reside en la evaluación de la velocidad de producción de etanol por unidad de volumen, dE/dt . Por las mismas consideraciones realizadas en el apartado anterior, se ha optado por realizar un ajuste empírico de los datos $E-t$ de cada experimento que posteriormente permita la determinación analítica de la derivada.

5.1.4 Rendimientos instantáneos y globales

El rendimiento instantáneo en biomasa, $Y_{x/s}$, puede definirse como el cociente entre la biomasa neta producida y el sustrato neto consumido en un instante dado del cultivo, por lo que se podrá expresar en la forma:

$$Y_{x/s} = \frac{dx}{d(s_0 - s)} \quad [5.7]$$

Si el rendimiento permanece constante a lo largo del experimento, una representación de los valores a distintos tiempos de $(x-x_0)$ frente a (s_0-s) debería conducir a una recta de pendiente $Y_{x/s}$ y de ordenada en el origen nula. Aunque no sea nula, el rendimiento obtenido mediante la pendiente correspondería a todo el experimento y para distinguirlo del instantáneo se podría denominar medio o global, $Y_{x/s}^G$.

De forma similar al rendimiento en biomasa, el rendimiento instantáneo en etanol se define por:

$$Y_{E/s} = \frac{d(E-E_0)}{d(s_0 - s)} \quad [5.8]$$

Si este rendimiento, $Y_{E/s}$, permanece constante en el transcurso del cultivo, una representación de $E-E_0$, o bien de E (puesto que en los experimentos realizados, para $t=0 \rightarrow E_0=0$) frente a (s_0-s) debería conducir a una recta de pendiente $Y_{E/s}$ y de

ordenada en el origen nula. De serlo, este rendimiento constante correspondería al medio o global que lo simbolizaremos en la forma $Y_{E/s}^G$.

Asímismo, el rendimiento instantáneo en xilitol, $Y_{Xi/s}$, se puede definir de forma análoga a $Y_{E/s}$, y por tanto:

$$Y_{Xi/s} = \frac{d(Xi)}{d(s_0 - s)} \quad [5.9]$$

Puesto que para $t=0 \rightarrow Xi_0=0$. Sin embargo, a diferencia de los rendimientos en biomasa y en etanol, éste se ha determinado con pocos valores experimentales y fundamentalmente se basa en medidas de xilitol correspondientes al final de cada experimento. Por ello, el rendimiento obtenido a partir de las representaciones de Xi frente a s_0-s será considerado como un rendimiento macroscópico de significación menos rigurosa, y será expresado de la forma $\bar{Y}_{Xi/s}$.

Finalmente, la productividad instantánea en etanol, para experimentos con $E_0=0$, se define por:

$$Y_{E/x} = \frac{dE}{dx} \quad [5.10]$$

Si este parámetro permanece constante en el transcurso del experimento, una representación de E vs $(x-x_0)$ daría lugar a una recta cuya pendiente sería $Y_{E/x}$ y cuya ordenada en el origen debería ser nula. Esta pendiente constante corresponderá a la productividad global expresada en la forma $Y_{E/x}^G$.

5.2 FERMENTACIÓN CON *Hansenula polymorpha*

Los resultados experimentales obtenidos en la fermentación de xilosa con esta levadura aparecen en las Tablas 4.1 a 4.7 y en las correspondientes representaciones de las Figuras 4.1 a 4.9. En ellas se recogen los valores de biomasa formada, xilosa residual y etanol y xilitol producidos a lo largo de los experimentos, así como la evolución temporal del pH de los cultivos.

En las dos series experimentales realizadas se ha analizado, respectivamente, la influencia del nivel de aireación y del pH inicial del medio de cultivo.

5.2.1 Influencia del nivel de aireación

5.2.1.1 Formación de biomasa

A partir de los resultados de biomasa se han calculado los correspondientes valores del logaritmo neperiano de la concentración adimensional de biomasa, $\ln(x/x_0)$, y se han representado frente al tiempo para cada uno de los cultivos, con objeto de obtener las curvas de crecimiento.

La Figura 5.1 muestra las curvas de crecimiento correspondientes a los experimentos base (H-B) y de máxima aireación (H-A3). Al igual que se observa en ésta, las curvas obtenidas para el resto de los cultivos ponen de manifiesto que la fase lag o de adaptación es prácticamente despreciable. A continuación se aprecia una fase exponencial, indicada mediante flechas en la Figura 5.1, de duración reducida, que finaliza cuando la concentración de xilosa es aún próxima a la inicial. El crecimiento celular continúa pero a una velocidad inferior a la de la fase exponencial y, finalmente, se alcanza la fase estacionaria que coincide prácticamente con el consumo total de xilosa.

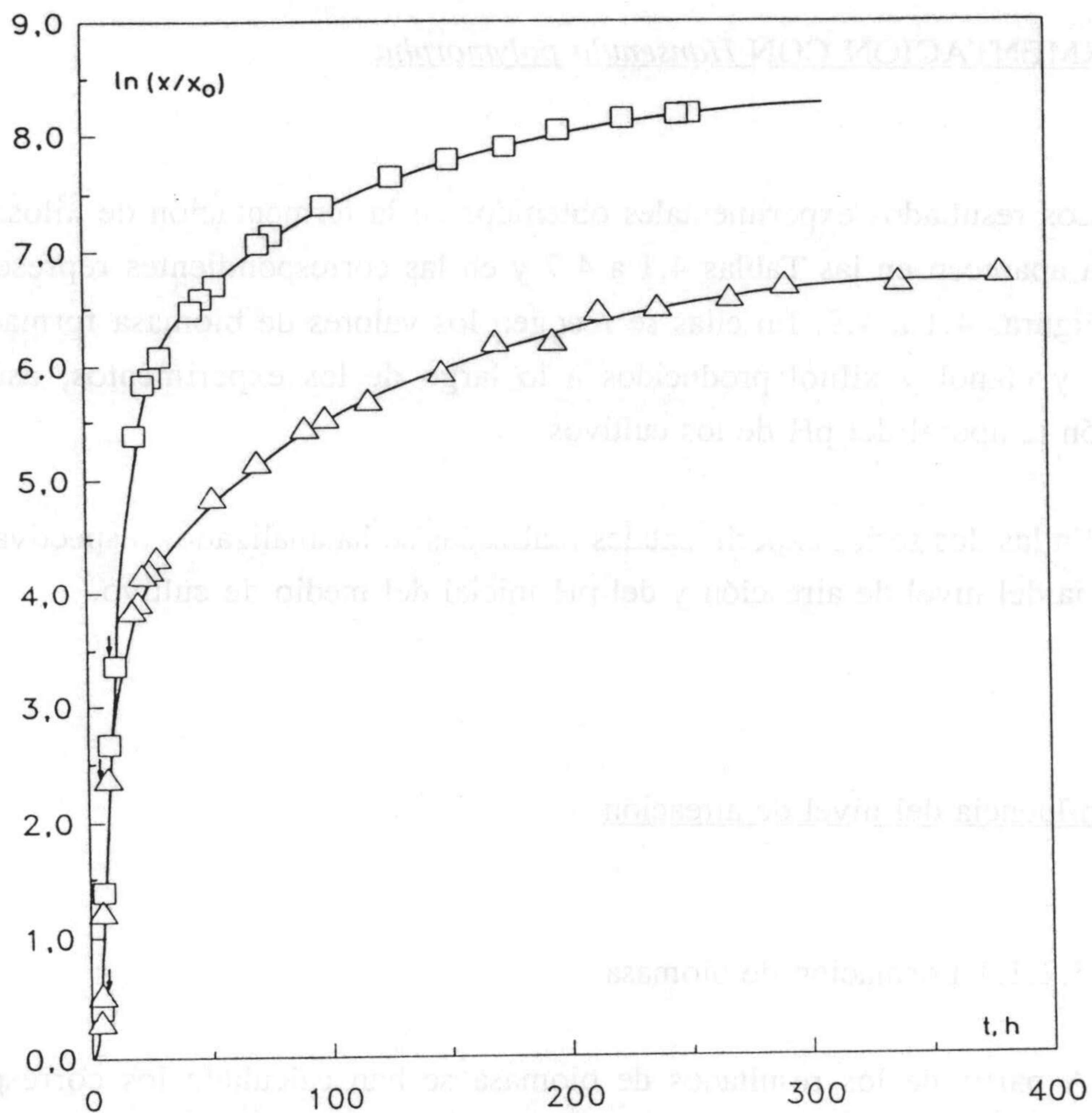


Fig. 5.1.- Curvas de crecimiento de los experimentos:
 (Δ) H-B (Q=0,0 v/v/min) y (□) H-A3 (Q=0,3 v/v/min)

Los resultados experimentales obtenidos en el reactor para los dos casos de estudio se muestran en las Tablas 4.1 a 4.7 y en las correspondientes Figuras 5.1 a 5.7. En estas se muestran los valores de las variables $\ln(x/x_0)$ y t para los experimentos realizados con la velocidad de agitación $Q=0,0$ v/v/min y $Q=0,3$ v/v/min. Como se puede observar, las curvas de crecimiento de $\ln(x/x_0)$ vs t para los dos casos de estudio son muy similares, lo que indica que el tipo de agitación no tiene un efecto significativo en el crecimiento celular cuando la concentración de células es alta y la velocidad de agitación es de 0,0 v/v/min y 0,3 v/v/min. En consecuencia, se observa la fase estacionaria por encima del crecimiento con el consumo total de células.

A partir de estas representaciones, se ha establecido la duración para cada experimento de la fase exponencial y, mediante ajuste por mínimos cuadrados de los valores experimentales a la ecuación [5.3], se han determinado las velocidades específicas máximas de crecimiento, μ_m , cuyos valores aparecen para los cuatro experimentos de esta serie en la Tabla 5.1.

Se observa que no existe una influencia significativa del nivel de aireación en el valor de μ_m dentro del intervalo ensayado de 0,0 a 0,3 v/v/min, si bien, se detecta un leve aumento de μ_m cuando sólo se aporta el aire incorporado por el vórtice de agitación ($Q=0,0$ v/v/min).

TABLA 5.1
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO
(*Hansenula polymorpha*)
INFLUENCIA DEL NIVEL DE AIREACIÓN

$$s_o = 25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3} \quad \text{pH}_i = 5,5$$

EXPTO.	Q v/v/min	μ_m h^{-1}	b $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$
H-B	0,000	0,409	0,0083
H-A1	0,075	0,375	--
H-A2	0,150	0,330	0,0185
H-A3	0,300	0,375	0,0312

El valor más alto de la velocidad específica máxima de crecimiento, $\mu_m=0,409 \text{ h}^{-1}$, es superior al obtenido en la fermentación de disoluciones de glucosa con *Pachysolen tannophilus* en condiciones de operación similares, donde resultó $\mu_m=0,33 \text{ h}^{-1}$, Camacho y col. (1989). Sin embargo, los valores de μ_m obtenidos son del mismo orden que los observados en la fermentación de disoluciones de glucosa con *Saccharomyces cerevisiae*, donde μ_m varía entre 0,40 y 0,45 h^{-1} , Gaden (1959).

Por otra parte, de las representaciones de las Figuras 4.1 a 4.4 se deduce que, durante un intervalo de tiempo relativamente amplio y posterior a la fase de crecimiento exponencial, puede admitirse que la biomasa aumenta linealmente con el tiempo.

Este período de comportamiento lineal es también fácilmente observable en otras levaduras, como *Pachysolen tannophilus*, Jeffries (1982), Detroy y col. (1982), Castro Galiano (1989), y en general es una de las características de las fermentaciones controladas por etapas de naturaleza física. En el caso de *P. tannophilus*, el crecimiento celular llega a estar limitado por la disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo, incluso cuando se introducen niveles de aireación elevados, Slininger y col. (1982). Por ello, en estos casos el control cinético del bioproceso parece residir en la transferencia de oxígeno en la suspensión de células.

A partir de los datos experimentales, $x-t$, representados en las Figuras 4.1 a 4.4 se ha establecido, en los experimentos en que ha sido posible, el período de tiempo en el cual la biomasa tiene un comportamiento lineal. Mediante ajuste por mínimos cuadrados de los correspondientes valores experimentales a la ecuación [5.4] se han determinado los valores de la productividad en biomasa en la fase lineal, b , que conjuntamente con μ_m se recogen en la Tabla 5.1.

De la comparación de los valores de b , se deduce que existe un aumento de este parámetro con el caudal de aire suministrado.

5.2.1.2 Consumo de xilosa

El consumo de xilosa por *Hansenula polymorpha* ha sido estudiado a través de la determinación de dos parámetros: velocidad específica de consumo de sustrato, q_s , y rendimiento global en biomasa, $Y_{x/s}^G$.

Para determinar el valor de q_s mediante la ecuación [5.5] es necesario evaluar, previamente, la derivada $d(s_0-s)/dt$. Para ello se ha optado por efectuar un ajuste empírico de los datos experimentales a una ecuación que proporcione la variación xilosa-tiempo y después, analíticamente, calcular el término $d(s_0-s)/dt$.

En general en las fermentaciones discontinuas se observa que la concentración de sustrato disminuye lentamente en las primeras fases del crecimiento para a continuación descender bruscamente hasta que se encuentra muy agotado, momento a partir del cual vuelve a disminuir lentamente. Este comportamiento determina que normalmente sea difícil ajustar todo el intervalo mediante ecuaciones simples. Así, al aplicar los resultados experimentales, $s-t$, a ecuaciones sencillas como exponencial, potencial o parabólica, sólo se consigue reproducirlos en intervalos de tiempo reducidos. Entre las expresiones algo más complejas que se han ensayado, la que permite obtener una mejor reproducibilidad de los datos de xilosa en mayores intervalos de tiempo es de la forma:

$$s = s_0 \cdot \alpha^{-t^\beta} \quad [5.11]$$

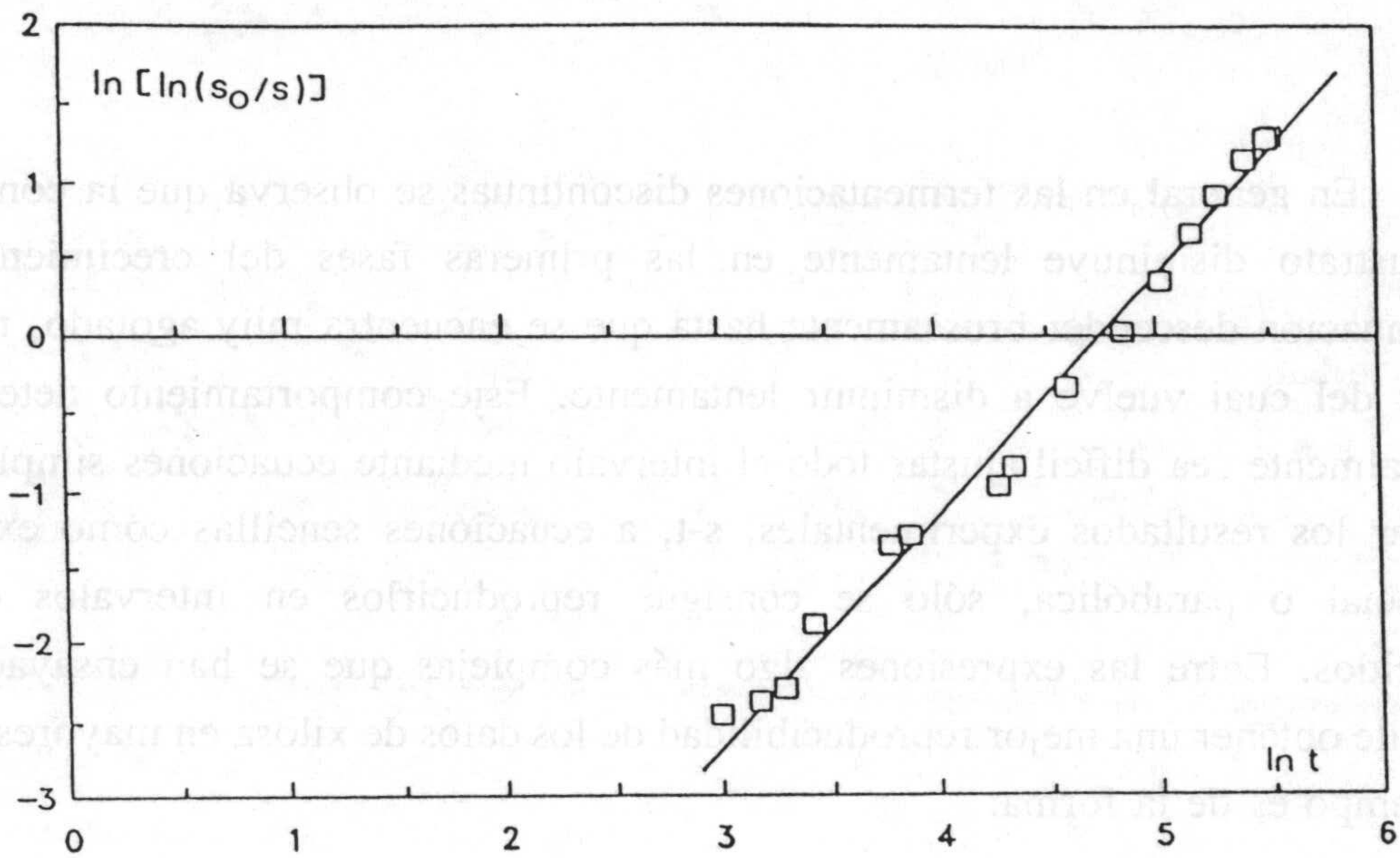
que cumple con la condición inicial de que para $t=0 \rightarrow s=s_0$.

Para evaluar los parámetros α y β de la ecuación [5.11], ésta se puede linealizar en la forma:

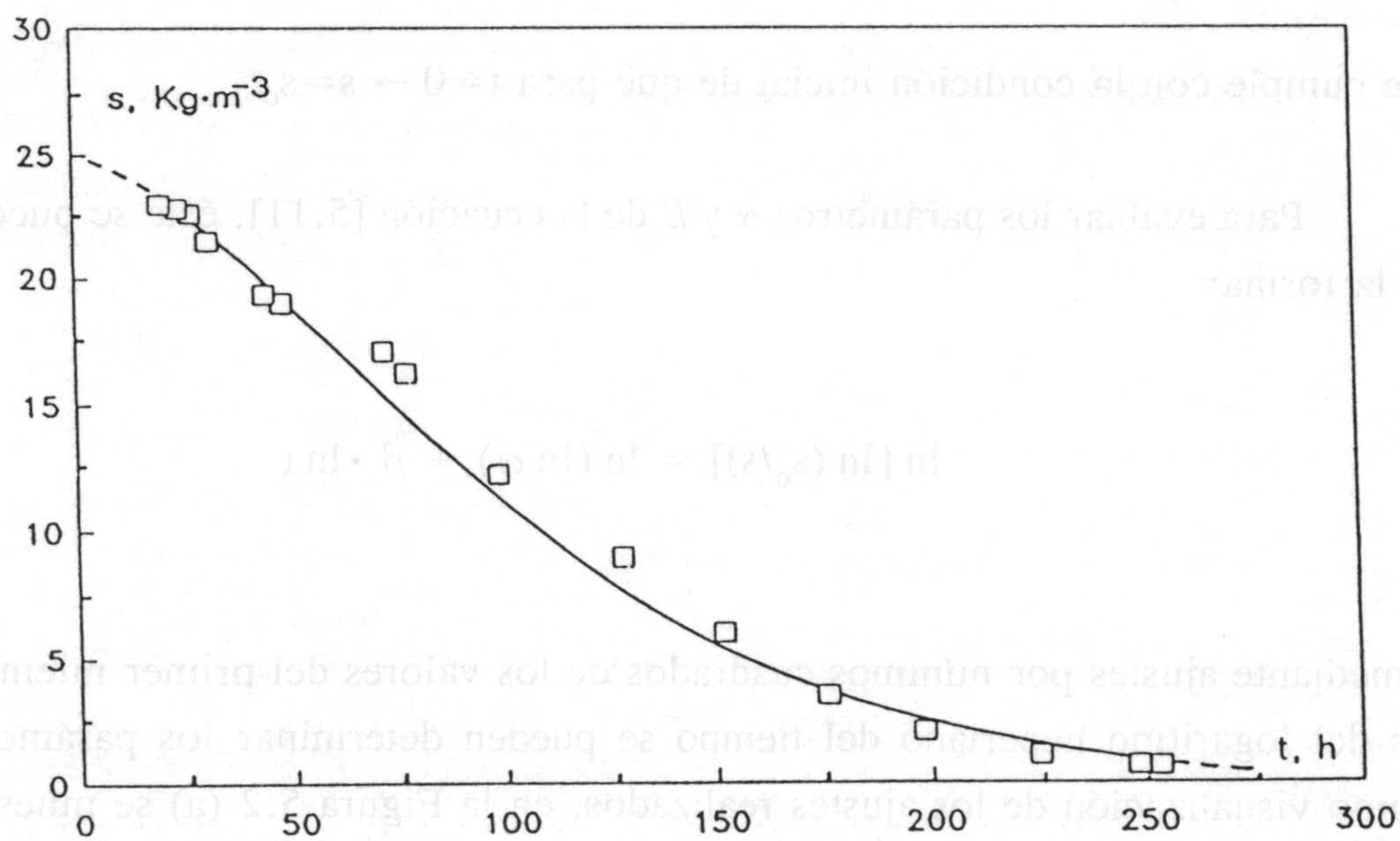
$$\ln [\ln (s_0/s)] = \ln (\ln \alpha) + \beta \cdot \ln t \quad [5.12]$$

y mediante ajustes por mínimos cuadrados de los valores del primer miembro frente a los del logaritmo neperiano del tiempo se pueden determinar los parámetros α y β . Como visualización de los ajustes realizados, en la Figura 5.2 (a) se muestra, a modo de ejemplo, la representación correspondiente a la ecuación [5.12] para el experimento de mayor aireación, $Q=0,30$ v/v/min.

Una vez obtenidos los parámetros α y β se puede comprobar la bondad del ajuste mediante la ecuación [5.11]. Como ejemplo en la Figura 5.2 (b) se representan los valores de la concentración de xilosa frente al tiempo para el experimento H-A3. La línea continua corresponde a la ecuación, mientras que los puntos son los valores experimentales $s-t$. Se observa que la reproducción es aceptable en el intervalo de tiempo que se ha utilizado para el ajuste.



a)



b)

Fig. 5.2.- a) Ajuste de los resultados experimentales de consumo de xilosa para el experimento H-A3 ($Q=0,3$ v/v/min).
 b) Reproducción de la ecuación [5.12] para el experimento H-A3

Por otra parte, mediante la ecuación [5.11] se puede determinar la derivada $d(s_0-s)/dt$, y posteriormente, sustituyendo en la expresión [5.5] obtener la velocidad específica de consumo de xilosa en función del tiempo:

$$q_s^D = \frac{s_0 \cdot \beta \cdot (\ln \alpha) \cdot (t^{\beta-1}) \cdot (\alpha^{-t^\beta})}{x} \quad [5.13]$$

donde hay que sustituir la concentración de biomasa, x , por el valor correspondiente al tiempo considerado. Así se han determinado los valores de q_s^D en función del tiempo para cada uno de los experimentos realizados.

En todos los experimentos de la serie se observa que el valor de q_s^D disminuye con el tiempo. En la Tabla 5.2 se recogen, para cada uno de los experimentos, los valores de q_s^D a dos tiempos de la fase de crecimiento lineal.

TABLA 5.2
RENDIMIENTOS EN BIOMASA Y
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO
(Hansenula polymorpha)
INFLUENCIA DEL NIVEL DE AIREACIÓN
 $s_0 = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ $\text{pH}_i = 5,5$

EXPTO.	Q	$Y_{x/s}^G$	t	q_s^D	q_s
	v/v/min	$\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1}$	h	$\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
H-B	0,000	0,12	20,0	--	0,54
			100,0	0,075	0,087
H-A1	0,075	0,18	20,0	0,52	--
			100,0	0,023	--
H-A2	0,150	0,19	20,0	0,30	0,33
			100,0	0,049	0,054
H-A3	0,300	0,28	20,0	0,28	0,26
			100,0	0,042	0,034

Se observa que para $t=20$ h, q_s^D es mayor cuanto menor es el caudal de aireación; mientras que a tiempos mayores, $t=100$ h, en el valor de q_s^D no se detecta una influencia apreciable debida al nivel de aireación.

Con objeto de comprobar si los rendimientos en biomasa permanecen constantes a lo largo del experimento se han realizado representaciones de los valores de $(x-x_0)$ frente a (s_0-s) obteniéndose gráficas similares a la mostrada en la Figura 5.3. En todos los casos, de acuerdo con la ecuación [5.7], el ajuste obtenido por el método de mínimos cuadrados es aceptable y el valor de la pendiente representa el rendimiento global, $Y_{x/s}^G$, resultados que se recogen en la Tabla 5.2.

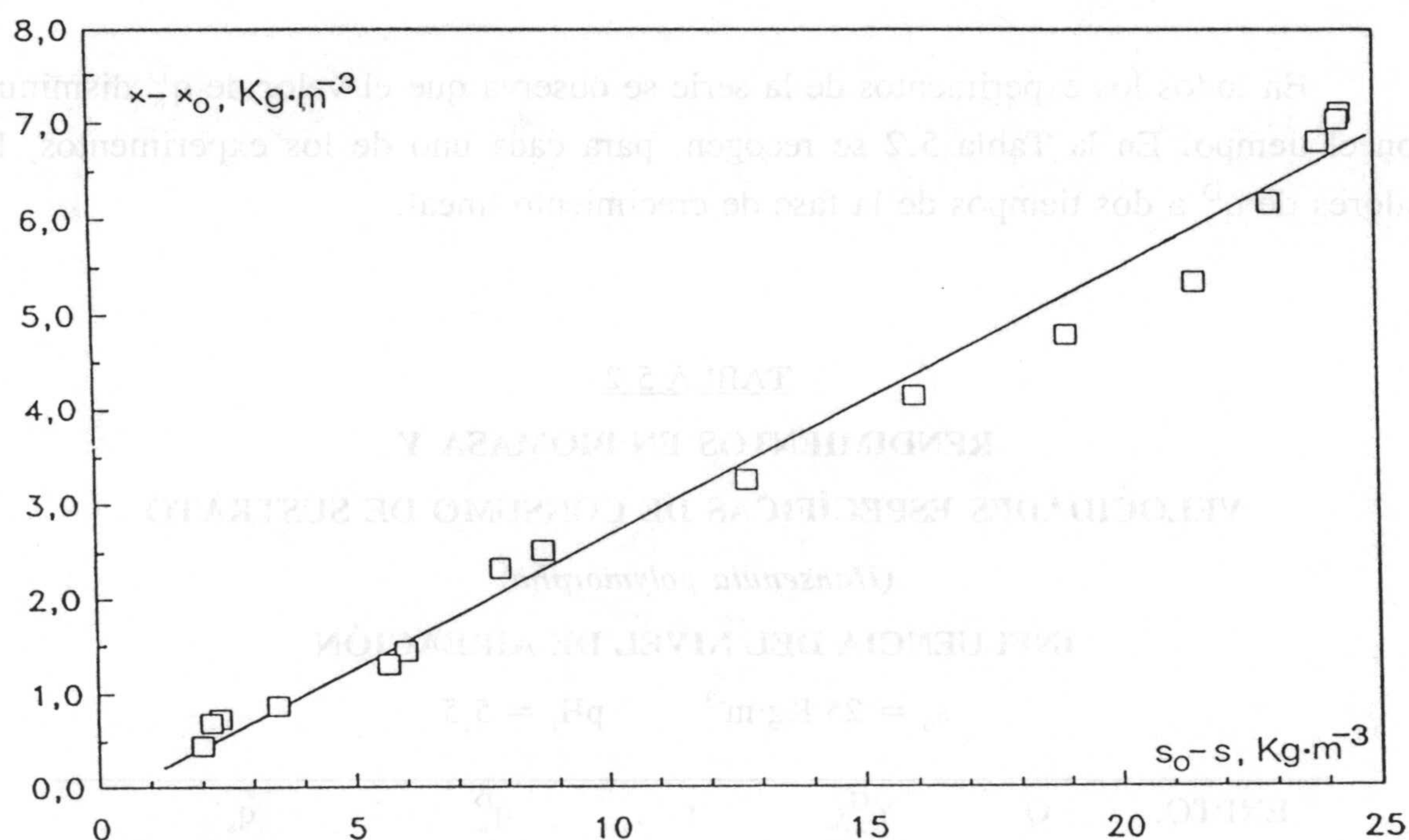


Fig. 5.3.- Rendimiento en biomasa, experimento H-A3 ($Q=0,3$ v/v/min)

En general, el rendimiento global en biomasa aumenta con el caudal de aire suministrado. Este resultado está de acuerdo con lo observado en *Pachysolen tannophilus* en las mismas condiciones de operación, donde el mayor valor del rendimiento medio se obtenía en el experimento de máxima aireación, Castro Vico (1986). Sin embargo, para *Hansenula polymorpha* los valores de $Y_{x/s}^G$ obtenidos son superiores.

Cuando el rendimiento en biomasa permanece constante en el transcurso del experimento y, admitiendo que no existe mantenimiento celular, (por lo tanto $Y_{x/s} = Y_{x/s}^G$), a partir de la propia definición de velocidad específica de crecimiento ($\mu = (1/x) \cdot dx/dt$) y de las ecuaciones [5.5] y [5.7] se puede deducir, fácilmente, que:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}^G} \quad [5.14]$$

De esta forma, determinando previamente el valor de μ y conocido el rendimiento se puede calcular q_s .

En *Hansenula polymorpha*, tal como se observa en los datos experimentales, después de la fase exponencial existe un amplio período lineal que en algunos casos corresponde prácticamente a todo el experimento. Durante este período y de acuerdo con la ecuación [5.4] se cumplirá que:

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{b}{x} \quad [5.15]$$

ecuación que permite determinar el valor de μ en el intervalo donde la biomasa tiene comportamiento lineal y con ello la velocidad específica de consumo de xilosa, q_s .

Con el fin de comparar los valores de q_s^D (método diferencial) con los evaluados mediante la ecuación [5.14], en la Tabla 5.2 se muestran los valores de q_s determinados a los mismos tiempos, 20 y 100 h. En los experimentos de mayor aireación se observa una buena concordancia entre los valores de la velocidad específica de consumo de xilosa calculados por ambos procedimientos.

5.2.1.3 Formación de bioproductos

La formación de los bioproductos mayoritarios, etanol y xilitol, se ha estudiado mediante los siguientes parámetros: velocidad específica de formación de etanol, q_E , y rendimientos en etanol, $Y_{E/s}$, y xilitol, $Y_{Xi/s}$.

En principio, hay que señalar que *Hansenula polymorpha* se ha caracterizado por producir bajos niveles de etanol mientras que sí se han obtenido altas concentraciones de xilitol.

De igual forma que ocurría con el parámetro q_s , y según la ecuación [5.8] el cálculo de la velocidad específica de producción de etanol requiere conocer previamente la derivada dE/dt . Por ello, se ha realizado un ajuste empírico de los datos experimentales a una ecuación que refleje la variación del etanol producido con el tiempo y permita determinar dE/dt .

De acuerdo con lo observado en las Figuras 4.1 a 4.4, el etanol varía de forma lineal con el tiempo, prácticamente en todo el intervalo, hasta que se alcanza la máxima concentración. De forma que esta variación puede ajustarse a la ecuación:

$$E = e \cdot t + f \quad [5.16]$$

siendo e y f dos constantes, que una vez determinadas han permitido trazar las líneas continuas reflejadas en las Figuras 4.1 a 4.4.

En el intervalo donde es válida la ecuación [5.16] se observa una aceptable reproducción de los valores experimentales.

Asímismo es necesario señalar que el nivel máximo de etanol se alcanza cuando en el medio queda aún una cantidad de xilosa apreciable. En esta serie esta concentración residual de xilosa oscila entre 5 y 10 $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$. De cualquier forma la ecuación [5.16] es válida en un amplio intervalo del experimento y permite determinar el valor de q_E^D , resultando que:

$$q_E^D = \frac{e}{x} \quad [5.17]$$

Fácilmente se puede deducir que q_E^D disminuirá con el tiempo, al hacerlo x , puesto que la tasa volumétrica de producción de etanol, e , permanece constante durante el tiempo en el que se puede aplicar la ecuación. En la Tabla 5.3 se muestran los valores de q_E^D a dos tiempos determinados, 20 y 50 h, de cada experimento. No se

observa una tendencia definida en q_E^D , correspondiendo los máximos valores a los caudales de aireación máximo y mínimo ensayados.

TABLA 5.3
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL
(Hansenula polymorpha)
INFLUENCIA DEL NIVEL DE AIREACIÓN

$s_o = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ $\text{pH}_i = 5,5$

EXPTO.	Q v/v/min	t h	$q_E^D \cdot 10^2$ $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$q_E \cdot 10^2$ $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
H-B	0,000	20,0	0,32	0,30
		50,0	0,11	0,10
H-A1	0,075	20,0	0,17	--
		50,0	0,04	--
H-A2	0,150	20,0	0,22	0,26
		50,0	0,07	0,09
H-A3	0,300	20,0	0,48	0,48
		50,0	0,14	0,14

Por otro lado, con objeto de comprobar si los rendimientos en etanol y xilitol permanecen constantes, de acuerdo con las ecuaciones [5.8] y [5.9], se han realizado representaciones de E y Xi frente a $(s_o - s)$. En los cuatro experimentos de la serie se han obtenido gráficas similares a la que se muestra en la Figura 5.4, correspondiente al cultivo con mayor caudal de aireación. A partir de las pendientes de las líneas representadas se han determinado los rendimientos en etanol, $Y_{E/s}^G$, y xilitol, $\bar{Y}_{Xi/s}$, valores que se indican en la Tabla 5.4.

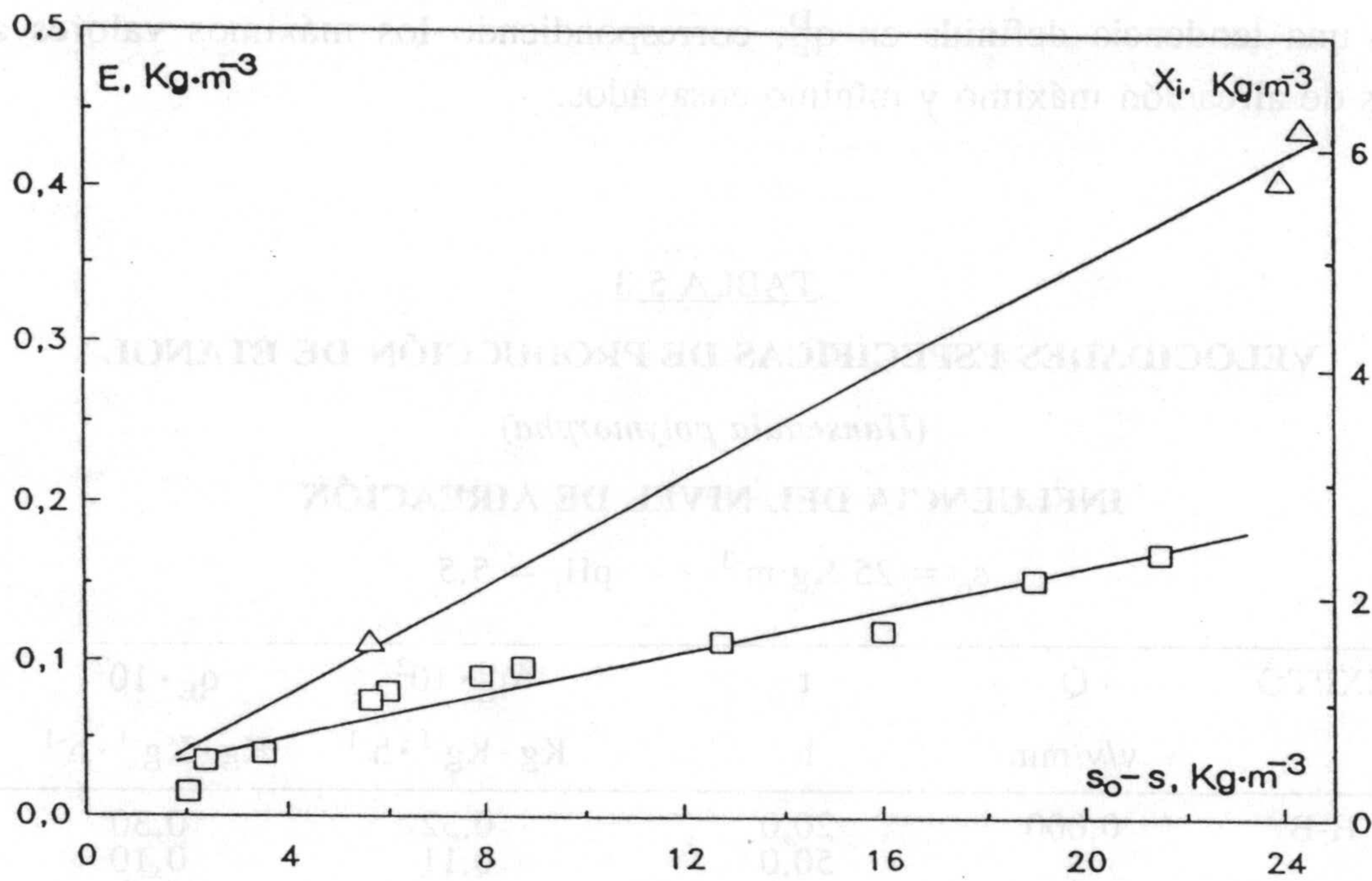


Fig. 5.4.- Rendimientos en etanol (□) y xilitol (Δ), experimento H-A3 (Q=0,3 v/v/min)

TABLA 5.4

RENDIMIENTOS EN ETANOL Y XILITOL

(*Hansenula polymorpha*)

INFLUENCIA DEL NIVEL DE AIREACIÓN

$s_0 = 25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $\text{pH}_i = 5,5$

EXPTO.	Q v/v/min	$Y_{E/s}^G$ $\text{Kg}\cdot\text{Kg}^{-1}$	$\bar{Y}_{Xi/s}$ $\text{Kg}\cdot\text{Kg}^{-1}$
H-B	0,000	0,017	0,64
H-A1	0,075	0,0052	0,31
H-A2	0,150	0,0092	0,41
H-A3	0,300	0,0069	0,24

En general, se observa que tanto el rendimiento en etanol como en xilitol disminuyen con el caudal de aireación. El hecho de que $Y_{Xi/s}$ disminuya conforme aumenta Q coincide con lo observado en otras levaduras, tales como *Pachysolen tannophilus*, Slininger y col. (1987), y *Pichia stipitis*, Delgenes y col. (1987). Sin embargo, en estas levaduras cuando disminuía la concentración de xilitol en el medio de cultivo, aumentaba la de etanol y con ello su rendimiento.

En principio, en *Hansenula polymorpha* la disminución del $Y_{E/s}^G$ observada puede ser debida a varias razones: a una evaporación parcial del etanol producido, ya que los caudales de aireación han sido algo superiores a los empleados por los autores antes citados, o bien puede ocurrir que esta levadura, en estas condiciones de máxima aireación, consuma a mayor velocidad el propio etanol que produce. Este hecho podría justificar el valor del rendimiento en biomasa tan elevado obtenido, $Y_{x/s} = 0,28 \text{ (Kg biomasa) } \cdot \text{(Kg xilosa)}^{-1}$, cuando la fermentación fue realizada con el caudal de aireación más alto, $Q = 0,3 \text{ v/v/min}$.

A partir de la definición de velocidad específica de crecimiento, de las ecuaciones [5.6] y [5.10], admitiendo una productividad instantánea en etanol constante e igual a $Y_{E/x}^G$, y suponiendo que no existe prácticamente mantenimiento celular, se puede deducir que la velocidad específica de producción de etanol es:

$$q_E = Y_{E/x}^G \cdot \mu \quad [5.18]$$

En todos los experimentos de esta serie, y en el período de comportamiento lineal, la representación del etanol producido, E , frente a la biomasa neta formada, $x - x_0$, ha conducido a una recta de cuya pendiente se ha determinado $Y_{E/x}^G$; un ejemplo de estas representaciones se muestra en la Figura 5.5. También en el mismo período de comportamiento lineal la velocidad específica, μ , se ha determinado mediante la ecuación [5.15]. Una vez evaluado $Y_{E/x}^G$ y μ se ha podido calcular q_E , cuyos valores se muestran en la Tabla 5.3 para los tiempos de 20 y 50 h, observándose una buena concordancia con los valores de la velocidad específica de producción de etanol determinados por el método diferencial, q_E^D .

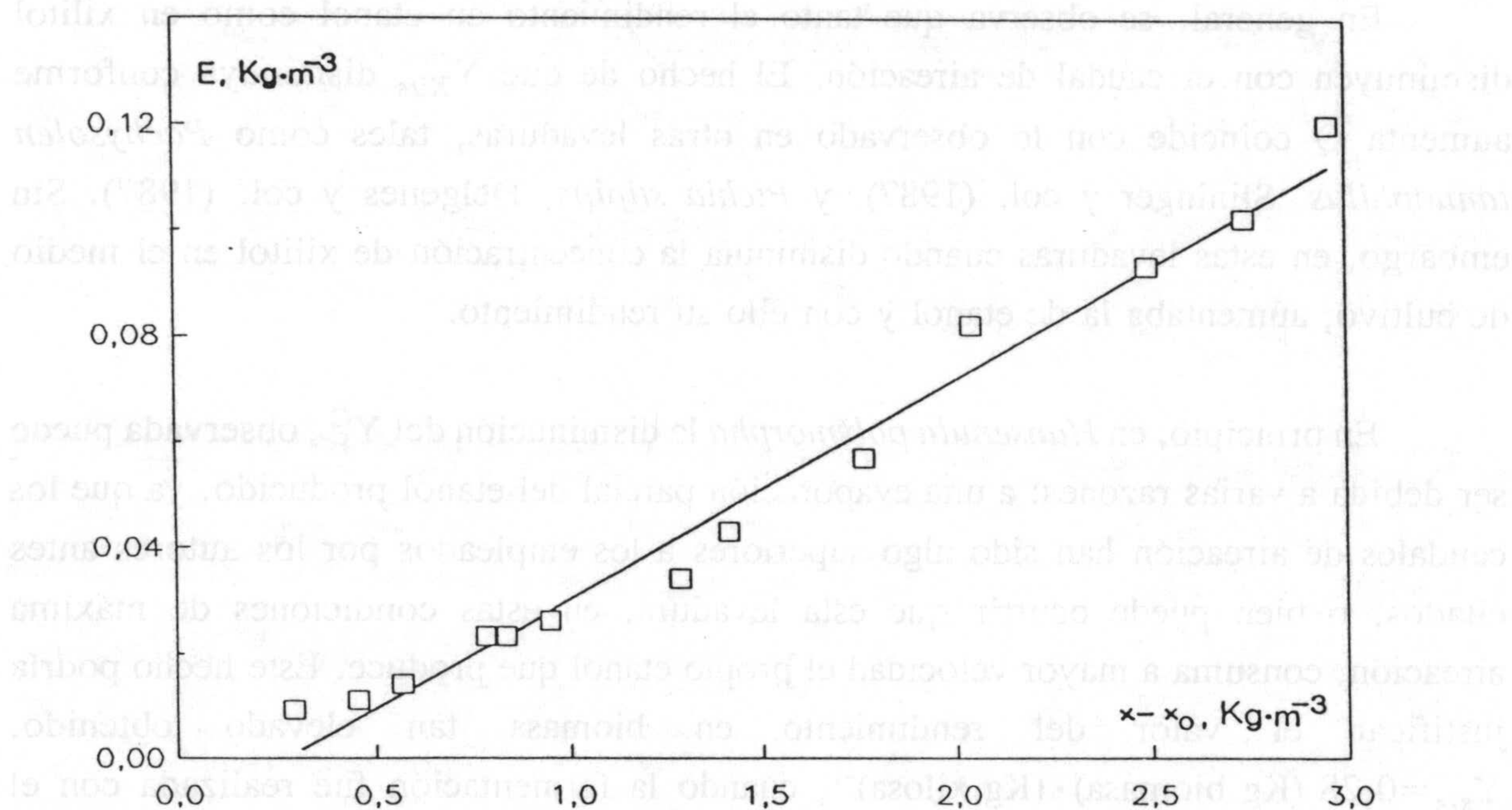


Fig. 5.5.- Etanol producido frente a biomasa neta en el experimento H-A2 ($Q=0,15$ v/v/min)

5.2.2 Influencia del pH inicial

5.2.2.1 Formación de biomasa

En la Figura 5.6 se incluyen las curvas de crecimiento ($\ln(x/x_0)$ vs t) correspondientes a los experimentos de pH inicial 4,5 y 6,5.

Representaciones análogas para el resto de los cultivos de la serie ponen de manifiesto que, al igual que en la serie de aireación, prácticamente no existe fase lag y se observa una fase exponencial (marcada entre flechas en la Figura 5.6) de duración reducida, seguida de otra etapa de crecimiento celular a menor velocidad. En las gráficas biomasa-tiempo este período posterior al crecimiento exponencial también tiene comportamiento lineal. La fase estacionaria se alcanza coincidiendo prácticamente con el consumo total de xilosa.

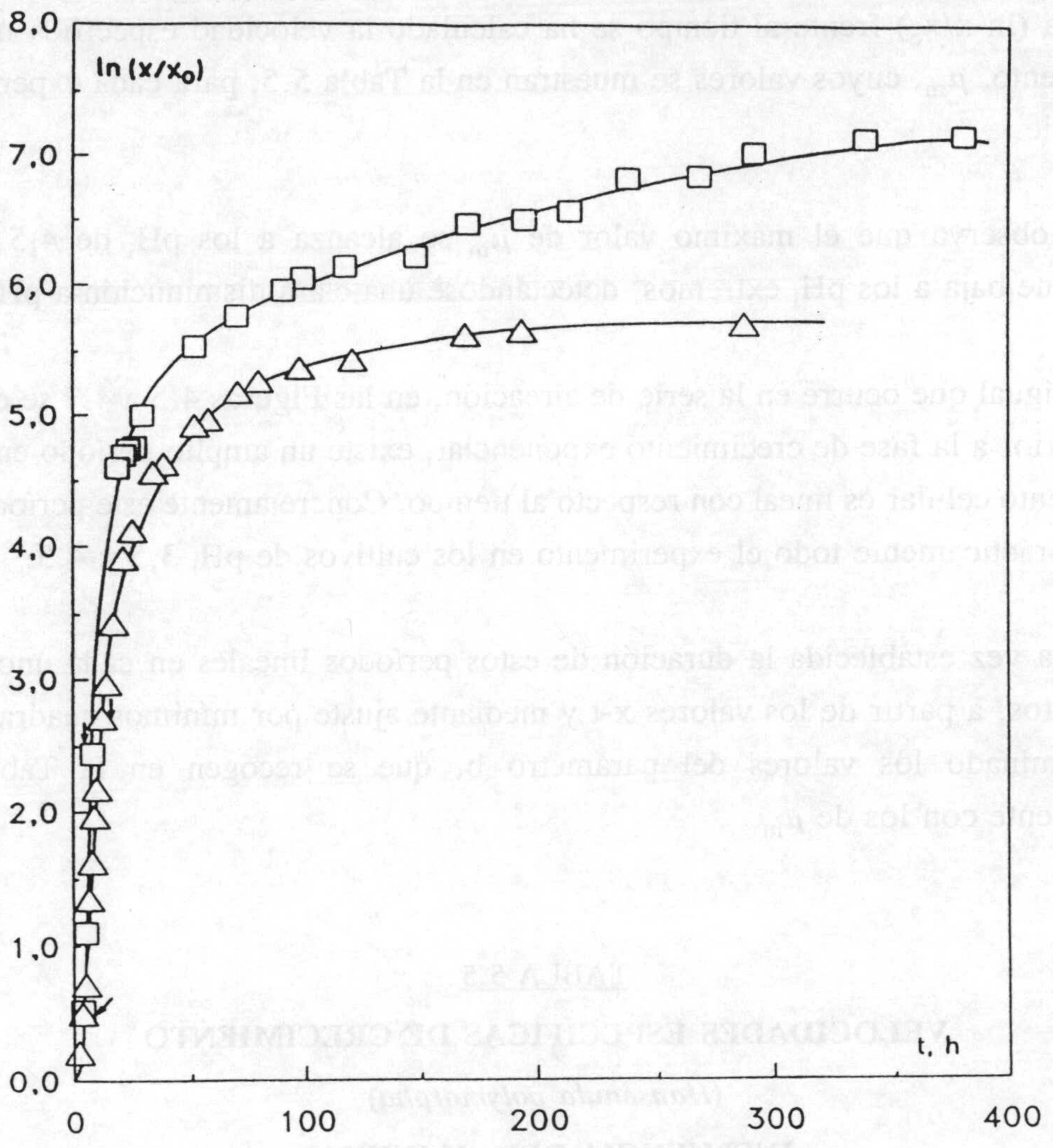


Fig. 5.6.- Curvas de crecimiento de los experimentos:
(□) H-P2 (pH_i=4,5) y (Δ) H-P3 (pH_i=6,5)

A partir de los valores del logaritmo neperiano de la concentración adimensional de biomasa ($\ln x/x_0$) frente al tiempo se ha calculado la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , cuyos valores se muestran en la Tabla 5.5, para cada experimento de esta serie.

Se observa que el máximo valor de μ_m se alcanza a los pH_i de 4,5 y 5,5, mientras que baja a los pH_i extremos, detectándose una clara disminución a $\text{pH}_i=6,5$.

Al igual que ocurre en la serie de aireación, en las Figuras 4.5 a 4.7 se observa que, posterior a la fase de crecimiento exponencial, existe un amplio período en el que el crecimiento celular es lineal con respecto al tiempo. Concretamente este período llega a ocupar prácticamente todo el experimento en los cultivos de pH_i 3,5 y 4,5.

Una vez establecida la duración de estos períodos lineales en cada uno de los experimentos, a partir de los valores $x-t$ y mediante ajuste por mínimos cuadrados, se han determinado los valores del parámetro b , que se recogen en la Tabla 5.5, conjuntamente con los de μ_m .

TABLA 5.5
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO
(Hansenula polymorpha)
INFLUENCIA DEL pH INICIAL

$$s_0 = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3} \quad Q = 0,0 \text{ v/v/min}$$

EXPTO.	pH_i	μ_m h^{-1}	b $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$
H-P1	3,5	0,379	0,0106
H-P2	4,5	0,428	0,0123
B-H	5,5	0,409	0,0083
H-P3	6,5	0,267	0,0123

En general, de la comparación de los valores de b correspondientes a cada experimento no se puede deducir ninguna tendencia definida. Sólo se detecta una leve disminución en el cultivo a $\text{pH}_i=5,5$.

5.2.2.2 Consumo de xilosa

Al igual que en la serie de aireación, para determinar el valor de la velocidad específica de consumo de xilosa, q_s^D , en principio se aplica la ecuación [5.11] que linealizada en la forma [5.12] permitirá determinar el valor de los parámetros α y β .

A título de ejemplo en la Figura 5.7 (a) se representa $\ln [\ln(s_0/s)]$ vs $\ln t$ para el experimento de $\text{pH}_i=4,5$. El ajuste realizado es aceptable en el intervalo de tiempo considerado, el cual ocupa buena parte del experimento, y durante este tiempo prácticamente el 90% del sustrato suministrado inicialmente es consumido.

Con los valores de α y β determinados para cada experimento, y mediante la ecuación [5.11], se han recalculado los valores de xilosa residual, s , para cada tiempo en el intervalo de validez de la ecuación [5.11]. Estos valores, indicados mediante una línea continua, se han representado en la Figura 5.7 (b), mientras que los puntos corresponden a los resultados experimentales.

Los valores de q_s^D determinados mediante la ecuación [5.13] se muestran en la Tabla 5.6 para dos tiempos (75 y 100 h) de cada experimento, excepto en el realizado a $\text{pH}_i=6,5$, ya que para $t=100$ h la ecuación [5.13] no se puede aplicar por estar fuera del rango utilizado para obtener los valores de los parámetros α y β . En esta Tabla se ha incluido de nuevo el experimento base, $\text{pH}_i=5,5$, para realizar una mejor comparación. En todos los casos se ha observado que el valor de la velocidad específica de consumo de xilosa disminuye en el transcurso del experimento.

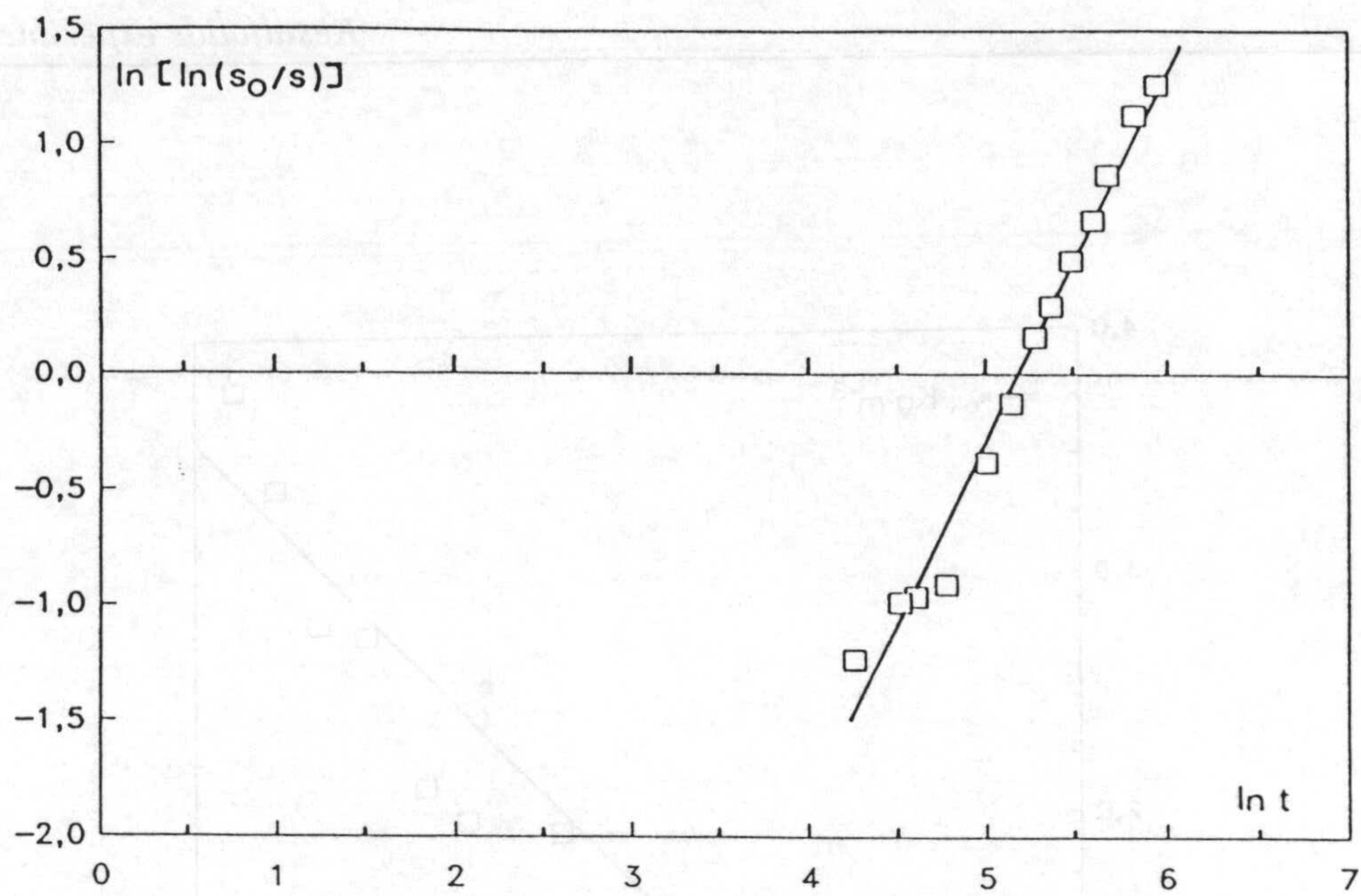
TABLA 5.6
RENDIMIENTOS EN BIOMASA Y
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO
(*Hansenula polymorpha*)
INFLUENCIA DEL pH INICIAL

$$s_0 = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3} \quad Q = 0,0 \text{ v/v/min}$$

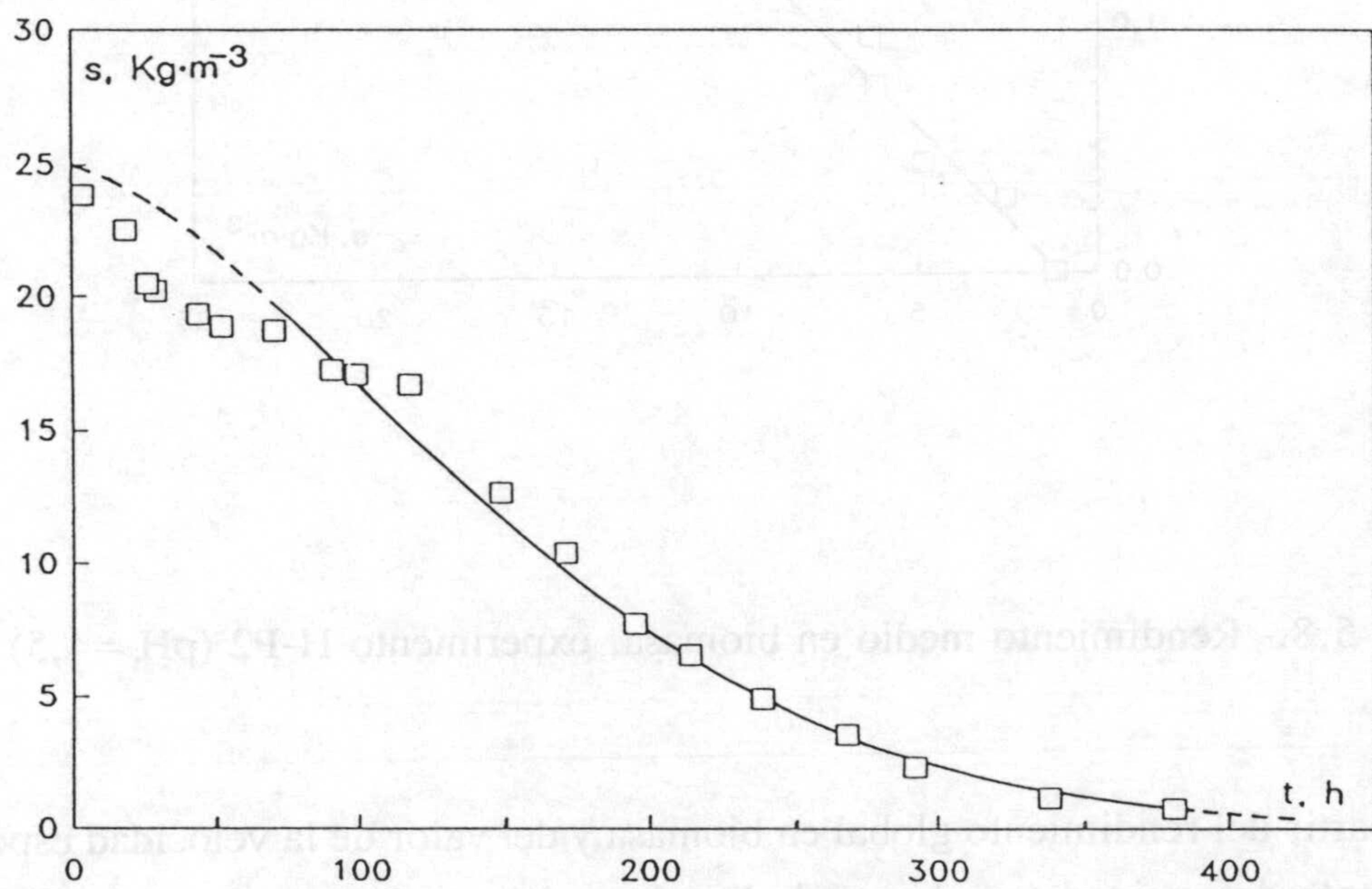
EXPTO.	pH _i	Y _{x/s} ^G Kg · Kg ⁻¹	t h	q _s ^D Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹	q _s Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹
H-P1	3,5	0,16	75,0	0,086	0,081
			100,0	0,072	0,061
H-P2	4,5	0,15	75,0	0,11	0,088
			100,0	0,087	0,066
H-B	5,5	0,12	75,0	0,075	0,12
			100,0	0,071	0,087
H-P3	6,5	0,44	75,0	0,039	0,030

En los experimentos de pH inicial entre 3,5 y 5,5 el valor de q_s^D para $t=75$ y 100 h apenas sufre variación. Sin embargo, sí se detecta una disminución para el de $\text{pH}_i=6,5$. En general, es conocido que este pH tan elevado es desfavorable para el crecimiento de levaduras; además, en estas condiciones la posibilidad de que el cultivo se contamine con otros microorganismos (principalmente bacterias) es mayor. Por ello, para evitarlo, el experimento se finalizó antes de que el sustrato fuese totalmente consumido y una vez que se pudiesen calcular los distintos parámetros objeto de esta investigación.

Asímismo, se han calculado los rendimientos globales en biomasa a partir de gráficos similares al representado en la Figura 5.8 y que corresponde al experimento llevado a cabo a $\text{pH}_i=4,5$. El valor de $Y_{x/s}^G$ obtenido para cada pH_i se recoge en la Tabla 5.6, no detectándose variación apreciable en los experimentos de pH_i entre 3,5 y 5,5, mientras que para $\text{pH}_i=6,5$ el valor de $Y_{x/s}^G$ es bastante más elevado. Esta tendencia del rendimiento en biomasa a valores altos de pH_i es coincidente con la observada con *Pachysolen tannophilus* utilizando como fuente de carbono glucosa, Camacho y col. (1988) y xilosa, Castro Galiano (1989), aunque en estos casos la elevación de $Y_{x/s}^G$ fue menos acusada.



a)



b)

Fig. 5.7.- a) Ajuste de los datos experimentales de consumo de xilosa a la ecuación [5.12], experimento H-P2 ($\text{pH}_i=4,5$)
 b) Reproducción de la ecuación [5.11], experimento H-P2

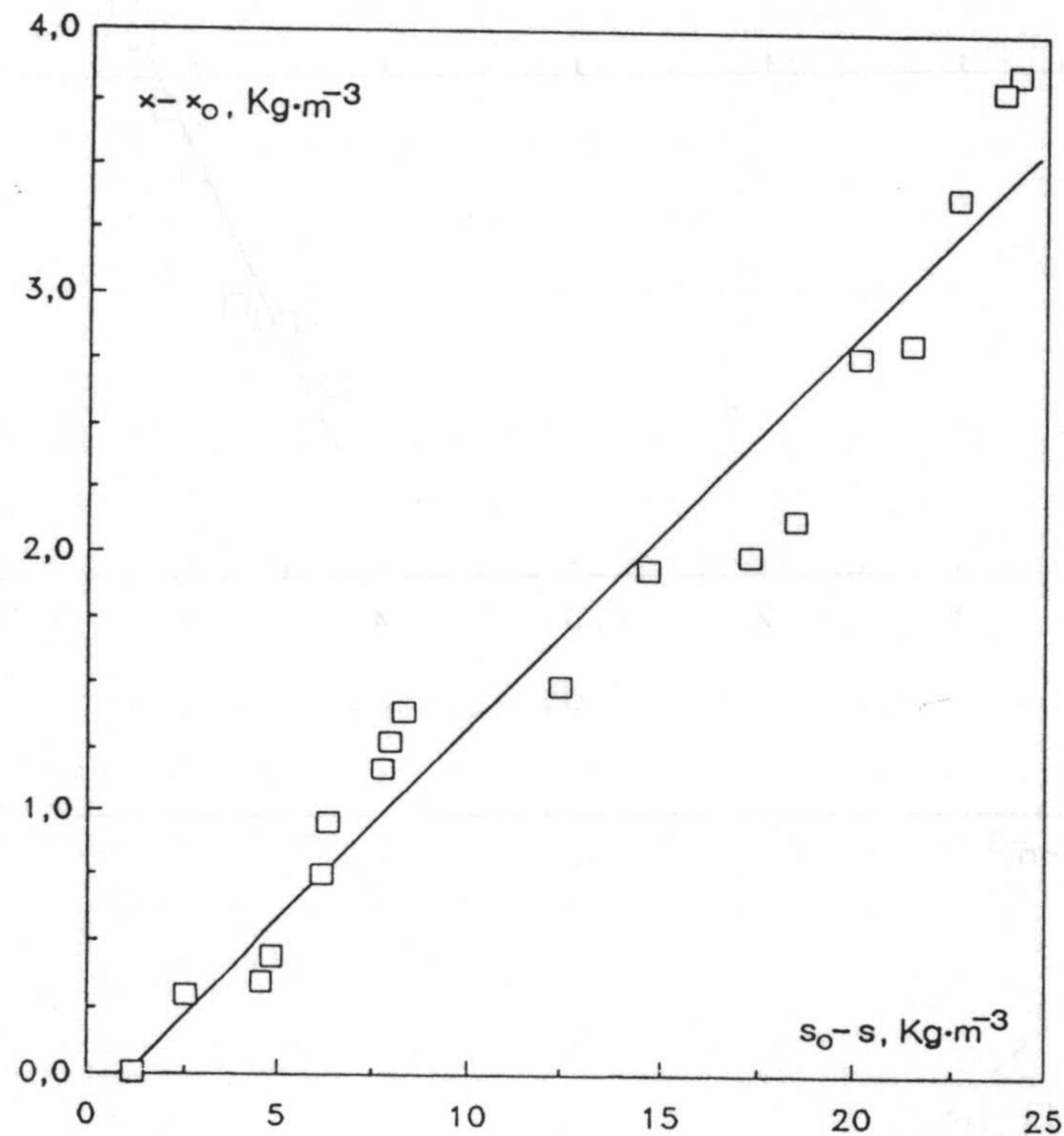


Fig. 5.8.- Rendimiento medio en biomasa, experimento H-P2 ($\text{pH}_i = 4,5$)

A partir del rendimiento global en biomasa y del valor de la velocidad específica de crecimiento determinada en el período lineal, $\mu = b/x$, se ha calculado el valor de q_s mediante la ecuación [5.14]. Con objeto de poder comparar con q_s^D (método diferencial) los valores de q_s también se recogen en la Tabla 5.6 para los tiempos $t=75$ y 100 h. En general, se observa una aceptable concordancia entre los valores de la velocidad específica de consumo de xilosa evaluada por ambos procedimientos.

5.2.2.3 Formación de bioproductos

Al igual que en la serie de experimentos de aireación se ha determinado la velocidad específica de formación de etanol y los rendimientos en etanol y xilitol correspondientes a cada pH inicial.

Según se muestra en las Figuras 4.6 a 4.8, también en esta serie, el etanol producido aumenta de forma lineal con el tiempo, hasta que se alcanza la concentración máxima en etanol, ajustándose esta variación a la ecuación [5.16]. El ajuste realizado por regresión lineal ha permitido trazar la línea continua representada en dichas Figuras en el intervalo donde es válida la ecuación. En todos los casos se obtiene una buena reproducción de los valores experimentales.

La máxima concentración de etanol se alcanza en el experimento llevado a cabo a $\text{pH}_i=5,5$, cuando en el medio de cultivo queda aún una concentración de xilosa residual considerable, aproximadamente $8 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$. Este efecto es todavía más pronunciado en el experimento de $\text{pH}_i=6,5$, donde la máxima concentración de etanol se alcanza cuando en el medio existen aún $16 \text{ Kg xilosa} \cdot \text{m}^{-3}$. En los cultivos con pH_i de 3,5 y 4,5 el efecto es menos acusado pero los niveles máximos de etanol son menores que a $\text{pH}_i=5,5$.

Esta disminución de la concentración de etanol a partir de la máxima alcanzada, puede ser debida a que *Hansenula polymorpha* consume parte del propio etanol que produce. Efecto similar, aunque menos acusado, se ha observado en otras levaduras, y concretamente en *Pachysolen tannophilus* en determinadas condiciones de operación cuando en el medio quedaba una concentración de xilosa inferior aproximadamente a $0,5 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$, Castro Galiano (1989).

La velocidad específica de producción de etanol, q_E^D , se ha determinado mediante la ecuación [5.17], una vez que se había calculado el parámetro "e". También en esta serie, q_E^D disminuirá con el tiempo ya que la tasa volumétrica, $dE/dt=e$, es constante en el intervalo donde se puede aplicar la ecuación.

Los valores de q_E^D obtenidos se recogen en la Tabla 5.7 para dos tiempos de cada experimento, 20 y 50 h. También se incluye el experimento base, $pH_i=5,5$, observándose en éste los valores más altos de q_E^D , mientras que los valores más pequeños aparecen en los cultivos de pH_i más bajo. En todos los casos se detecta una acusada disminución cuando se pasa de 20 a 50 h.

TABLA 5.7
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

(*Hansenula polymorpha*)

INFLUENCIA DEL pH INICIAL

$s_0 = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ $Q = 0,0 \text{ v/v/min}$

EXPTO.	pH_i	t h	$q_E^D \cdot 10^2$ $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$q_E \cdot 10^2$ $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
H-P1	3,5	20,0	0,12	0,11
		50,0	0,045	0,043
H-P2	4,5	20,0	0,11	0,12
		50,0	0,043	0,047
H-B	5,5	20,0	0,32	0,30
		50,0	0,11	0,10
H-P3	6,5	20,0	0,19	0,25
		50,0	0,075	0,10

Para comprobar si los rendimientos en etanol y xilitol permanecen constantes, según las ecuaciones [5.8] y [5.9], se han llevado a cabo representaciones de las concentraciones de etanol y xilitol frente a la concentración de xilosa consumida, obteniéndose en todos los casos gráficos similares al que se muestra en la Figura 5.9 que corresponde al experimento H-P3. Se observa, en cada uno de los cultivos de la serie, que los puntos experimentales se ajustan aceptablemente a una recta, lo que indica que los rendimientos se podrían considerar constantes en el transcurso del experimento.

En etanol, la hipótesis de que el rendimiento permanezca constante está más justificada que en xilitol, ya que existen más datos experimentales que la confirman. Por ello, se diferencia entre el rendimiento global en etanol, $Y_{E/s}^G$, y el rendimiento en

xilitol, simbolizado en la forma $\bar{Y}_{Xi/s}$. Este último puede tener un significado similar al encontrado en la bibliografía, Slininger y col. (1982), cuando se determina el rendimiento empleando sólo la máxima concentración de bioproducto formado respecto al sustrato consumido en ese instante. En estos casos se suele hablar de un "rendimiento puntual", aunque en este estudio se ha pretendido apoyarlo con más datos experimentales.

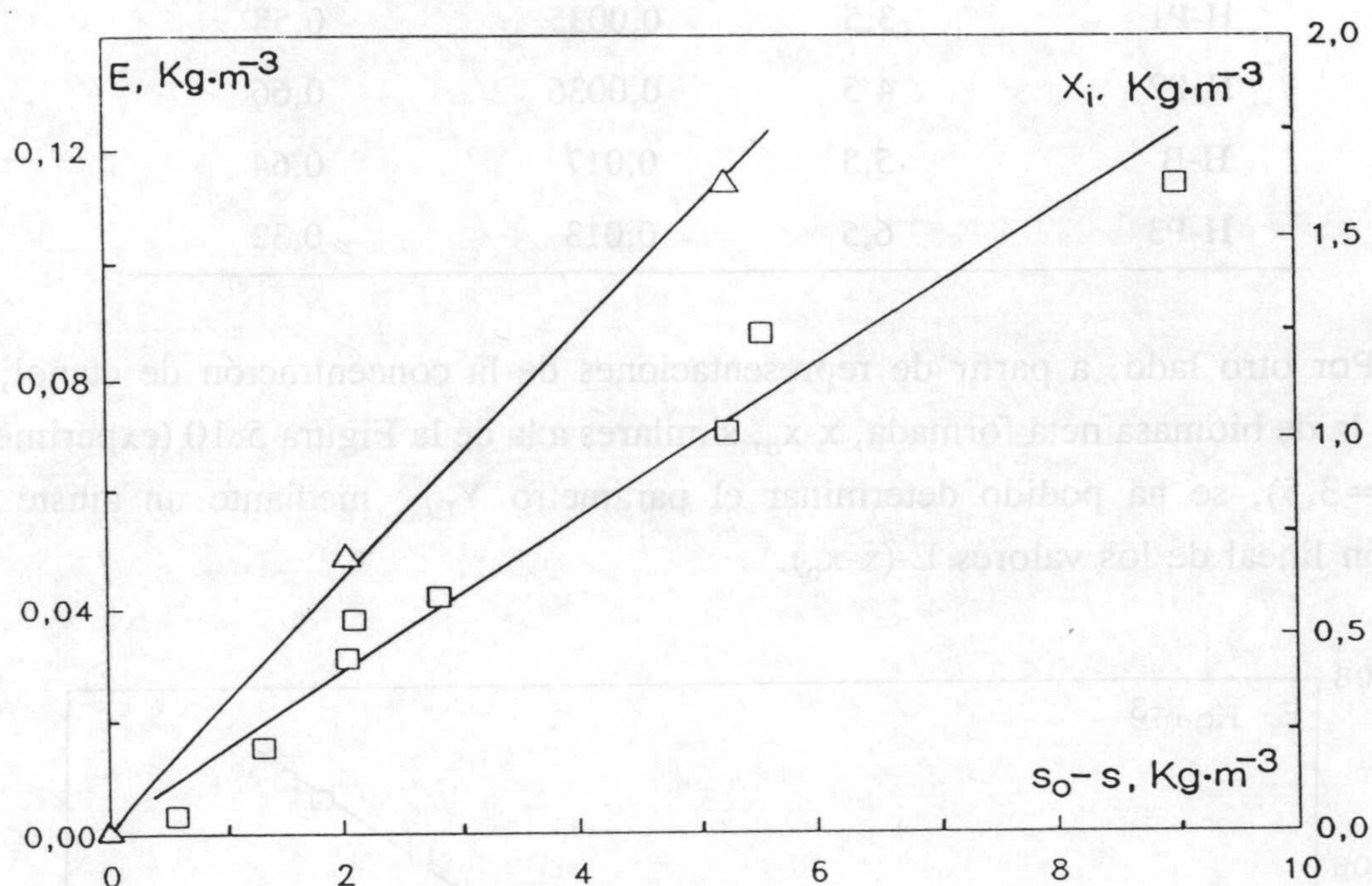


Fig. 5.9.- Rendimientos en etanol (□) y xilitol (Δ) del experimento H-P3 (pH_i=6,5)

Los valores de $Y_{E/s}^G$ e $\bar{Y}_{Xi/s}$ obtenidos se muestran en la Tabla 5.8, observándose que los rendimientos en etanol más altos se alcanzan a pH_i 5,5 y 6,5, mientras que los de xilitol, considerablemente más elevados, se obtienen a los pH_i centrales, 4,5 y 5,5.

TABLA 5.8
RENDIMIENTOS EN ETANOL Y XILITOL
(Hansenula polymorpha)

INFLUENCIA DEL pH INICIAL

$$s_0 = 25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3} \quad Q = 0,0 \text{ v/v/min}$$

EXPTO.	pH _i	$Y_{E/s}^G$ Kg·Kg ⁻¹	$\dot{Y}_{Xi/s}$ Kg·Kg ⁻¹
H-P1	3,5	0,0035	0,58
H-P2	4,5	0,0036	0,66
H-B	5,5	0,017	0,64
H-P3	6,5	0,013	0,32

Por otro lado, a partir de representaciones de la concentración de etanol, E, frente a la de biomasa neta formada, $x-x_0$, similares a la de la Figura 5.10 (experimento de pH_i=3,5), se ha podido determinar el parámetro $Y_{E/x}$, mediante un ajuste por regresión lineal de los valores E-($x-x_0$).

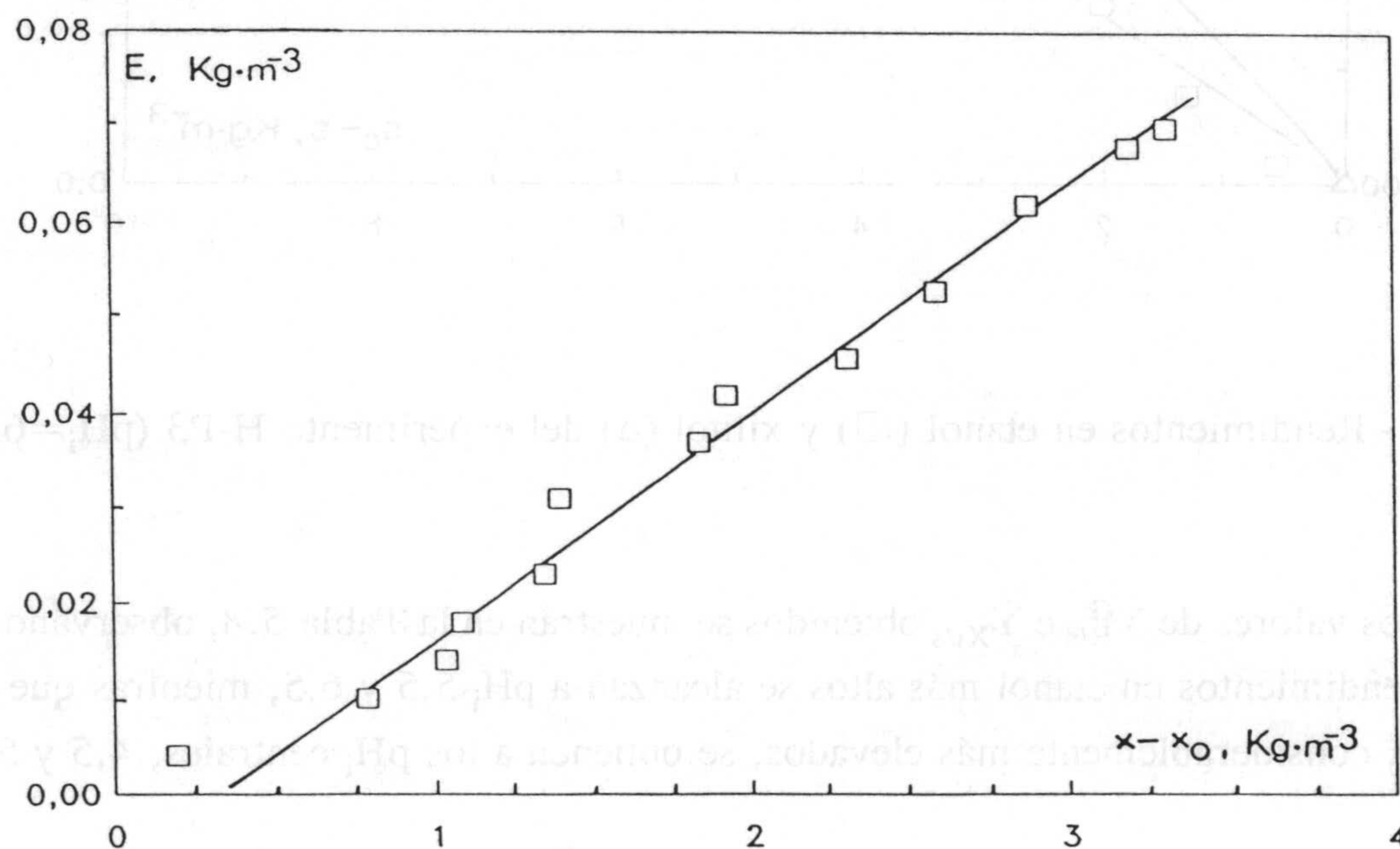


Fig. 5.10.- Etanol producido frente a biomasa neta formada, experimento H-P1 (pH_i=3,5)

Posteriormente, con $Y_{E/x}$, y una vez que se ha calculado el valor de μ correspondiente al período de crecimiento lineal, por aplicación de la ecuación [5.18] se ha podido determinar el valor de la velocidad específica de producción de etanol, q_E . Estos valores se recogen en la Tabla 5.7, con objeto de realizar una mejor comparación con q_E^D . En todos los casos el valor de la velocidad específica de producción de etanol calculada por ambos procedimientos es muy próximo. Una vez más, este hecho puede significar que, para esta levadura y en estas condiciones de operación, los valores de $Y_{E/x}^G$ representan prácticamente productividades instantáneas en etanol y que, por lo tanto, la producción de etanol está mayoritariamente asociada al crecimiento.

Considerando los resultados obtenidos con *Hansenula polymorpha* en las dos series experimentales realizadas, cabe destacar que aunque esta levadura no resulta adecuada para la obtención de etanol, sí ofrece adecuadas perspectivas para su uso en la producción de xilitol. Según algunos autores, Bolen y col. (1985), Girio y col. (1989), parece que la acumulación de xilitol en células de levaduras que crecen sobre xilosa como sustrato está relacionada con la ausencia de actividad de la enzima xilosa-reductasa.

Tratamiento con T_{100} y T_{200} que se ha utilizado el valor de μ correspondiente al período de crecimiento basal, por aplicación de la ecuación [2.15] se ha podido determinar el valor de la velocidad específica de producción de etanol μ_{et} . Estos valores se recogen en la Tabla 2, con objeto de realizar una mejor comparación con μ_{et} . En todos los casos el valor de la velocidad específica de producción de etanol es mayor que el valor de μ correspondiente al período de crecimiento basal. Este hecho puede significar que, para esta levadura y en estas condiciones de operación, los valores de μ_{et} representan prácticamente productividades intrínsecas en etanol y que, por lo tanto, la producción de etanol está mayoritariamente asociada al crecimiento.

Comparando los resultados obtenidos con *Hansenula polymorpha* en las dos series experimentales realizadas, cabe destacar que aunque esta leadura no resulta adecuada para la obtención de etanol, sí ofrece adecuadas perspectivas para su uso en la producción de xilitol, según algunos autores (Belen y col., 1982). Gido y col. (1984) parece que la acumulación de xilitol en células de levadura que crecen sobre xilosa como sustrato está relacionada con la ausencia de actividad de la enzima xilosa reductasa.

5.3 FERMENTACIÓN CON *Pachysolen tannophilus*

En las Tablas 4.8 a 4.25 del apartado de resultados experimentales se recogen para cada experimento los valores de concentración de biomasa, sustrato residual y etanol formado, en las tres series experimentales realizadas con *Pachysolen tannophilus*. Estos resultados, junto con la variación temporal del pH de los cultivos, se representan en las Figuras 4.10 a 4.21.

5.3.1 Influencia del caudal de aireación

5.3.1.1 Formación de biomasa

Los resultados de producción de biomasa obtenidos a lo largo de los cultivos de esta serie aparecen en las Tablas 4.8 a 4.12. A partir de ellos, se han calculado los correspondientes valores del logaritmo neperiano de la concentración adimensional de biomasa, $\ln(x/x_0)$; la representación de éstos frente al tiempo proporciona las curvas de crecimiento para cada experimento. En la Figura 5.11 se muestran las obtenidas para los cultivos realizados sin aporte externo de aire (excepto el provocado por la agitación, $Q=0,0$ v/v/min) y con un caudal de aire de $Q=0,3$ v/v/min.

Al igual que se observa en este caso, las curvas obtenidas para el resto de los cultivos ponen de manifiesto que la fase lag o de adaptación es prácticamente despreciable. A continuación se aprecia una fase exponencial, indicada mediante flechas en la Figura 5.11, de duración reducida, que finaliza cuando la concentración de xilosa es aún próxima a la inicial. El crecimiento celular continúa pero a una velocidad inferior a la de la fase exponencial y, finalmente, se alcanza la fase estacionaria que coincide prácticamente con el consumo total de xilosa.

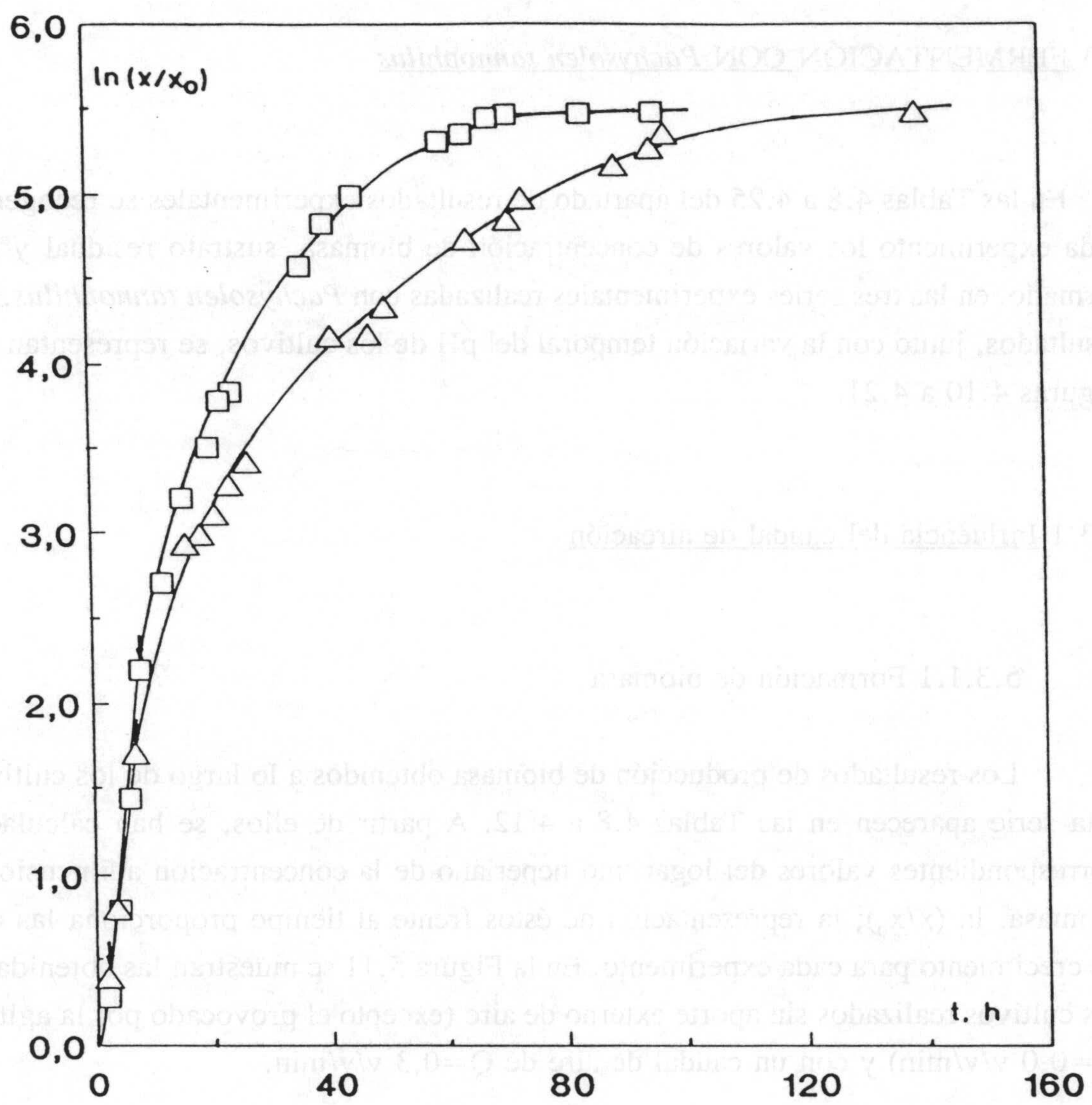


Fig. 5.11.- Curvas de crecimiento de los experimentos:
(Δ) P-A1 ($Q=0,0$ v/v/min) y (\square) P-A5 ($Q=0,3$ v/v/min)

La duración de la fase de crecimiento exponencial se ha establecido, para todos los cultivos, a partir de las representaciones de resultados experimentales; mediante ajustes por mínimos cuadrados a la ecuación [5.3], se han determinado los valores de la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , que aparecen en la Tabla 5.9.

TABLA 5.9
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO
(Pachysolen tannophilus)
INFLUENCIA DEL NIVEL DE AIREACIÓN

$s_o = 25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $\text{pH}_i = 3,5$

EXPTO.	Q v/v/min	μ_m h ⁻¹	b Kg · m ⁻³ · h ⁻¹
P-A1	0,000	0,246	0,033
P-A2	0,075	0,271	0,120
P-A3	0,150	0,284	0,096
P-A4	0,225	0,267	0,119
P-A5	0,300	0,320	0,112

Los valores de μ_m obtenidos aumentan por lo general con el caudal de aire externo aportado, mientras que cuando se empleó *Hansenula polymorpha* en análogas condiciones de operación no se observó influencia significativa de esta variable sobre el parámetro en estudio, si bien el pH inicial de los cultivos en este caso fue de 5,5. Asimismo, el valor medio encontrado para *P. tannophilus* (0,278 h⁻¹) es muy inferior al obtenido para *H. polymorpha* (0,409 h⁻¹).

En el período posterior a la fase de crecimiento exponencial puede admitirse que la biomasa aumenta linealmente con el tiempo. Las representaciones de los resultados experimentales x-t han permitido establecer la duración de este período de crecimiento, así como obtener, mediante ajuste por mínimos cuadrados a la ecuación [5.4], los valores de la productividad en biomasa, b, que se recogen, junto a los de μ_m , en la Tabla 5.9.

En el intervalo entre $Q=0,075$ y $0,300$ v/v/min, puede observarse que el nivel de aireación no influye significativamente en los valores de la productividad en biomasa; sin embargo, éstos son muy superiores a los obtenidos cuando no se aporta más caudal de aire que el debido a la agitación. Por otra parte, los valores de b obtenidos en esta serie para *Hansenula polymorpha* son, en todos los casos, sensiblemente inferiores.

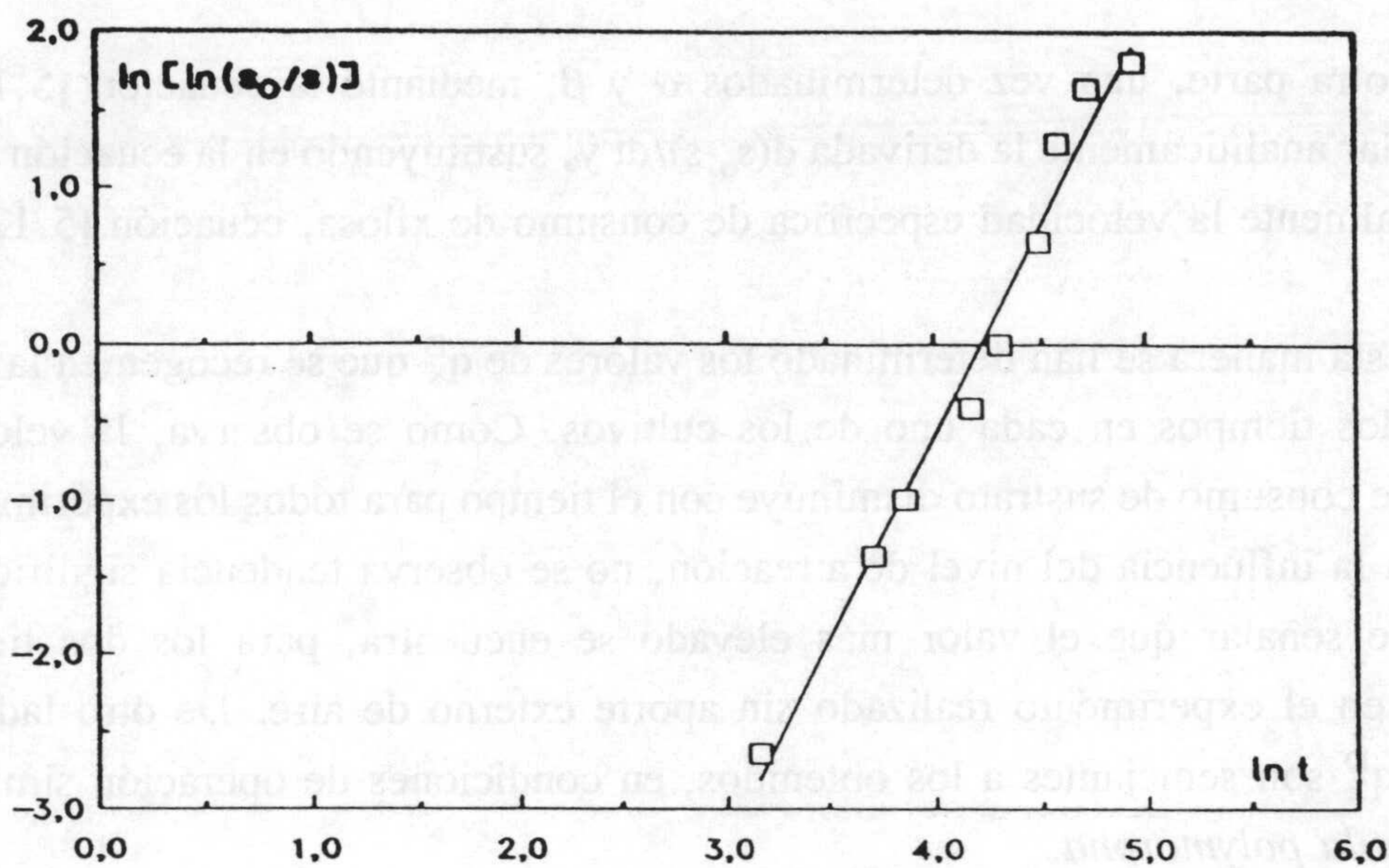
5.3.1.2 Consumo de xilosa

Los parámetros empleados para el estudio del consumo de xilosa por este microorganismo han sido la velocidad específica de consumo de sustrato, q_s , y el rendimiento global en biomasa, $Y_{x/s}^G$.

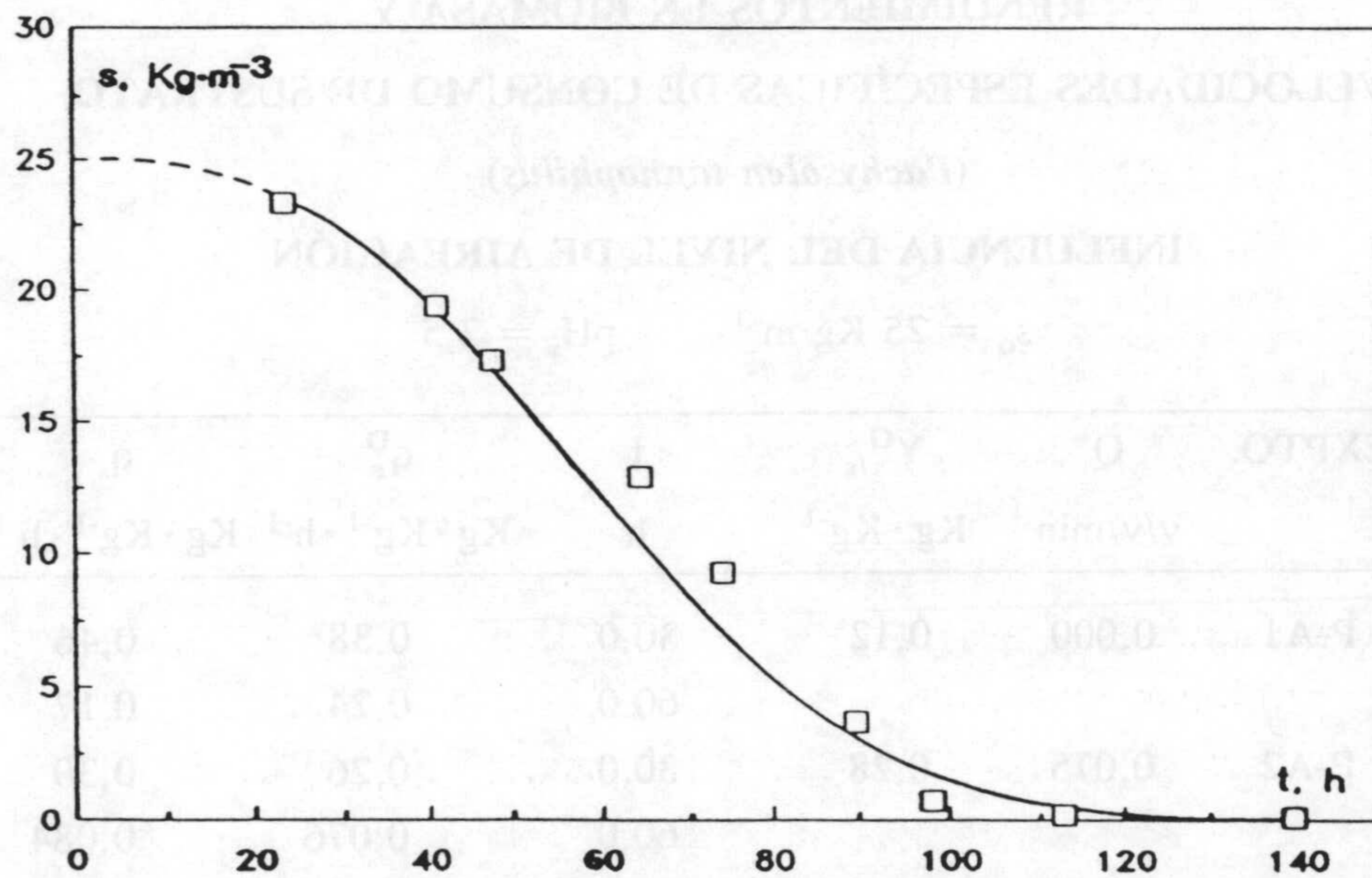
La evaluación de q_s mediante la ecuación [5.5] requiere conocer los valores de $d(s_0-s)/dt$, para lo cual podría aplicarse un procedimiento gráfico, a partir de los resultados experimentales. Sin embargo, la precisión que puede alcanzarse en el valor de la derivada es pequeña, especialmente cuando el número de puntos no es muy elevado. La dificultad de obtener esta derivada provoca que, frecuentemente, se realice un ajuste empírico de los resultados experimentales a ecuaciones que proporcionen la variación de la concentración de xilosa con el tiempo y, con posterioridad, se determina analíticamente dicha derivada.

La velocidad con que se consume el sustrato a lo largo del cultivo (lenta al principio del experimento, muy rápida después y lenta nuevamente al final) hace que no puedan emplearse ecuaciones sencillas para realizar el ajuste empírico. Para reproducir los resultados experimentales en un amplio intervalo de tiempo es necesario recurrir a expresiones más complejas, como la ecuación [5.11], cuyos parámetros pueden determinarse a partir de la forma linealizada, ecuación [5.12].

Como ejemplo, en la Figura 5.12.(a) se muestra el ajuste realizado para el experimento P-A1. A partir de representaciones semejantes para el resto de los cultivos y, mediante ajuste por mínimos cuadrados, se han determinado los parámetros α y β , lo que ha permitido obtener la curva que muestra la evolución de la concentración de xilosa con el tiempo que aparece en la Figura 5.12.(b), mientras que los puntos corresponden a los resultados experimentales. En general, puede observarse un ajuste aceptable de los datos en el intervalo empleado.



(a)



(b)

Fig. 5.12.- a) Ajuste de los resultados experimentales de consumo de xilosa para el experimento P-A1 ($Q=0,0$ v/v/min).

b) Reproducción de la ecuación [5.12] para el experimento P-A1

Por otra parte, una vez determinados α y β , mediante la ecuación [5.11] se puede calcular analíticamente la derivada $d(s_0-s)/dt$ y, sustituyendo en la ecuación [5.5], conocer finalmente la velocidad específica de consumo de xilosa, ecuación [5.13].

De esta manera se han determinado los valores de q_s^D que se recogen en la Tabla 5.10 para dos tiempos en cada uno de los cultivos. Como se observa, la velocidad específica de consumo de sustrato disminuye con el tiempo para todos los experimentos. En cuanto a la influencia del nivel de aireación, no se observa tendencia significativa, si bien cabe señalar que el valor más elevado se encuentra, para los dos tiempos ensayados, en el experimento realizado sin aporte externo de aire. De otro lado, los valores de q_s^D son semejantes a los obtenidos, en condiciones de operación similares, con *Hansenula polymorpha*.

TABLA 5.10
RENDIMIENTOS EN BIOMASA Y
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO
(*Pachysolen tannophilus*)
INFLUENCIA DEL NIVEL DE AIREACIÓN
 $s_0 = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ $\text{pH}_i = 3,5$

EXPTO.	Q	$Y_{x/s}^G$	t	q_s^D	q_s
	v/v/min	$\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1}$	h	$\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
P-A1	0,000	0,12	30,0	0,38	0,46
			60,0	0,24	0,17
P-A2	0,075	0,28	30,0	0,26	0,30
			60,0	0,076	0,084
P-A3	0,150	0,21	30,0	0,32	0,25
			60,0	0,052	0,096
P-A4	0,225	0,27	30,0	0,29	0,30
			60,0	0,073	0,087
P-A5	0,300	0,29	30,0	0,30	0,18
			60,0	0,017	0,069

Por otra parte, con objeto de comprobar si los rendimientos en biomasa permanecen constantes en el transcurso de los cultivos, se han realizado representaciones de la biomasa neta formada ($x-x_0$) frente al sustrato neto consumido (s_0-s), análogas a la que se incluye, a título de ejemplo, en la Figura 5.14 para el experimento realizado con un caudal de aireación de 0,075 v/v/min. En todos los casos se han obtenido ajustes aceptables a la ecuación [5.7] y, mediante ajuste por mínimos cuadrados, se han determinado los valores del rendimiento global en biomasa, $Y_{x/s}^G$, que se recogen en la Tabla 5.10.

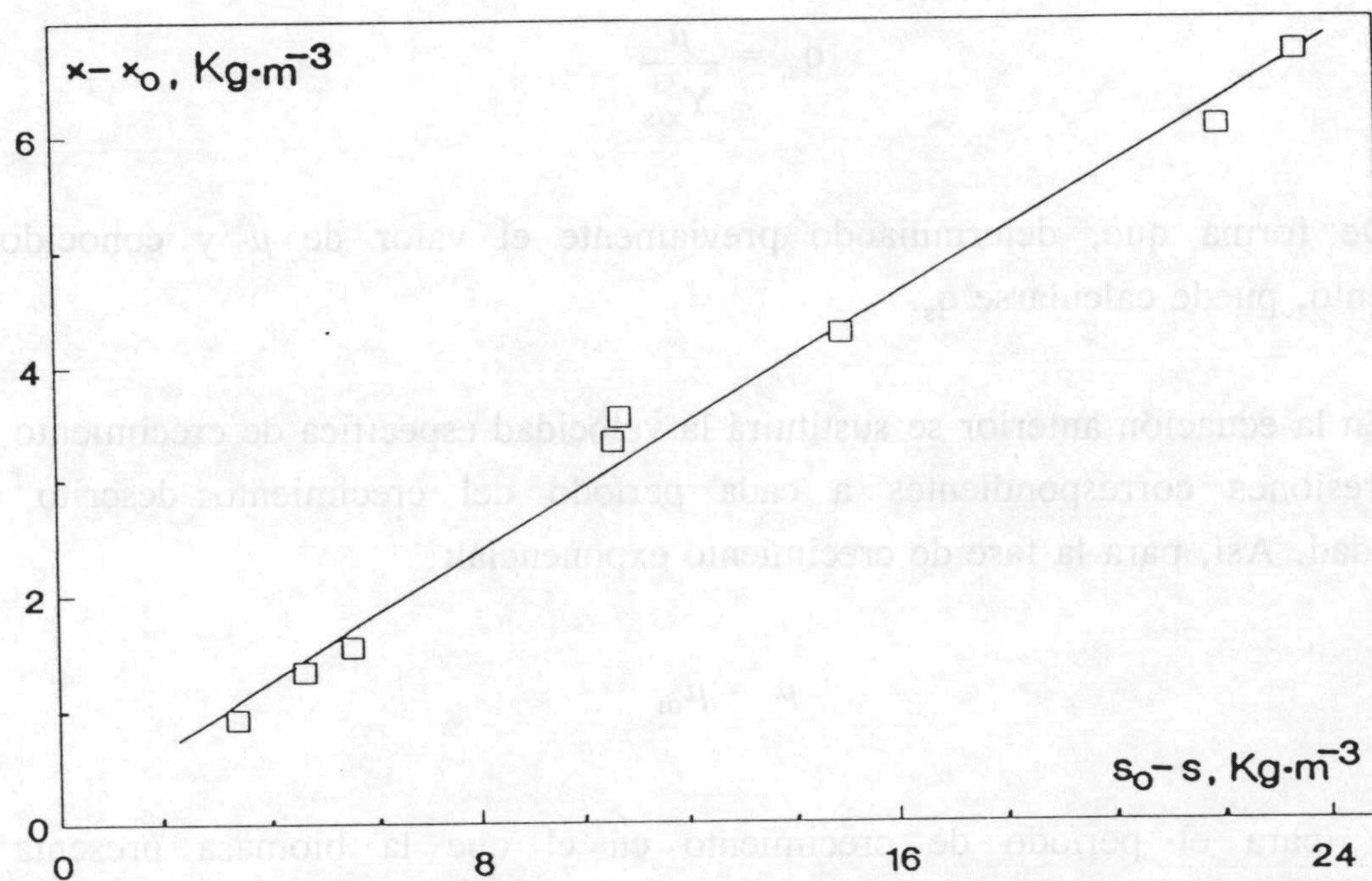


Fig. 5.13.- Rendimiento medio en biomasa, experimento P-A2 ($Q=0,075$ v/v/min)

En términos generales, el rendimiento global en biomasa permanece prácticamente constante, independiente del caudal de aire externo empleado, aunque el valor de $Y_{x/s}^G$ es muy inferior cuando no se aporta más aire que el incorporado a través del vórtice de agitación (experimento P-A1).

Con esta misma levadura, pero empleando glucosa como sustrato, se obtuvo que el rendimiento global en biomasa aumentaba, en general, con el caudal de aire suministrado, Castro Vico (1987). Igual tendencia se ha obtenido en los cultivos con *Hansenula polymorpha*, alcanzándose en este caso valores comparables.

Puesto que el rendimiento en biomasa permanece constante y, admitiendo que no existe mantenimiento celular, (es decir, $Y_{x/s} = Y_{x/s}^G$), por combinación de las ecuaciones [5.5] y [5.7] y la propia definición de velocidad específica de crecimiento, ($\mu = (1/x) \cdot dx/dt$), se puede deducir que:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}^G}$$

De forma que, determinando previamente el valor de μ y conocido el rendimiento, puede calcularse q_s .

En la ecuación anterior se sustituirá la velocidad específica de crecimiento por las expresiones correspondientes a cada período del crecimiento descrito con anterioridad. Así, para la fase de crecimiento exponencial:

$$\mu = \mu_m$$

Y para el período de crecimiento en el que la biomasa presenta un comportamiento lineal se cumple:

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{b}{x} \quad [5.15]$$

Mediante estas dos expresiones se han calculado los valores de q_s que aparecen en la Tabla 5.10, a los mismos tiempos en que se determinó q_s^D . Como se observa, se obtiene una aceptable concordancia por ambos procedimientos.

5.3.1.3 Formación de etanol

La producción de etanol se ha estudiado a través de los parámetros velocidad específica de formación, q_E , y rendimiento en etanol, $Y_{E/s}$.

Para evaluar la velocidad específica de producción de etanol, es conveniente el ajuste de los resultados experimentales Etanol-Tiempo a ecuaciones empíricas que proporcionen una aceptable reproducción de los mismos durante un intervalo de tiempo lo más amplio posible, puesto que, por las mismas consideraciones efectuadas en el apartado anterior, la evaluación de la derivada dE/dt que aparece en la expresión de q_E resultaría, de otra forma, poco precisa.

La observación de la variación de los datos de concentración de etanol en función del tiempo pone de manifiesto que, en una primera fase, la concentración aumenta muy lentamente para a continuación hacerlo con gran rapidez hasta alcanzar un valor máximo que, en general, es prácticamente coincidente con el tiempo en que se ha consumido la xilosa. Seguidamente se observa una disminución en la concentración de etanol que, en parte, sería debida a las pérdidas por evaporación pero que fundamentalmente es atribuible a la capacidad de *Pachysolen tannophilus* de asimilar etanol en ausencia de xilosa, Schneider y col. (1981) y Slininger y col. (1982).

Dado que el objetivo es establecer la velocidad específica de producción de etanol, se ensayaron diferentes ecuaciones empíricas que ajustaran exclusivamente la fase en que la concentración de etanol aumenta con el tiempo. Entre estas ecuaciones la que reproduce mejor las variaciones experimentales observadas es una de la forma:

$$\frac{E_T}{E_T - E} = A t^B \quad [5.19]$$

donde E_T representa la concentración máxima alcanzable si el rendimiento de la transformación de xilosa en etanol fuese el teórico, es decir, un mol de xilosa proporcionaría 5/3 de moles de etanol, de forma que siendo s_0 la concentración inicial de xilosa, E_T vendrá dado por:

$$E_T = s_o \cdot \frac{5}{3} \cdot \frac{46}{150} \quad [5.20]$$

que cumple con la condición inicial de que para $t=0 \rightarrow E=0$.

Para determinar los parámetros A y B se puede linealizar en la forma:

$$\ln \ln \frac{E_T}{E_T - E} = \ln \ln A + B \cdot \ln t \quad [5.21]$$

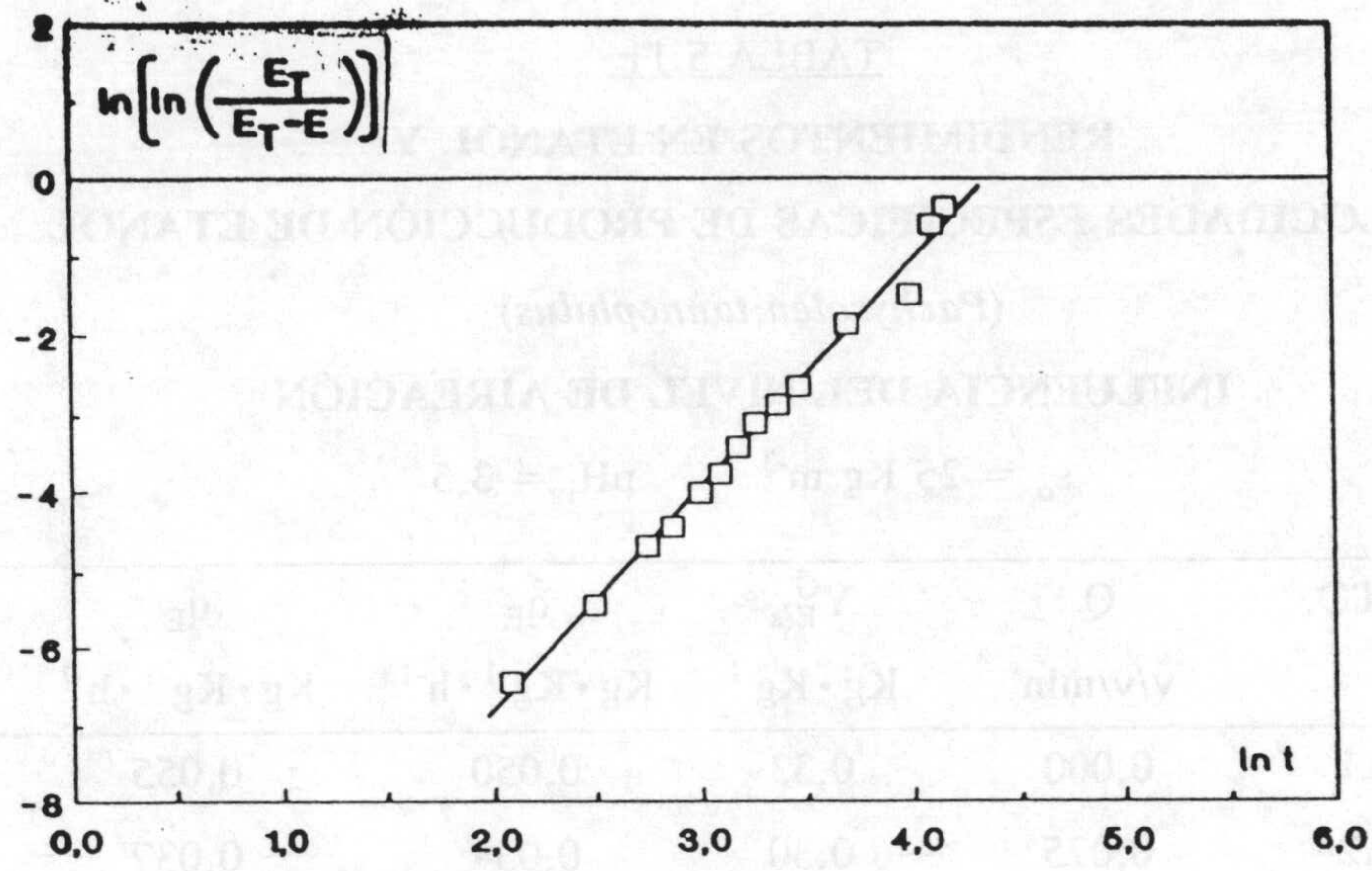
con lo que mediante ajustes por mínimos cuadrados de los valores del primer miembro frente a los del logaritmo neperiano del tiempo se pueden obtener los parámetros A y B. Como visualización de los ajustes realizados, en la Figura 5.14.(a) aparece a título de ejemplo la representación correspondiente a la ecuación [5.21] para el experimento de nivel de aireación $Q=0,150$ v/v/min. La Figura 5.14.(b) muestra la línea reproducida a partir de la ecuación [5.19], mientras que los puntos corresponden a los resultados experimentales. En general, se aprecia una aceptable reproducción en el período de validez de la ecuación propuesta.

A partir de la ecuación [5.19] se puede determinar analíticamente la derivada dE/dt y por lo tanto, sustituyendo en la ecuación [5.6], obtener la expresión para la velocidad específica de producción de etanol en función del tiempo:

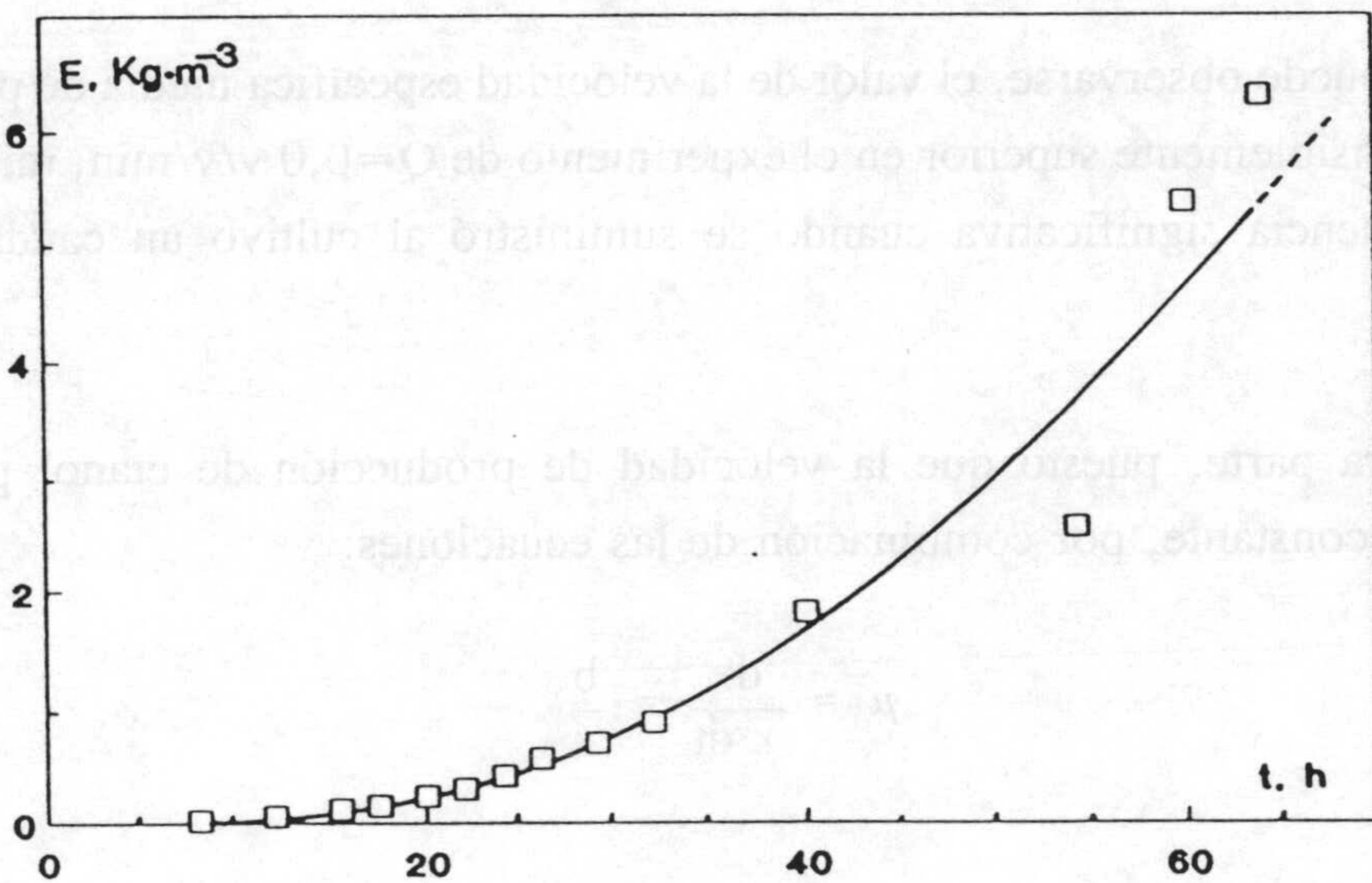
$$q_E = \frac{E_T \cdot B \cdot \ln A \cdot t^{B-1} \cdot A^{-t^B}}{x} \quad [5.22]$$

donde hay que sustituir la concentración de biomasa, x , por el valor correspondiente al tiempo considerado.

Se ha comprobado que q_E se mantiene aproximadamente constante a lo largo de los experimentos, por lo que se han calculado los valores medios para cada cultivo, \bar{q}_E , resultados que se recogen en la Tabla 5.11.



(a)



(b)

Fig. 5.14.- a) Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol a la ecuación [5.20], experimento P-A3 ($Q=0,150$ v/v/min)
 b) Reproducción de la ecuación [5.19], experimento P-A3

TABLA 5.11
RENDIMIENTOS EN ETANOL Y
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL
(*Pachysolen tannophilus*)
INFLUENCIA DEL NIVEL DE AIREACIÓN

$$s_o = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3} \quad \text{pH}_i = 3,5$$

EXPTO.	Q v/v/min	$Y_{E/s}^G$ Kg · Kg ⁻¹	\bar{q}_E Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹	q_E Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹
P-A1	0,000	0,33	0,050	0,055
P-A2	0,075	0,30	0,034	0,037
P-A3	0,150	0,27	0,039	0,038
P-A4	0,225	0,27	0,033	0,032
P-A5	0,300	0,25	0,037	0,035

Como puede observarse, el valor de la velocidad específica media de producción de etanol es sensiblemente superior en el experimento de $Q=0,0$ v/v/min, mientras que no existe influencia significativa cuando se suministró al cultivo un caudal de aire adicional.

Por otra parte, puesto que la velocidad de producción de etanol permanece prácticamente constante, por combinación de las ecuaciones:

$$\mu = \frac{dx}{x \cdot dt} = \frac{b}{x}$$

$$\frac{dE}{dx} = \frac{q_E}{\mu}$$

se deduce que:

$$\frac{dE}{x \cdot dx} = \frac{dE}{d(x^2/2)} = \frac{q_E}{b} \quad [5.23]$$

De forma que una representación de E frente a $x^2/2$, restringida al intervalo de tiempo en el que la biomasa presenta un comportamiento lineal, debe conducir a una línea recta de cuya pendiente se calcularía el valor de q_E en dicho período.

A título de ejemplo, en la Figura 5.15 se muestra la representación correspondiente al experimento realizado con $Q=0,0$ v/v/min (P-A1). A partir de representaciones análogas para el resto de los cultivos se han obtenido las respectivas pendientes que, multiplicadas por los valores de la productividad en biomasa b , proporcionan las distintas velocidades específicas de producción de etanol, q_E , que aparecen en la Tabla 5.11.

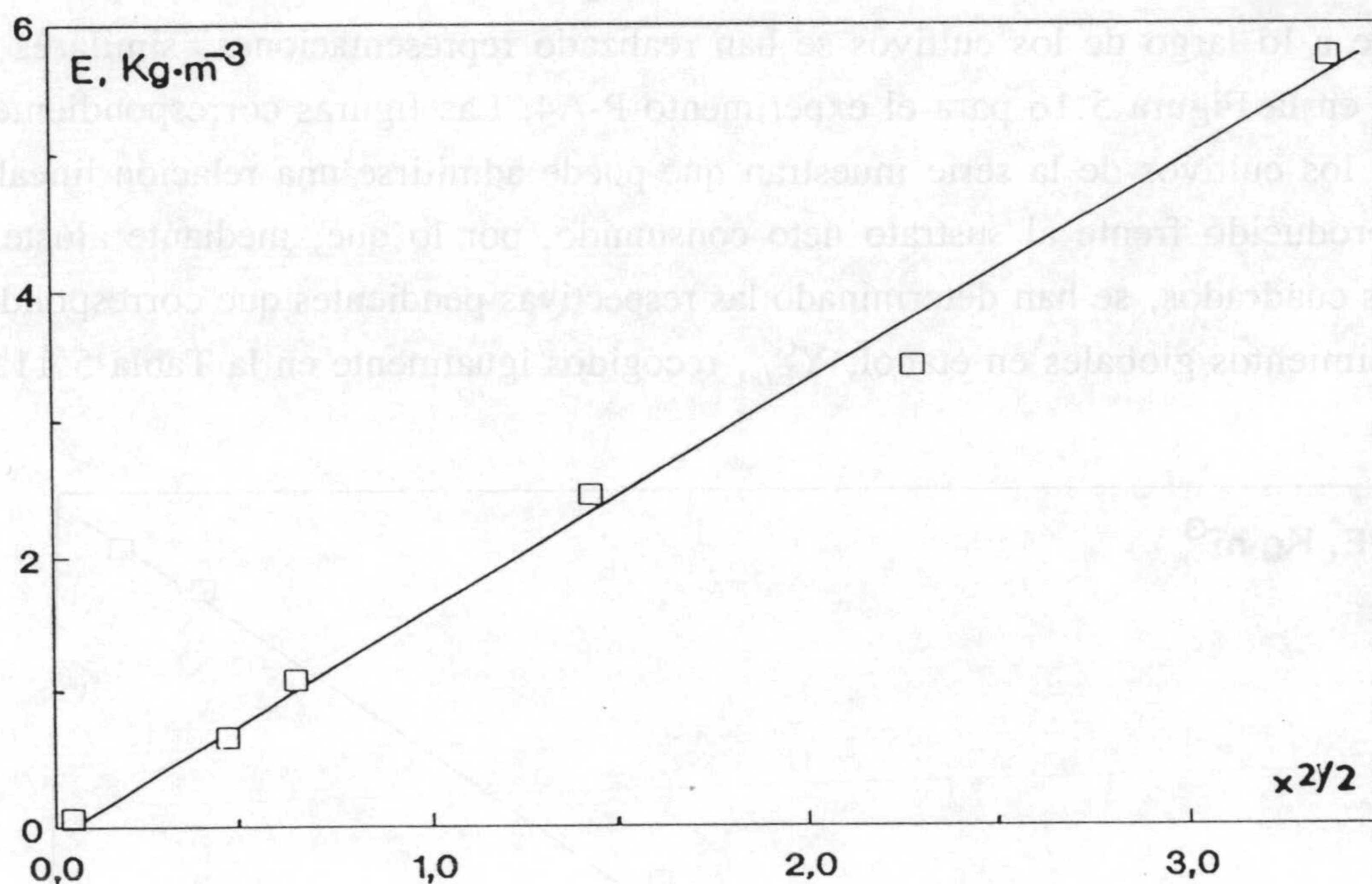


Fig. 5.15.- Representación de la ecuación [5.23] para el experimento P-A1 ($Q=0,0$ v/v/min)

Como puede apreciarse, se obtiene una gran concordancia en los resultados alcanzados por ambos procedimientos.

Los resultados obtenidos son, por otra parte, considerablemente inferiores a los encontrados con el mismo microorganismo, pero empleando glucosa como sustrato, Camacho y col (1989) y Bravo y col. (1989).

Sin embargo, los valores de q_E obtenidos en esta investigación cuando el nivel de aireación es mínimo están en concordancia con los resultados de Ligthelm y col. (1988a). Estos autores, utilizando *Pachysolen tannophilus* (NRRL Y-2460), con precultivo en condiciones aerobias y cultivo anaerobio y con un inóculo de células de 32 h (en la presente investigación es de 50 h), obtienen valores máximos del orden de $0,07 \text{ (Kg etanol)} \cdot \text{(Kg biomasa)}^{-1}$.

En cuanto al rendimiento en etanol, con objeto de comprobar si éste permanece constante a lo largo de los cultivos se han realizado representaciones similares a la incluida en la Figura 5.16 para el experimento P-A4. Las figuras correspondientes al resto de los cultivos de la serie muestran que puede admitirse una relación lineal del etanol producido frente al sustrato neto consumido, por lo que, mediante ajuste por mínimos cuadrados, se han determinado las respectivas pendientes que corresponden a los rendimientos globales en etanol, $Y_{E/s}^G$, recogidos igualmente en la Tabla 5.11.

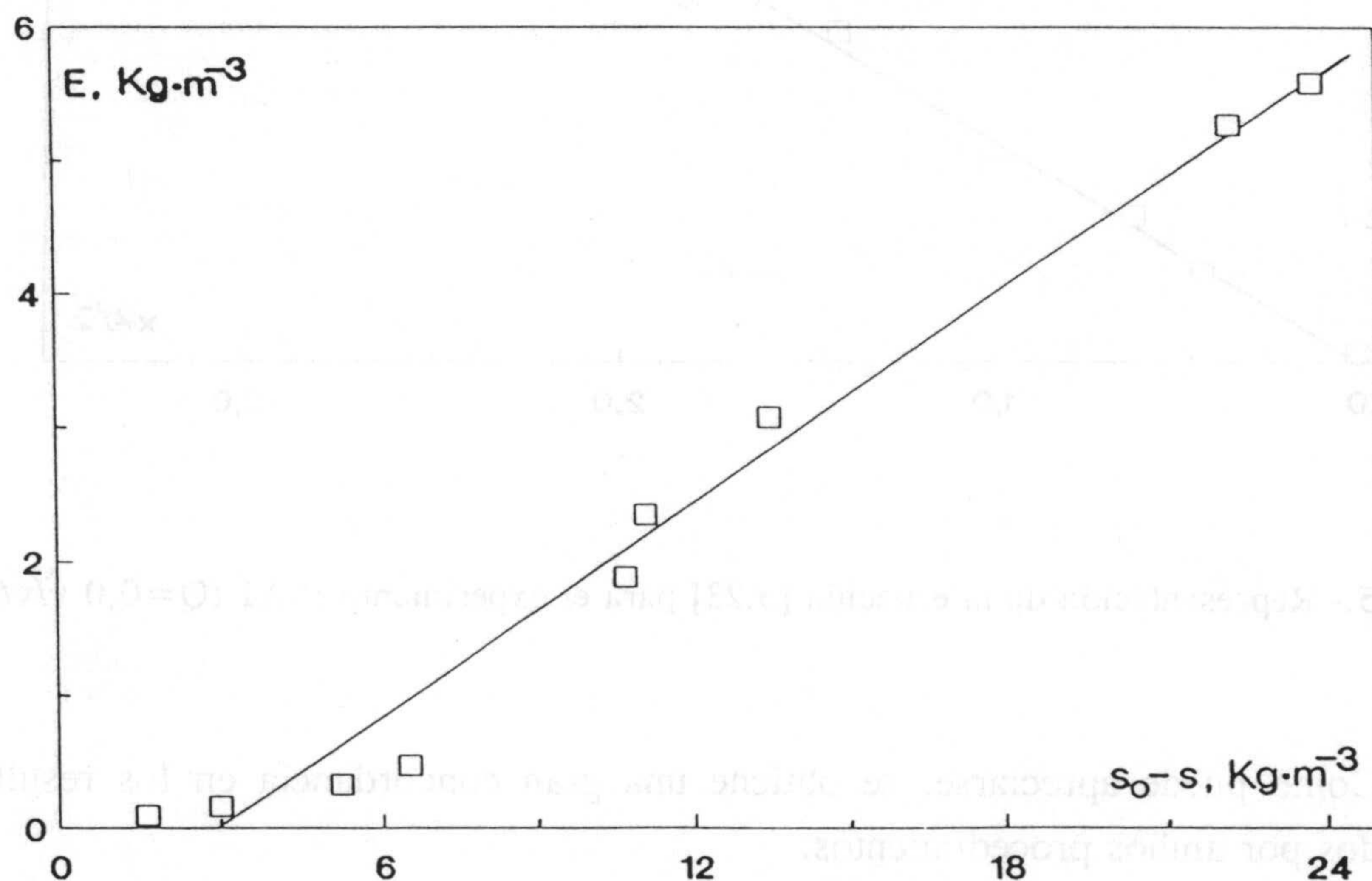


Fig. 5.16.- Rendimiento en etanol, experimento P-A4 ($Q=0,225 \text{ v/v/min}$)

Puede observarse que el mayor valor de $Y_{E/s}^G$ corresponde al experimento P-A1 ($Q=0,0$ v/v/min), mientras que al aumentar cuanto mayor es el nivel de aireación se obtiene, en general, una disminución en el valor del rendimiento global en etanol.

Los resultados obtenidos son, por otra parte, de un orden de magnitud muy superior a los alcanzados en esta misma serie con *Hansenula polymorpha*.

Como conclusión, se puede indicar que, en cuanto a la influencia del nivel de aireación del medio de cultivo sobre la fermentación con *Pachysolen tannophilus*, los mejores resultados en la obtención de etanol se producen cuando no se aporta más caudal de aire que el incorporado por el vórtice de agitación.

5.3.2 Influencia del pH inicial

5.3.2.1 Formación de biomasa

Los valores del logaritmo neperiano de la concentración adimensional de biomasa, $\ln(x/x_0)$, obtenidos a partir de las correspondientes concentraciones de biomasa se han representado frente al tiempo, con lo que se obtienen las curvas de crecimiento. En la Figura 5.17 se muestran, a título de ejemplo, las correspondientes a los cultivos con pH inicial 2,5 y 6,5. Como se observa, la fase lag es prácticamente despreciable; a continuación existe una fase exponencial (marcada entre flechas en la Figura), de duración reducida, que finaliza cuando la concentración de sustrato es aún próxima a la inicial; posteriormente sigue existiendo crecimiento celular pero a una velocidad inferior a la de la fase de crecimiento exponencial y finalmente, se alcanza una fase estacionaria que coincide con la no detección de sustrato en el medio. Análogos resultados se obtienen en el resto de los cultivos de esta serie.

A partir de dichas representaciones se ha establecido la duración para cada experimento de la fase exponencial; en este intervalo se han determinado los valores de la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , que se recogen para todos los experimentos realizados en la Tabla 5.12.

Puede observarse que no existe una influencia apreciable del pH inicial en el valor de μ_m dentro del intervalo central ensayado de 3,5 a 5,5, si bien, los valores encontrados para los pH iniciales extremos son considerablemente inferiores. El valor medio para dicho intervalo, de $0,25 \text{ h}^{-1}$, resulta inferior al obtenido en la fermentación de disoluciones de $25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ de glucosa con *Pachysolen tannophilus* de $0,33 \text{ h}^{-1}$, Camacho y col. (1989) y con *Saccharomyces cerevisiae* de $0,40$ a $0,45 \text{ h}^{-1}$, Gaden (1959), aunque prácticamente coincidente con el de $0,24 \text{ h}^{-1}$ obtenido por Slininger y col. (1982) a la temperatura de 32°C , pH inicial de 4,5 y una concentración de $50 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ de sustrato.

Por otra parte, según se aprecia en las Figuras 4.13 a 4.17, existe un período de crecimiento posterior a la fase exponencial en el que puede admitirse un comportamiento lineal de la biomasa formada con el tiempo.

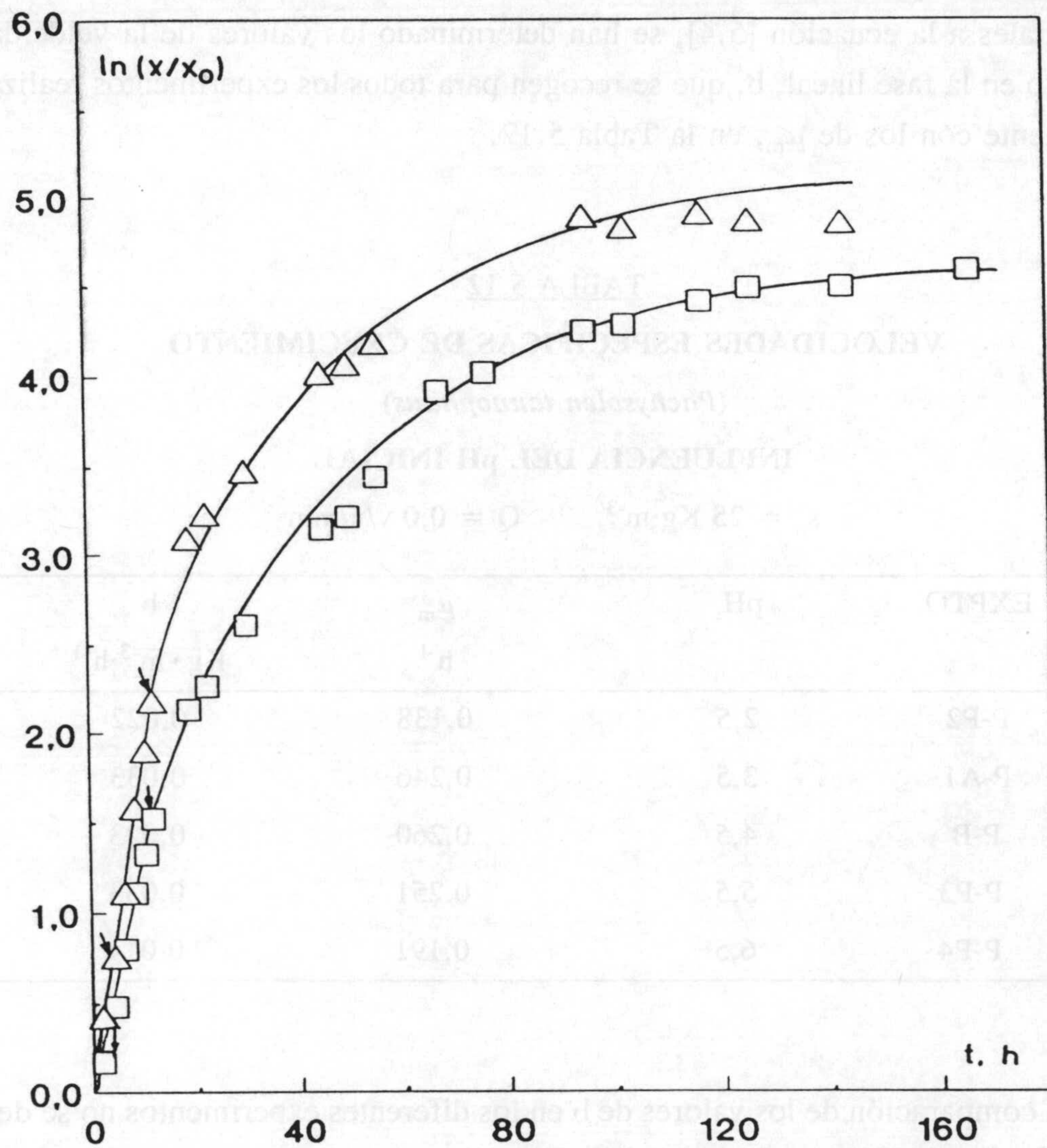


Fig. 5.17.- Curvas de crecimiento de los experimentos:
 (□) P-P2 ($pH_i = 2,5$) y (Δ) C-P3 ($pH_i = 4,0$)

Mediante ajustes por mínimos cuadrados de los correspondientes resultados experimentales a la ecuación [5.4], se han determinado los valores de la velocidad de crecimiento en la fase lineal, b , que se recogen para todos los experimentos realizados, conjuntamente con los de μ_m , en la Tabla 5.12.

TABLA 5.12
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO
(Pachysolen tannophilus)
INFLUENCIA DEL pH INICIAL
 $s_o = 25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $Q = 0,0 \text{ v/v/min}$

EXPTO.	pH _i	μ_m h ⁻¹	b Kg · m ⁻³ · h ⁻¹
P-P2	2,5	0,138	0,022
P-A1	3,5	0,246	0,033
P-B	4,5	0,260	0,023
P-P3	5,5	0,251	0,033
P-P4	6,5	0,191	0,014

De la comparación de los valores de b en los diferentes experimentos no se deducen tendencias muy definidas, si bien cabe señalar que los valores más reducidos son, en general, coincidentes con los más reducidos para μ_m . De forma que un crecimiento lento en la fase exponencial parece corresponder con que también lo sea en la fase lineal.

En el experimento P-P1, realizado a pH inicial 1,5, no se detectó crecimiento celular, por lo que no se han podido determinar los valores de los distintos parámetros.

5.3.2.2 Consumo de sustrato

La evaluación de q_s mediante la ecuación [5.5] requiere conocer los valores de $d(s_0-s)/dt$. La dificultad de obtener esta derivada provoca que, frecuentemente, se realice un ajuste empírico de los resultados experimentales a ecuaciones que proporcionen la variación de la concentración de xilosa con el tiempo y, con posterioridad, poder determinar analíticamente dicha derivada.

La velocidad con que se consume el sustrato a lo largo del cultivo provoca que, para reproducir los resultados experimentales en un amplio intervalo de tiempo, sea necesario recurrir a expresiones complejas, como la ecuación [5.11], cuyos parámetros pueden determinarse mediante ajustes por mínimos cuadrados a dicha ecuación linealizada.

Como ejemplo, en la Figura 5.18.(a) se muestra el ajuste realizado para el experimento P-P4, $pH_i=6,5$. La Figura 5.18.(b) muestra la línea reproducida a partir de la ecuación [5.12], una vez determinados los parámetros α y β , mientras que los puntos corresponden a los valores experimentales. En general, se obtienen ajustes aceptables en el intervalo de tiempo considerado.

La sustitución de la derivada $d(s_0-s)/dt$, determinada por este procedimiento, en la ecuación [5.11] proporciona la ecuación [5.13], mediante la cual se han calculado los valores de q_s^D en función del tiempo que se recogen en la Tabla 5.13.

En todos los casos se ha obtenido que el valor de q_s^D durante el período de comportamiento lineal disminuye con el tiempo, aunque cabe resaltar que el producto q_s^D permanece prácticamente constante durante este intervalo. Por otro lado, la velocidad específica de consumo de sustrato es menor cuanto mayor es el pH inicial.

Por otra parte, con objeto de comprobar si los rendimientos en biomasa permanecen constantes a lo largo de los cultivos, se han realizado representaciones de la biomasa neta formada, $x-x_0$, frente al sustrato neto consumido, s_0-s , similares a la que se incluye en la Figura 5.19 para el experimento con pH inicial 5,5. En todos los casos se han obtenido, por mínimos cuadrados, ajustes aceptables a la ecuación [5.7].

TABLA 5.13
RENDIMIENTOS EN BIOMASA Y
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO
(*Pachysolen tannophilus*)
INFLUENCIA DEL pH INICIAL

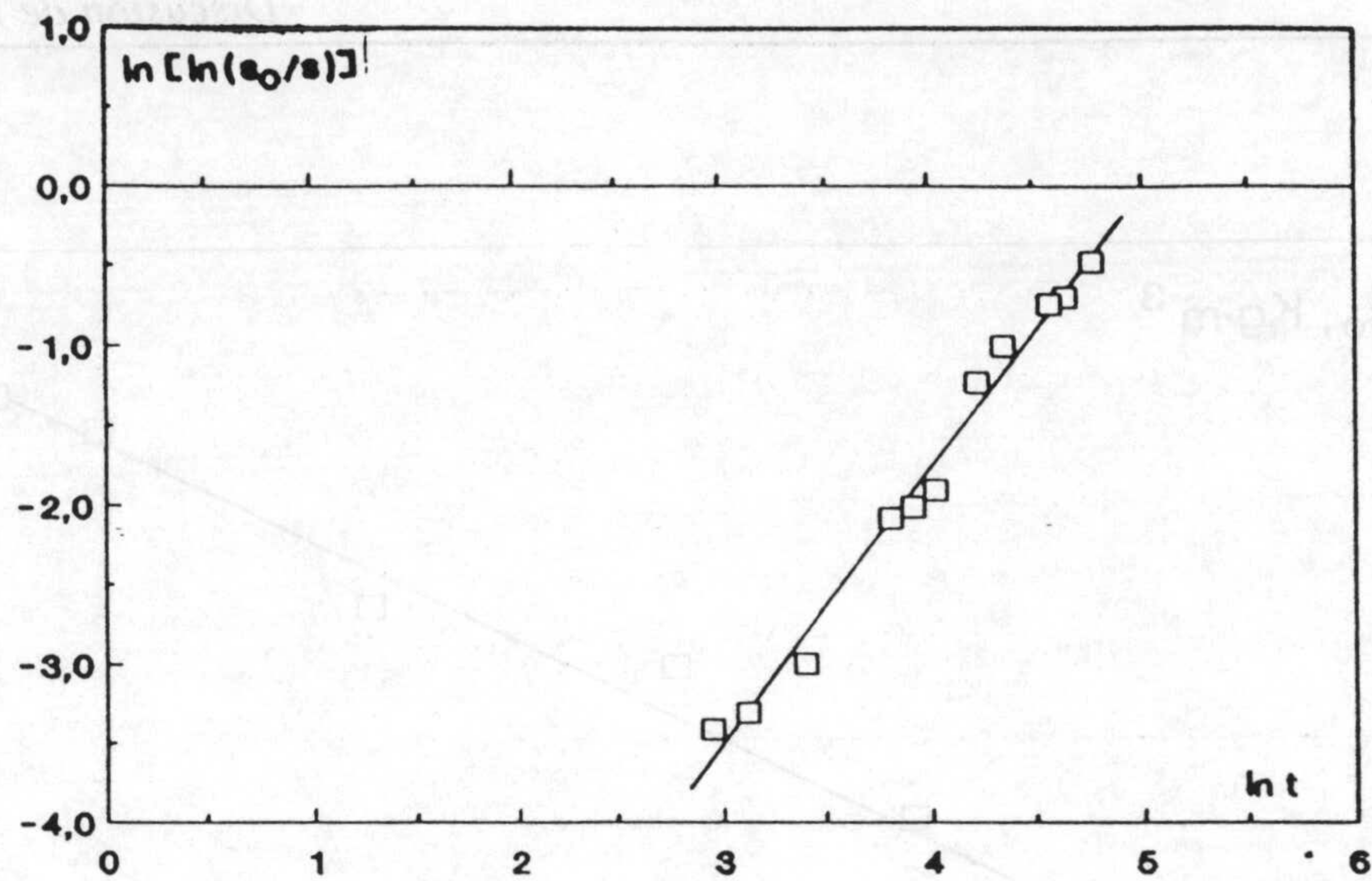
$$s_0 = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3} \quad Q = 0,0 \text{ v/v/min}$$

EXPTO.	pH _i	Y _{x/s} ^G Kg · Kg ⁻¹	t h	q _s ^D Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹	q _s Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹
P-P2	2,5	0,083	50,0	0,44	0,38
			90,0	0,16	0,15
P-A1	3,5	0,12	50,0	0,30	0,22
			90,0	0,07	0,11
P-B	4,5	0,094	50,0	0,29	0,28
			90,0	0,13	0,14
P-P3	5,5	0,11	50,0	0,24	0,22
			90,0	0,07	0,11
P-P4	6,5	0,12	50,0	0,19	0,20
			90,0	0,11	--

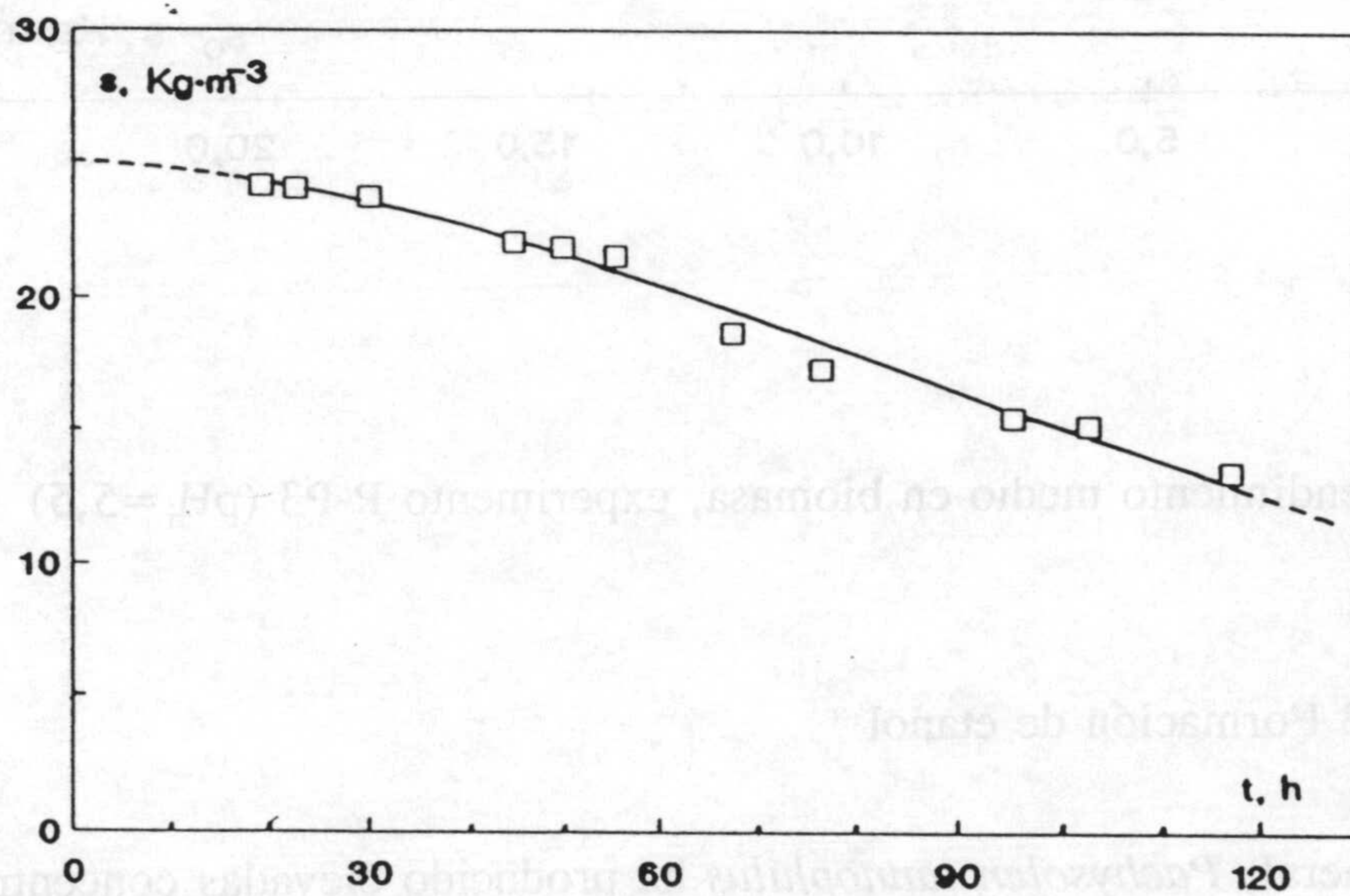
Los valores calculados mediante las pendientes representan los rendimientos globales en biomasa, $Y_{x/s}^G$, que se recogen también en la Tabla 5.13.

Puede observarse que no existe influencia significativa del valor del pH inicial sobre esta variable, aunque es necesario comentar que en el cultivo de mayor pH inicial (6,5), se paraliza prácticamente la formación de biomasa, a pesar de existir una elevada concentración de sustrato residual en el medio. De igual forma, el consumo de xilosa y la producción de etanol también se detienen.

Cuando el rendimiento en biomasa permanece constante a lo largo del experimento y, admitiendo que no existe mantenimiento celular o que es despreciable, puede calcularse, según la ecuación [5.14], la velocidad específica de consumo de sustrato a partir de los valores correspondientes de μ y de $Y_{x/s}^G$. De esta forma se han determinado los valores de q_s que aparecen, junto a los de q_s^D , en la Tabla 5.13, a iguales tiempos de cultivo. En general, se han obtenidos valores similares de ambos parámetros por los dos procedimientos.



(a)



(b)

Fig. 5.18.- a) Ajuste de los datos experimentales de consumo de xilosa a la ecuación [5.12], experimento P-P4 ($\text{pH}_i=6,5$)
 b) Reproducción de la ecuación [5.11], experimento P-P4

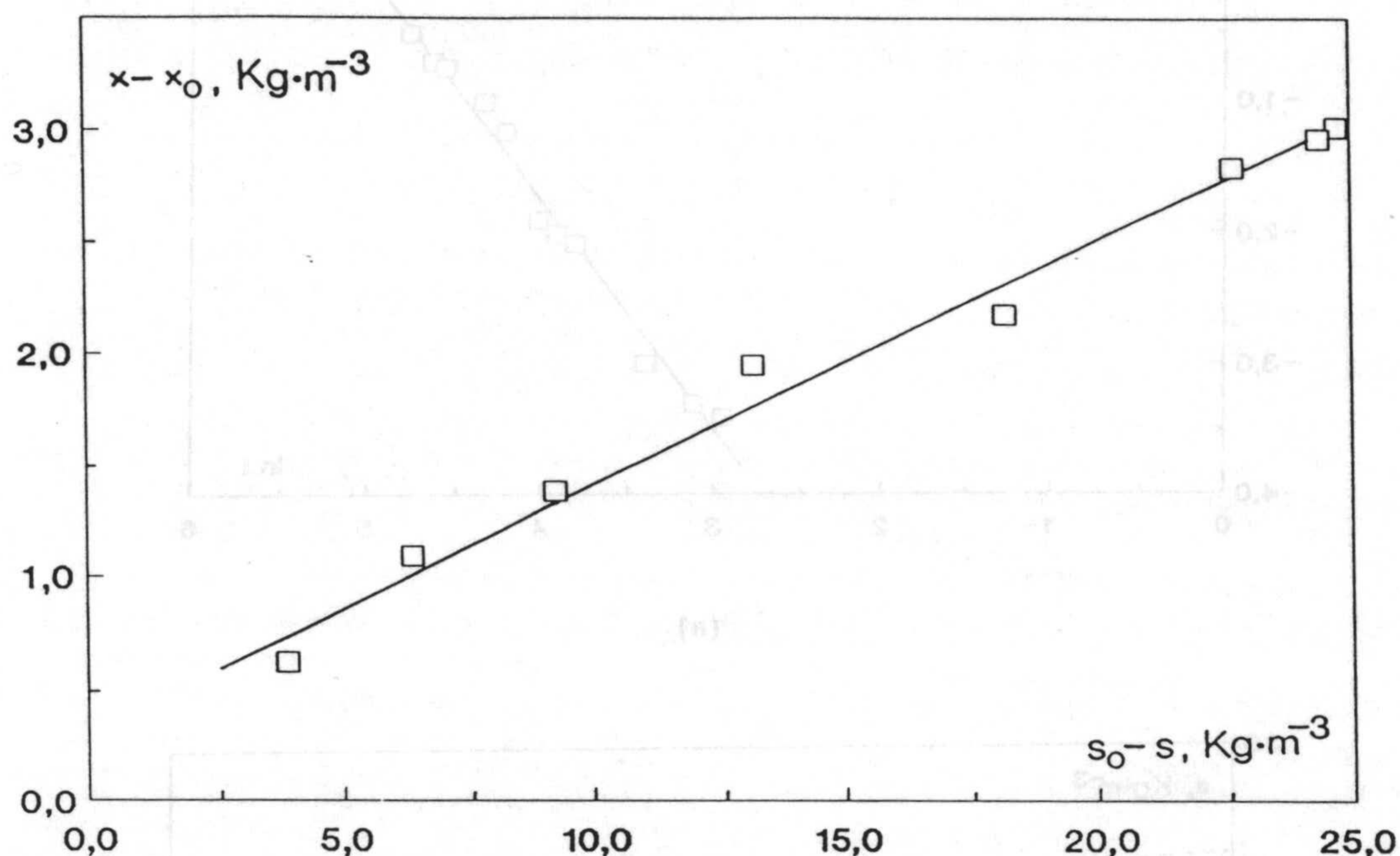


Fig. 5.19.- Rendimiento medio en biomasa, experimento P-P3 ($pH_i = 5,5$)

5.3.2.3 Formación de etanol

En general, *Pachysolen tannophilus* ha producido elevadas concentraciones de etanol. Para caracterizar la formación de este bioproducto, se ha empleado la velocidad específica de producción, q_E , definida por la ecuación [5.6], y el rendimiento global en etanol.

En cuanto a la velocidad específica de producción de etanol, la dificultad de su determinación directa por el método diferencial reside, al igual que en el caso de la velocidad específica de consumo de xilosa, en la evaluación de la velocidad de producción de etanol por unidad de volumen, dE/dt , por lo que se ha optado por efectuar un ajuste empírico de los datos E-t de cada experimento que posteriormente permita la determinación analítica de la derivada. De las ecuaciones ensayadas, la que

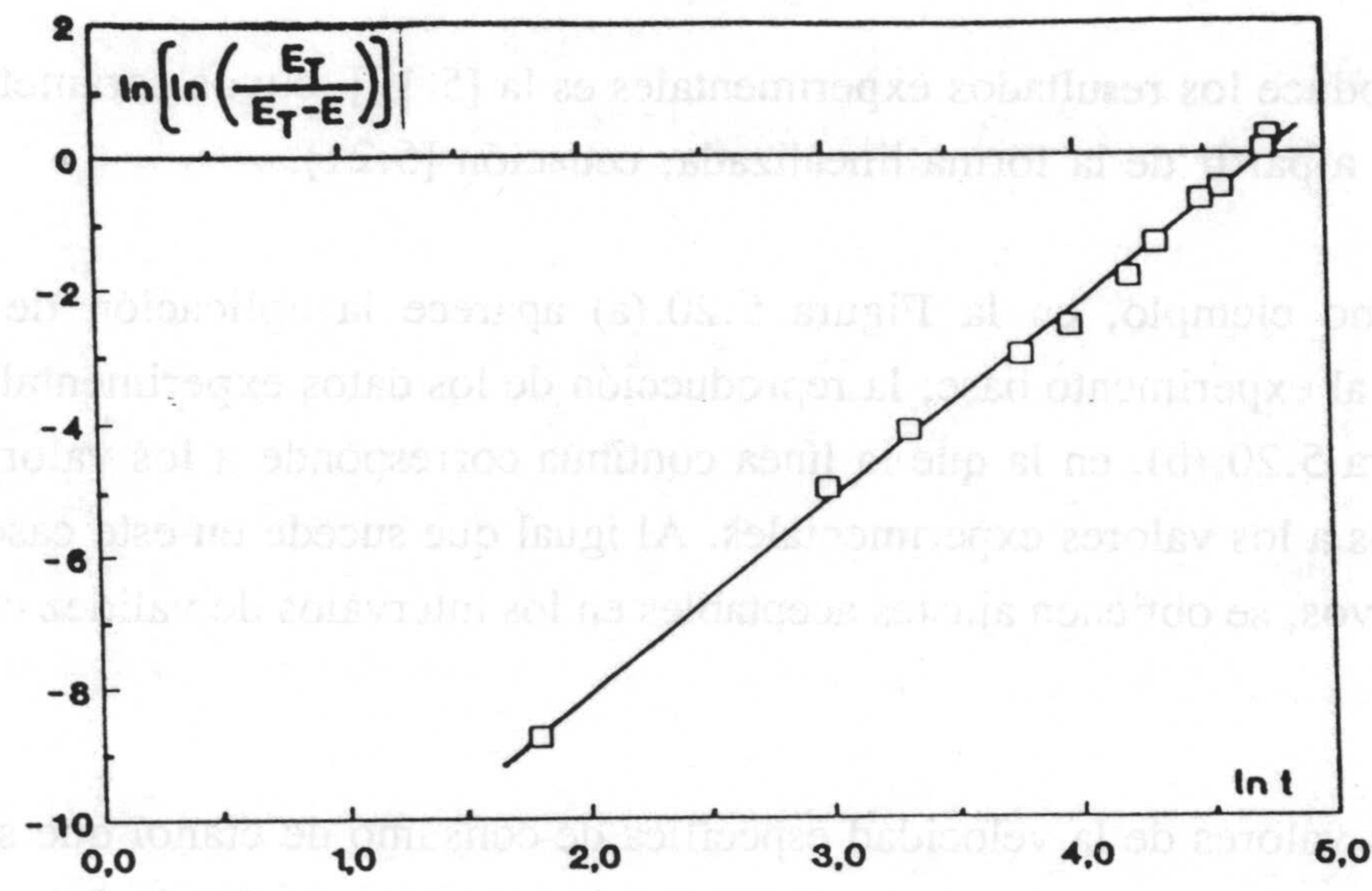
mejor reproduce los resultados experimentales es la [5.19], cuyos parámetros A y B se determinan a partir de la forma linealizada, ecuación [5.21].

Como ejemplo, en la Figura 5.20.(a) aparece la aplicación de la ecuación linealizada al experimento base; la reproducción de los datos experimentales se incluye en la Figura 5.20.(b), en la que la línea continua corresponde a los valores deducidos y los puntos a los valores experimentales. Al igual que sucede en este caso, en el resto de los cultivos, se obtienen ajustes aceptables en los intervalos de validez de la ecuación propuesta.

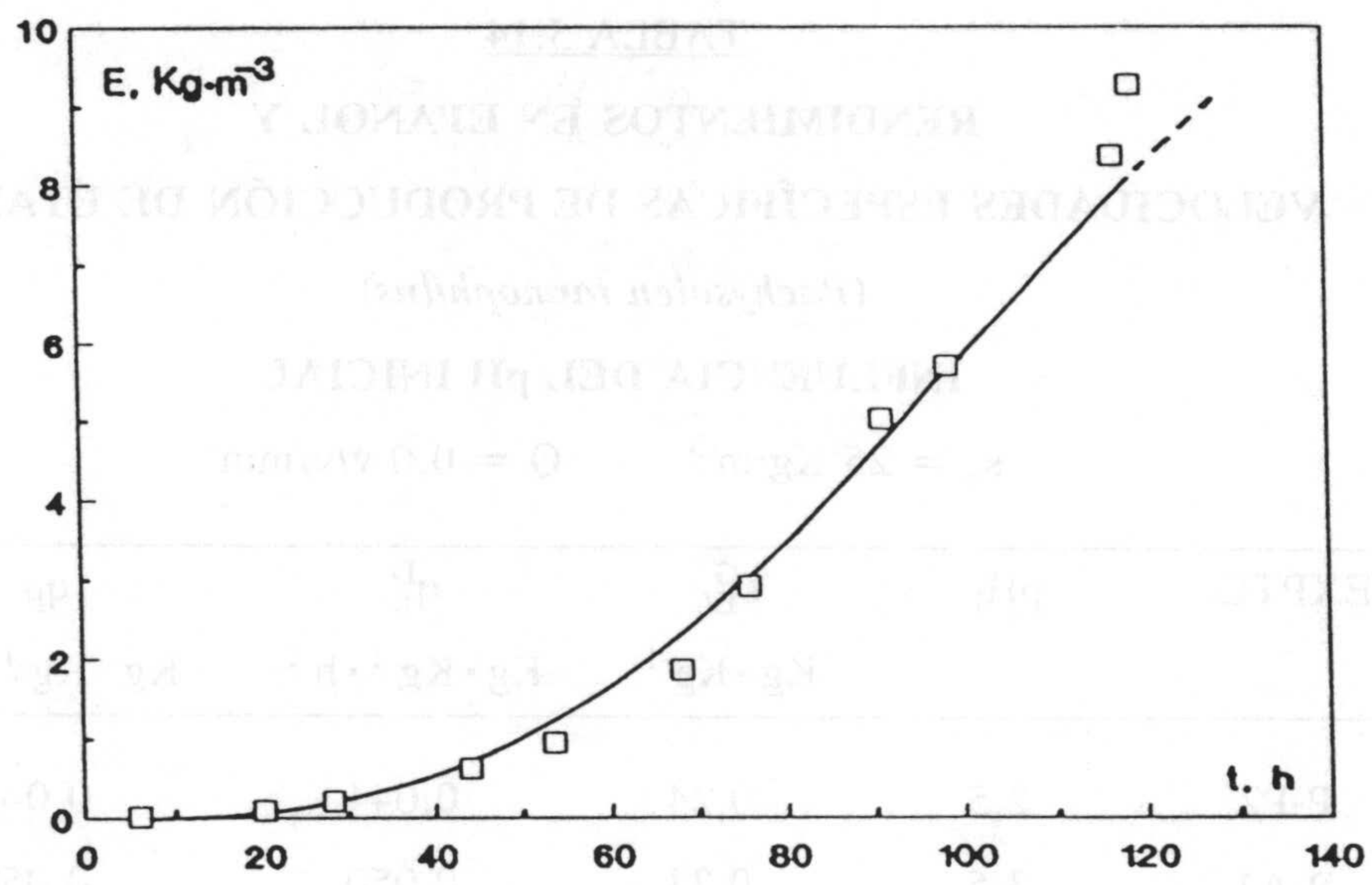
Los valores de la velocidad específica de consumo de etanol que se obtienen al determinar analíticamente la derivada dE/dt se recogen en la Tabla 5.14.

TABLA 5.14
RENDIMIENTOS EN ETANOL Y
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL
(Pachysolen tannophilus)
INFLUENCIA DEL pH INICIAL
 $s_o = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ $Q = 0,0 \text{ v/v/min}$

EXPTO.	pH _i	$Y_{E/s}^G$ Kg · Kg ⁻¹	q_E^D Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹	q_E Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹
P-P2	2,5	0,24	0,044	0,041
P-A1	3,5	0,33	0,050	0,055
P-B	4,5	0,42	0,067	0,064
P-P3	5,5	0,41	0,063	0,063
P-P4	6,5	0,086	0,013	0,012



(a)



(b)

Fig. 5.20.- a) Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol a la ecuación [5.20], experimento P-B ($pH_i=4,5$)
b) Reproducción de la ecuación [5.19], experimento P-B

En todos los casos se ha obtenido que el valor de q_E durante la fase de crecimiento lineal es prácticamente constante, por lo que según la ecuación [5.23], una representación de E frente a $x^2/2$, restringida al intervalo de tiempo en el que la biomasa presenta un comportamiento lineal, debe conducir a una línea recta de cuya pendiente se calcularía el valor de q_E en dicho período.

A título de ejemplo, en la Figura 5.21 se muestra la representación correspondiente al experimento realizado con $pH_i=2,5$ (P-P2). A partir de representaciones análogas para el resto de los cultivos se han obtenido las respectivas pendientes que, multiplicadas por los valores de la productividad en biomasa b , proporcionan las distintas velocidades específicas de producción de etanol, q_E , que aparecen en la Tabla 5.14.

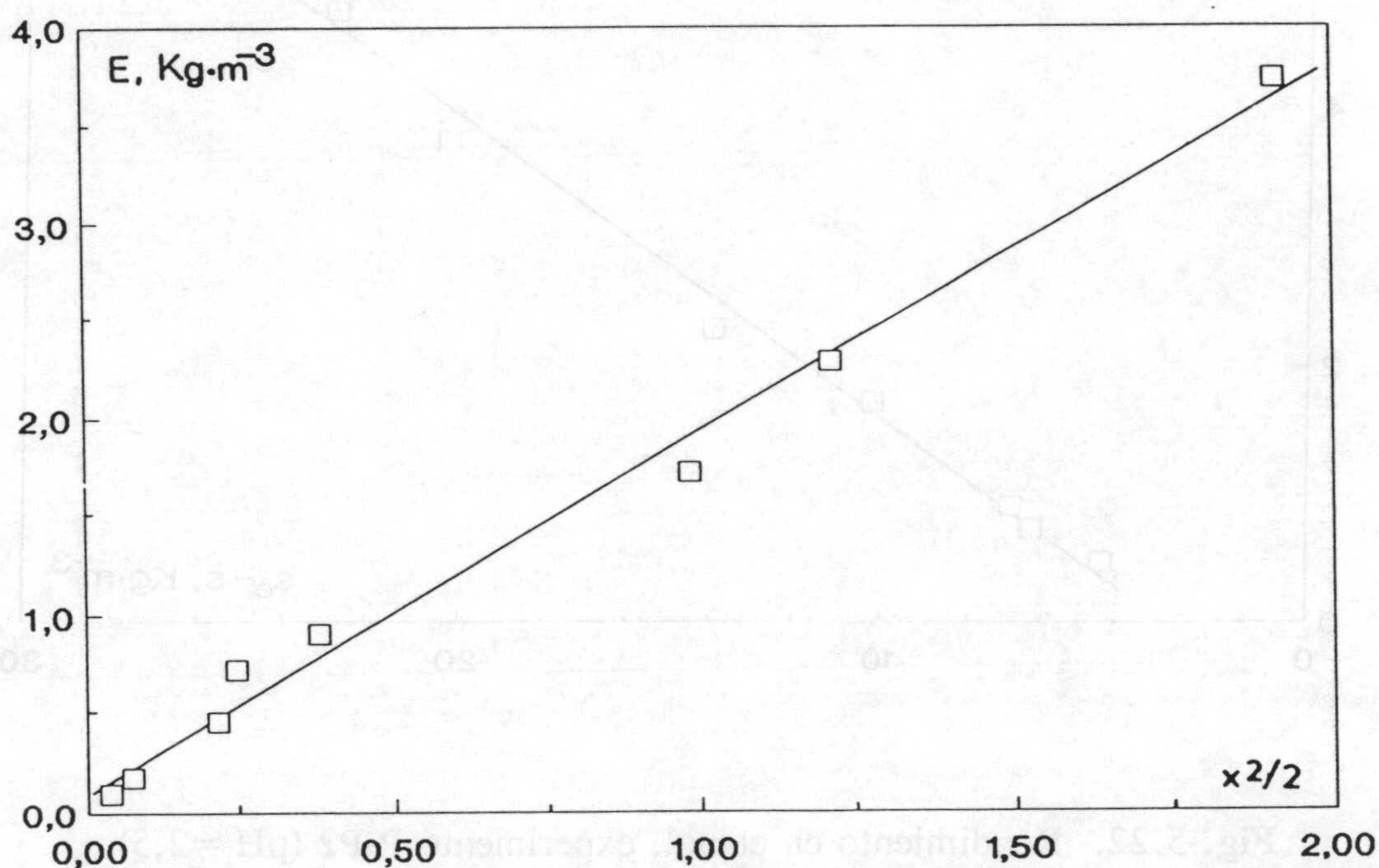


Fig. 5.21.- Representación de la ecuación [5.23], experimento P-P2 ($pH_i=2,5$)

Como puede apreciarse, se obtiene una gran concordancia en los resultados alcanzados por ambos procedimientos.

Por otra parte, a partir de representaciones gráficas de la concentración de etanol frente a la concentración de xilosa consumida, análogas a la que se muestra en la Figura 5.22 (experimento P-P2), se han determinado los rendimientos globales en etanol, para cada cultivo de la serie, cuyos valores aparecen en la Tabla 5.14.

Se observa que los mayores rendimientos en etanol corresponden a los experimentos con pH inicial de 4,5 y 5,5 para los que también se han obtenido los valores máximos para la velocidad específica de producción de etanol.

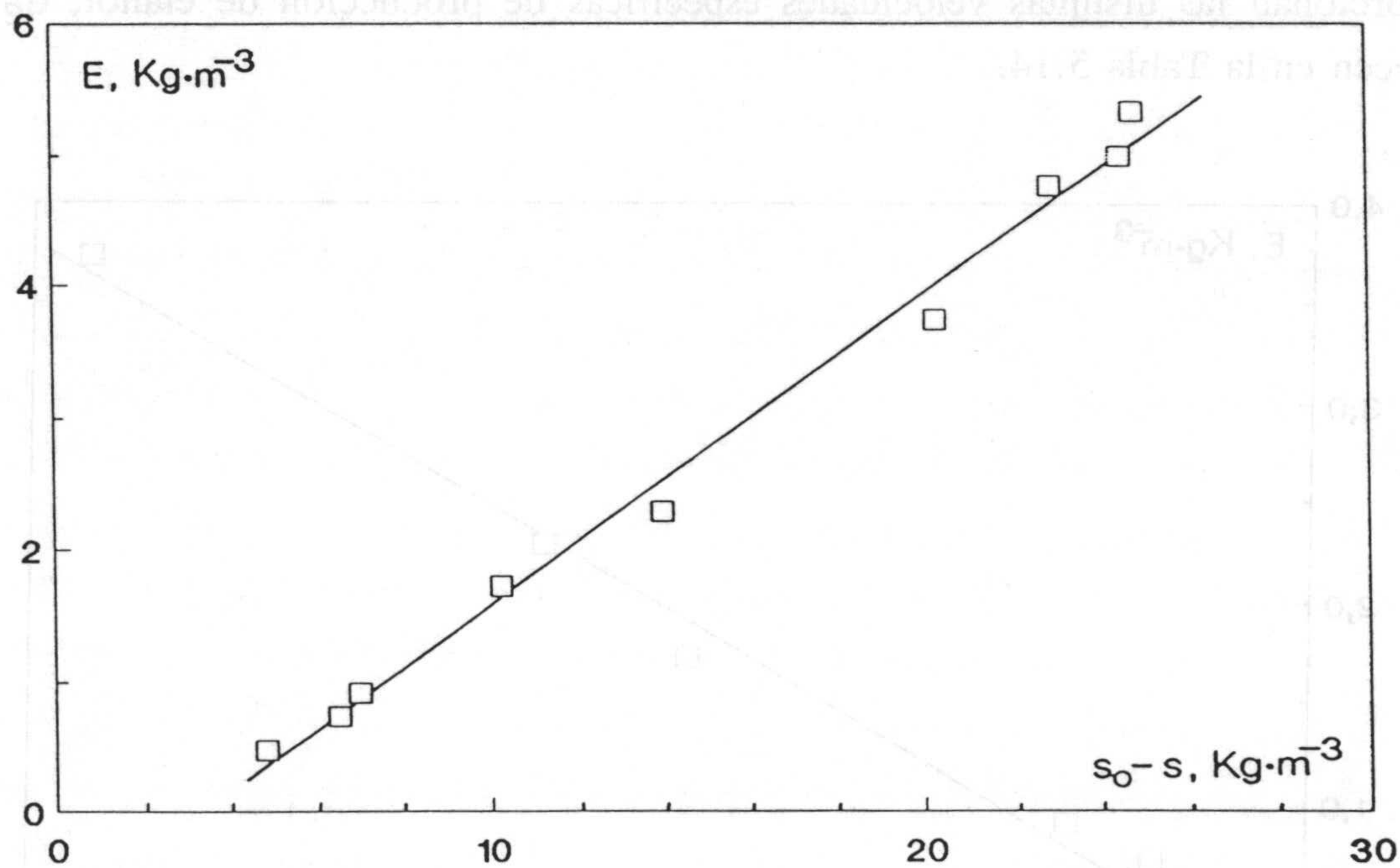


Fig. 5.22.- Rendimiento en etanol, experimento P-P2 ($\text{pH}_i=2,5$)

5.3.3 Utilización de disoluciones de xilosa y glucosa

5.3.3.1 Formación de biomasa

La Figura 5.23 corresponde a las curvas de crecimiento de los experimentos P-M1 ($s_0=24$ y $g_0=1$ Kg·m⁻³) y P-M6 ($s_0=1$ y $g_0=24$ Kg·m⁻³), obtenidas por representación de los valores de $\ln(x/x_0)$ frente al tiempo a lo largo de los cultivos.

Al igual que se observa en este caso, las curvas de crecimiento para los restantes experimentos ponen de manifiesto que la fase lag es muy reducida (del orden de dos horas como máximo).

A continuación se aprecia una fase de crecimiento exponencial, (marcada entre flechas en la figura). Sin embargo, como puede observarse, el crecimiento posterior del microorganismo depende de la proporción inicial de glucosa en el medio de cultivo; así, en los experimentos con mayor concentración inicial de glucosa (P-M6 y P-M7, correspondientes a $g_0=24$ y 25 Kg·m⁻³, respectivamente), se alcanza la fase estacionaria de crecimiento inmediatamente después de la exponencial. Por contra, en el resto de los cultivos de la serie, la fase exponencial es seguida de un período en el que se mantiene el crecimiento, aunque a menor velocidad específica, durante un amplio intervalo de tiempo que varía entre 40 y 60 horas. Finalmente se alcanza la fase estacionaria, coincidiendo prácticamente con el consumo total del sustrato.

A partir de los resultados experimentales se ha establecido la duración de la fase exponencial de crecimiento para cada cultivo y se han calculado los respectivos valores de la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , que se incluyen en la Tabla 5.15.

En general, la presencia de glucosa en el medio de cultivo eleva los valores de μ_m , si bien no existe relación significativa entre éstos y la concentración inicial de glucosa, por lo que se podría concluir que serían los correspondientes a un crecimiento exclusivo sobre glucosa en esta fase exponencial. Por otra parte, en el experimento P-M8, realizado en ausencia de ambos azúcares, se obtienen velocidades específicas comparables a las alcanzadas cuando sólo se incorpora xilosa como sustrato.

En el período posterior a la fase exponencial de crecimiento puede admitirse, para los experimentos con mayor proporción inicial de xilosa, que la biomasa crece linealmente con el tiempo. Las representaciones de los resultados experimentales de x-t han permitido determinar la duración de dicho período, así como obtener, mediante ajuste por mínimos cuadrados a la ecuación [5.4], los valores de la productividad en biomasa, b, que se recogen, junto a los de μ_m , en la Tabla 5.15.

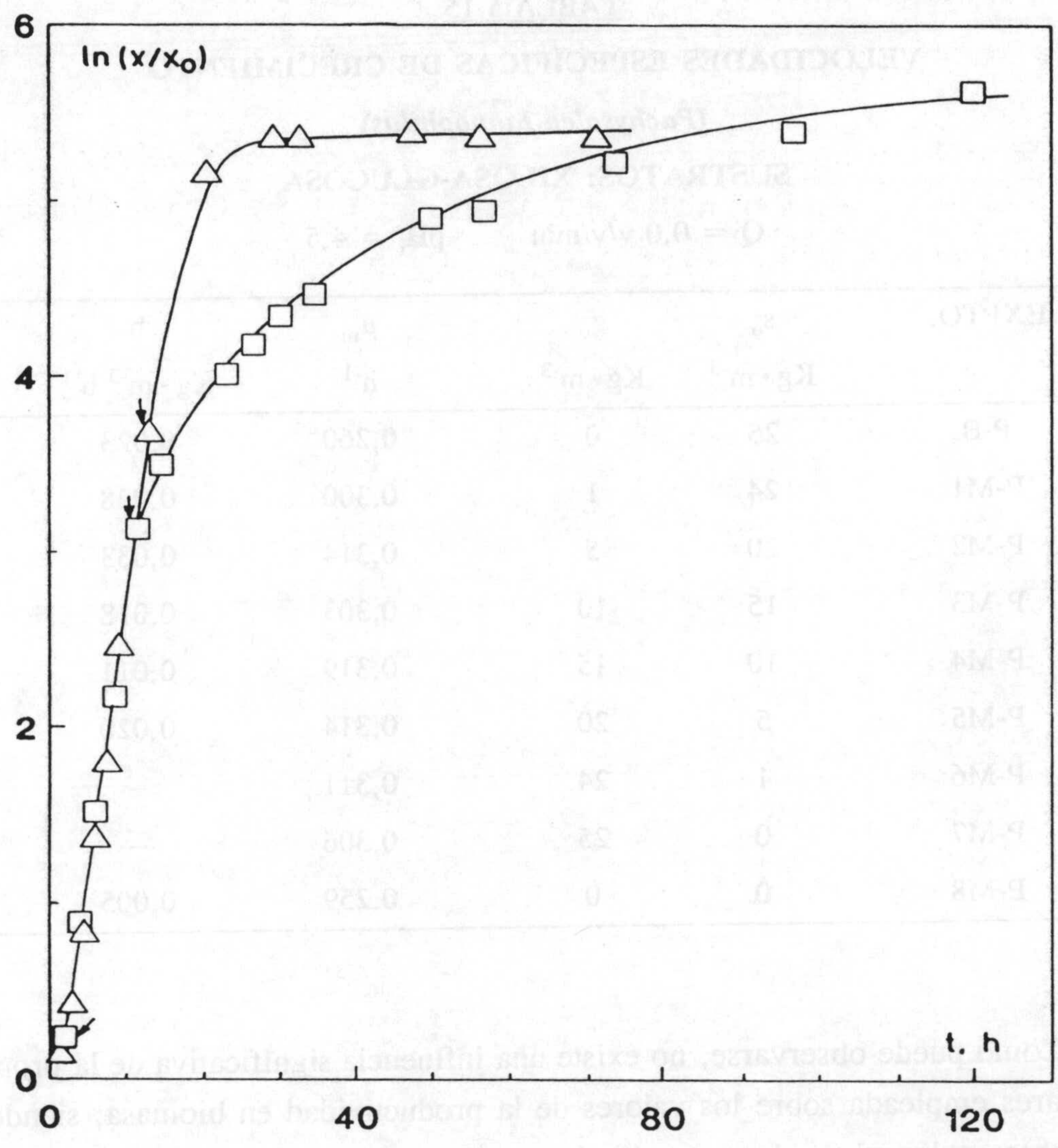


Fig. 5.23.- Curvas de crecimiento para los experimentos:
 Δ P-M1 ($s_0=24$ y $g_0=1 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
 \square P-M6 ($s_0=1$ y $g_0=24 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)

TABLA 5.15
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO
(Pachysolen tannophilus)
SUSTRATOS: XILOSA-GLUCOSA
 $Q = 0,0 \text{ v/v/min}$ $\text{pH}_i = 4,5$

EXPTO.	s_0 $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$	g_0 $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$	μ_m h^{-1}	b $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$
P-B	25	0	0,260	0,023
P-M1	24	1	0,300	0,028
P-M2	20	5	0,314	0,033
P-M3	15	10	0,303	0,018
P-M4	10	15	0,319	0,011
P-M5	5	20	0,314	0,020
P-M6	1	24	0,311	--
P-M7	0	25	0,306	--
P-M8	0	0	0,259	0,005

Como puede observarse, no existe una influencia significativa de la proporción de azúcares empleada sobre los valores de la productividad en biomasa, siendo éstos comparables a los obtenidos con el mismo microorganismo cuando sólo se empleó xilosa como sustrato.

5.3.3.2 Consumo de sustrato

A partir de los resultados experimentales obtenidos (Tablas 4.18 a 4.25), se observa que *Pachysolen tannophilus* realiza un consumo sucesivo de los dos sustratos empleados: en primer lugar se emplea glucosa; el consumo tiene lugar durante las veinte primeras horas de cultivo. A continuación puede apreciarse un período en el cual la producción de biomasa, el consumo de sustrato y la formación de etanol se detienen o aumentan muy levemente; la duración de este intervalo varía con las concentraciones iniciales de sustratos y es especialmente significativa en los cultivos con parecidas

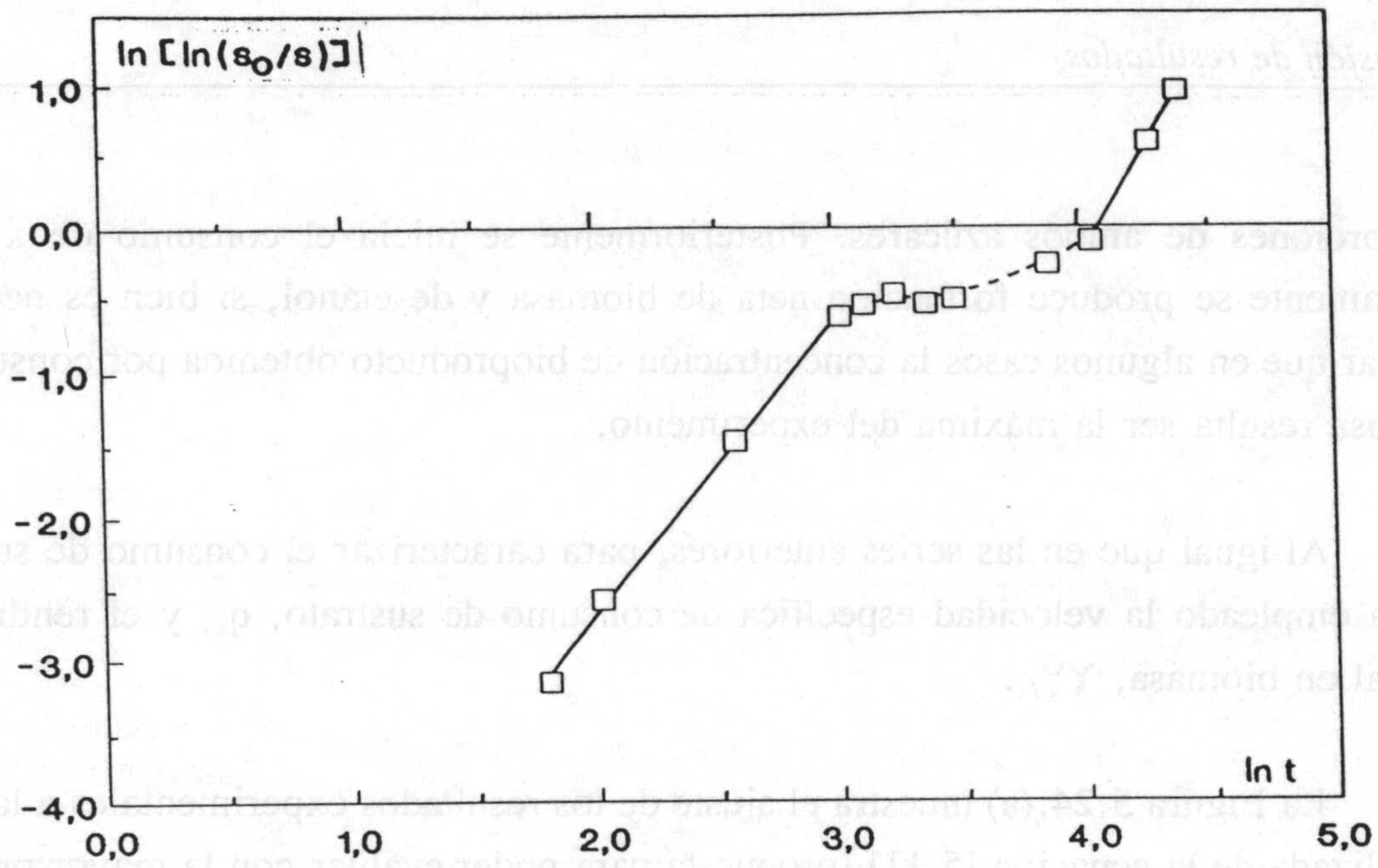
proporciones de ambos azúcares. Posteriormente se inicia el consumo de xilosa y nuevamente se produce formación neta de biomasa y de etanol, si bien es necesario indicar que en algunos casos la concentración de bioproducto obtenida por consumo de glucosa resulta ser la máxima del experimento.

Al igual que en las series anteriores, para caracterizar el consumo de sustratos se ha empleado la velocidad específica de consumo de sustrato, q_s , y el rendimiento global en biomasa, $Y_{x/s}^G$.

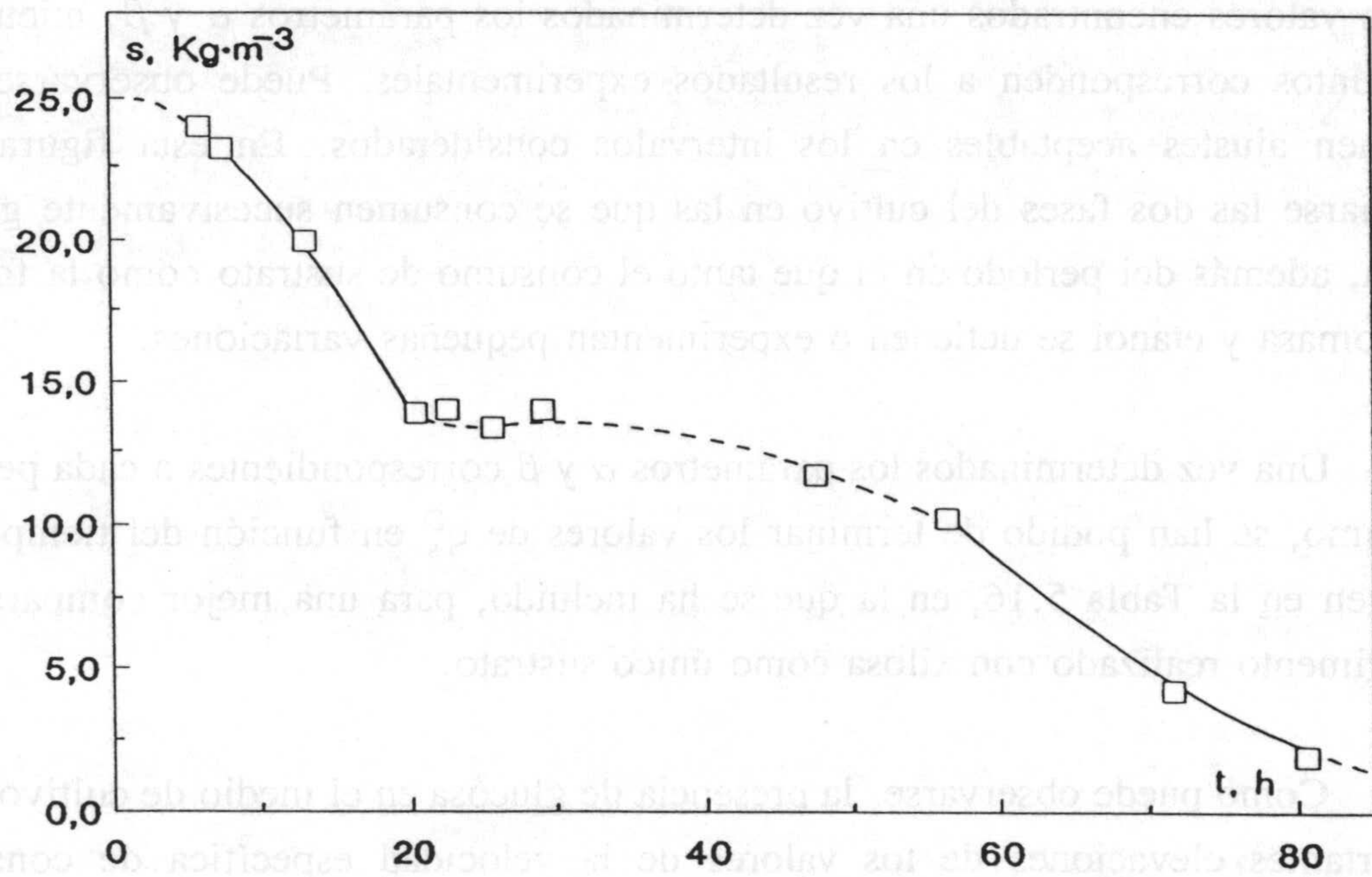
La Figura 5.24.(a) muestra el ajuste de los resultados experimentales a la forma linealizada de la ecuación [5.11] (propuesta para poder evaluar con la mayor precisión posible la derivada $d(s_0-s)/dt$) que interviene en la expresión de q_s , correspondiente al experimento P-M3 ($s_0 = 15$, $g_0 = 10 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$). La Figura 5.24.(b) incluye la reproducción de los valores encontrados una vez determinados los parámetros α y β , mientras que los puntos corresponden a los resultados experimentales. Puede observarse que se obtienen ajustes aceptables en los intervalos considerados. En esta figura pueden apreciarse las dos fases del cultivo en las que se consumen sucesivamente glucosa y xilosa, además del período en el que tanto el consumo de sustrato como la formación de biomasa y etanol se detienen o experimentan pequeñas variaciones.

Una vez determinados los parámetros α y β correspondientes a cada período de consumo, se han podido determinar los valores de q_s^D en función del tiempo que se recogen en la Tabla 5.16, en la que se ha incluido, para una mejor comparación, el experimento realizado con xilosa como único sustrato.

Como puede observarse, la presencia de glucosa en el medio de cultivo produce importantes elevaciones de los valores de la velocidad específica de consumo de sustrato; así, en el experimento P-M1, en el que el medio de cultivo contiene $1 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ de glucosa se obtiene un valor de q_s^D aproximadamente tres veces superior al obtenido cuando sólo existía xilosa y aumentando, en general cuanto mayor es la proporción de glucosa.



a)



b)

Fig. 5.24.- a) Ajuste de los resultados experimentales de consumo de sustrato para el experimento P-M3 ($s_0 = 15$ y $g_0 = 10 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
 b) Reproducción de la ecuación [5.12] para el experimento P-M3

TABLA 5.16
RENDIMIENTOS EN BIOMASA Y
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO
(Pachysolen tannophilus)
SUSTRATOS: XILOSA-GLUCOSA

Q = 0,0 v/v/min pH_i = 4,5

EXPTO	s _o Kg · m ⁻³	g _o Kg · m ⁻³	Y _{x/s} ^G Kg · Kg ⁻¹	t h	q _s ^D Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹	q _s Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹
P-B	25	0	0,094	60,0	0,23	0,23
P-M1	24	1	0,12	15,0 60,0	0,61 0,21	0,58 0,14
P-M2	20	5	0,11	15,0 60,0	0,51 0,22	0,47 0,15
P-M3	15	10	0,11	12,0 60,0	2,2 0,23	2,8 0,09
P-M4	10	15	0,12	12,0 60,0	2,2 0,22	2,7 0,04
P-M5	5	20	0,13	13,0 60,0	2,3 0,04	2,4 0,05
P-M6	1	24	0,12	13,0	2,8	2,6
P-M7	0	25	0,11	14,5	3,6	2,8

Por otra parte, para tiempos iniciales de cultivo (12-15 h) las velocidades específicas de consumo de sustrato se aproximan, cuanto mayor es la concentración inicial de glucosa, a la obtenida para el experimento P-M7, en el que sólo se empleó este azúcar como sustrato. Para tiempos avanzados de cultivo (60 h), los valores encontrados son muy similares al correspondiente al experimento base, realizado con xilosa exclusivamente.

En los experimentos de mayor concentración inicial de glucosa, P-M6 y P-M7, el consumo de los sustratos se realiza en las primeras 20 horas de cultivo, por lo que no se han podido determinar los valores de q_s^D a tiempos superiores y los encontrados son los mayores de la serie. Igualmente, en el experimento P-M5, con una elevada

proporción de glucosa, proporciona un valor elevado en el primer intervalo y muy bajo en el segundo, que corresponde al período de consumo de xilosa.

Por otro lado, con objeto de comprobar si los rendimientos en biomasa permanecen constantes a lo largo de los cultivos, se han realizado representaciones de la biomasa neta formada, $x-x_0$, frente al sustrato neto consumido, s_0-s , similares a la incluida en la Figura 5.25 para el experimento con $s_0=5$ y $g_0=20 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$. En todos los casos se han obtenido ajustes aceptables y se han determinado, por mínimos cuadrados, los valores del rendimiento global en biomasa que aparecen en la Tabla 5.16.

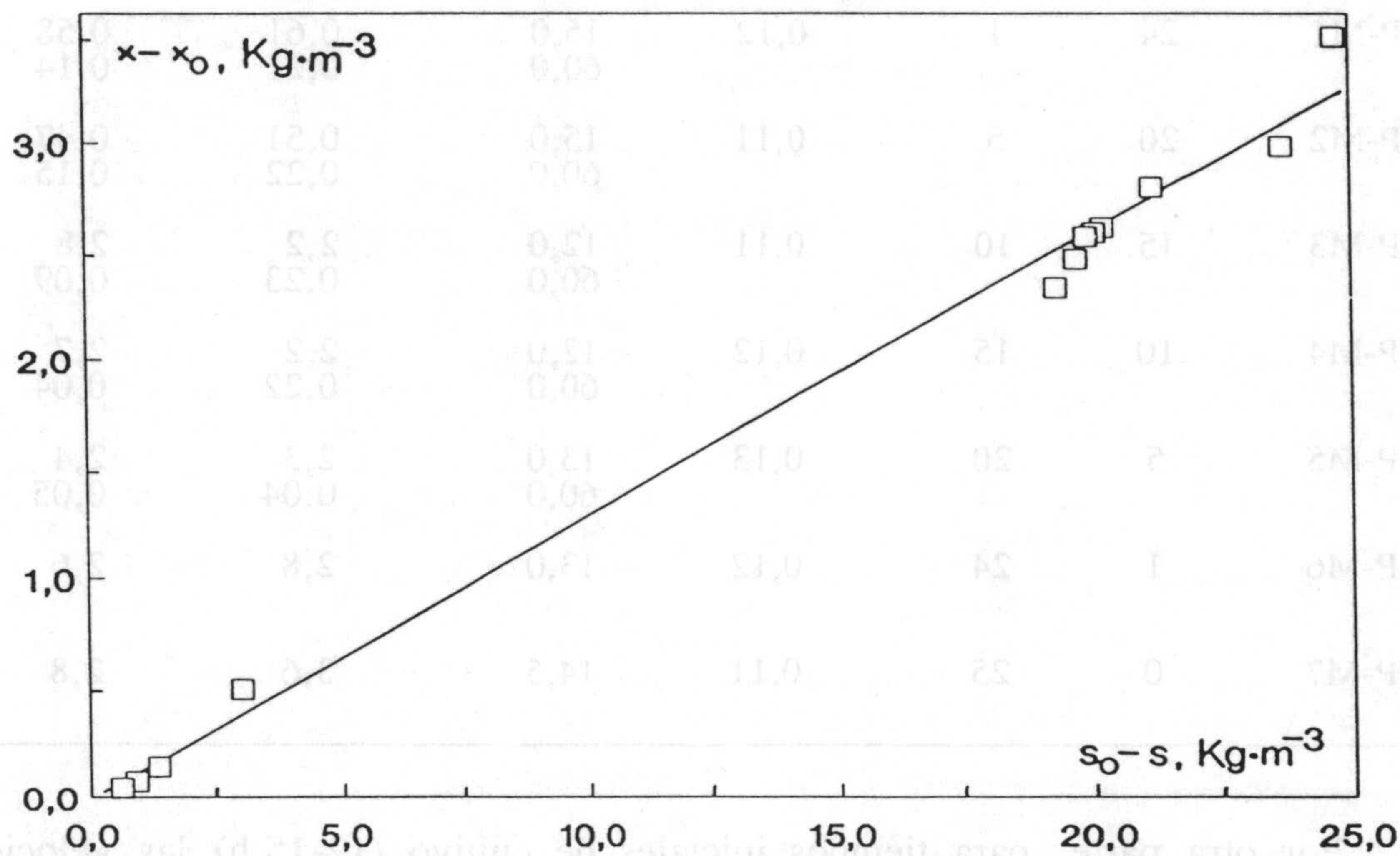


Fig. 5.26.- Rendimiento en biomasa, experimento P-M5 ($s_0=5$ y $g_0=20 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)

Como se observa, a excepción del experimento realizado sólo con xilosa, en el que se obtiene un valor ligeramente inferior, los restantes presentan rendimientos globales en biomasa muy parecidos, sin que exista una influencia significativa de la composición del medio de cultivo sobre este parámetro.

Cuando el rendimiento en biomasa permanece constante a lo largo del experimento y, admitiendo que no existe mantenimiento celular o que es despreciable, puede calcularse, según la ecuación [5.14], la velocidad específica de consumo de sustrato a partir de los valores correspondientes de μ y de $Y_{x/s}^G$. De esta forma se han determinado los valores de q_s que aparecen, junto a los de q_s^D , en la Tabla 5.16, a iguales tiempos de cultivo. En general, se han obtenidos valores similares de ambos parámetros por los dos procedimientos.

5.3.3.3 Formación de etanol

El estudio de la formación de etanol se ha realizado, como en apartados anteriores, empleando la velocidad específica de formación, q_E , y el rendimiento en etanol, $Y_{E/s}$.

Como ya se ha indicado, la formación de etanol a lo largo de los cultivos de esta serie se produce durante dos intervalos, separados por un período de tiempo en el que no existen, o son muy pequeños, el crecimiento celular, el consumo de sustrato y la formación de bioproducto.

Para el cálculo de q_E se ha empleado la ecuación empírica [5.11], que proporciona el valor de la derivada dE/dt .

Como ejemplo, en la Figura 5.26.(a) aparece la aplicación de la forma linealizada de dicha ecuación al experimento P-M2; la reproducción de los datos experimentales se incluye en la Figura 5.26.(b), en la que la línea continua corresponde a los valores deducidos y los puntos a los valores experimentales. Al igual que sucede en este caso, en el resto de los cultivos, se obtienen ajustes aceptables en los intervalos de validez de la ecuación propuesta.

Los valores de la velocidad específica de consumo de etanol que se obtienen al determinar analíticamente la derivada dE/dt se recogen en la Tabla 5.17.

Para los experimentos con alta concentración de xilosa (P-M1), el comportamiento es semejante al encontrado cuando sólo se empleó este sustrato, con

una velocidad específica de formación muy semejante. En los experimentos P-M2 y P-M3, en los que la proporción inicial de glucosa es mayor, pueden apreciarse las dos zonas de formación de etanol aludidas (Figura 5.26), que proporcionan los dos valores de q_E^D que aparecen en la Tabla 5.17. Los valores de tiempos inferiores corresponden a velocidades específicas de formación de etanol debidas al consumo de glucosa, mientras que los superiores lo son al consumo de xilosa. Como puede apreciarse, los primeros son del orden de unas diez veces superiores a los segundos. Por último, en los experimentos con mayor concentración inicial de glucosa sólo puede determinarse q_E^D para el consumo de glucosa, de forma que puede decirse que el microorganismo no llega a adaptarse al nuevo sustrato. Igualmente, los valores obtenidos en este caso son de un orden de magnitud superior a los encontrados cuando sólo se emplea xilosa.

TABLA 5.24

RENDIMIENTOS EN ETANOL Y

VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

(Pachysolen tannophilus)

SUSTRATOS: XILOSA-GLUCOSA

Q = 0,0 v/v/min pH_i = 4,5

EXPTO	s _o Kg · m ⁻³	g _o Kg · m ⁻³	Y _{E/s} ^G Kg · Kg ⁻¹	t h	q _E ^D Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹	q _E Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹
P-B	25	0	0,42	F.lineal	0,067	0,064
P-M1	24	1	0,24	F.lineal	0,051	0,047
P-M2	20	5	0,34	11,5 F.lineal	0,73 0,061	0,73 0,062
P-M3	15	10	0,36	13,0 F.lineal	0,57 0,064	0,75 0,041
P-M4	10	15	0,37	12,0	0,62	0,86
P-M5	5	20	0,36	13,0	0,76	0,93
P-M6	1	24	0,40	13,0	0,72	0,75
P-M7	0	25	0,41	11,5	0,71	0,75

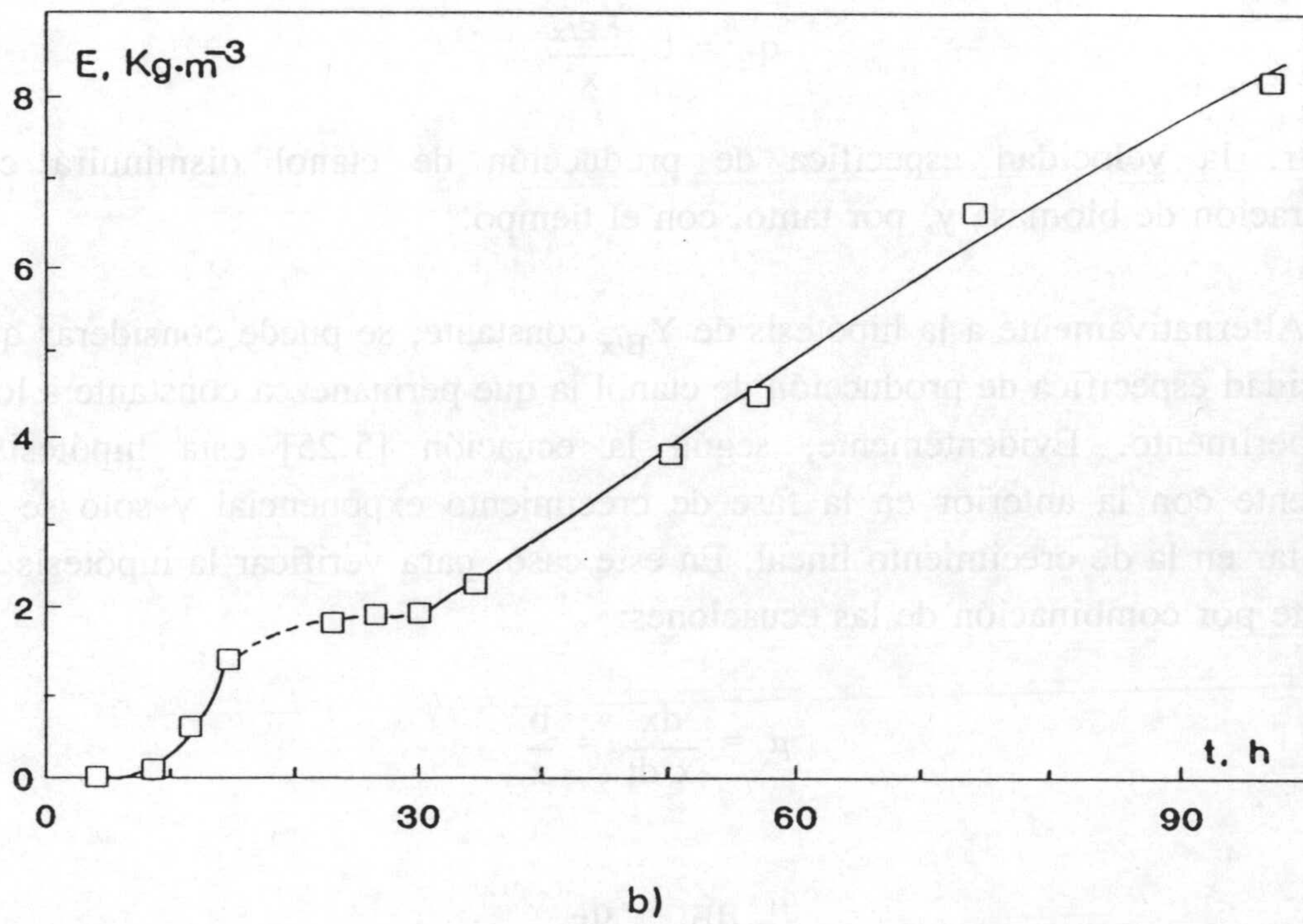
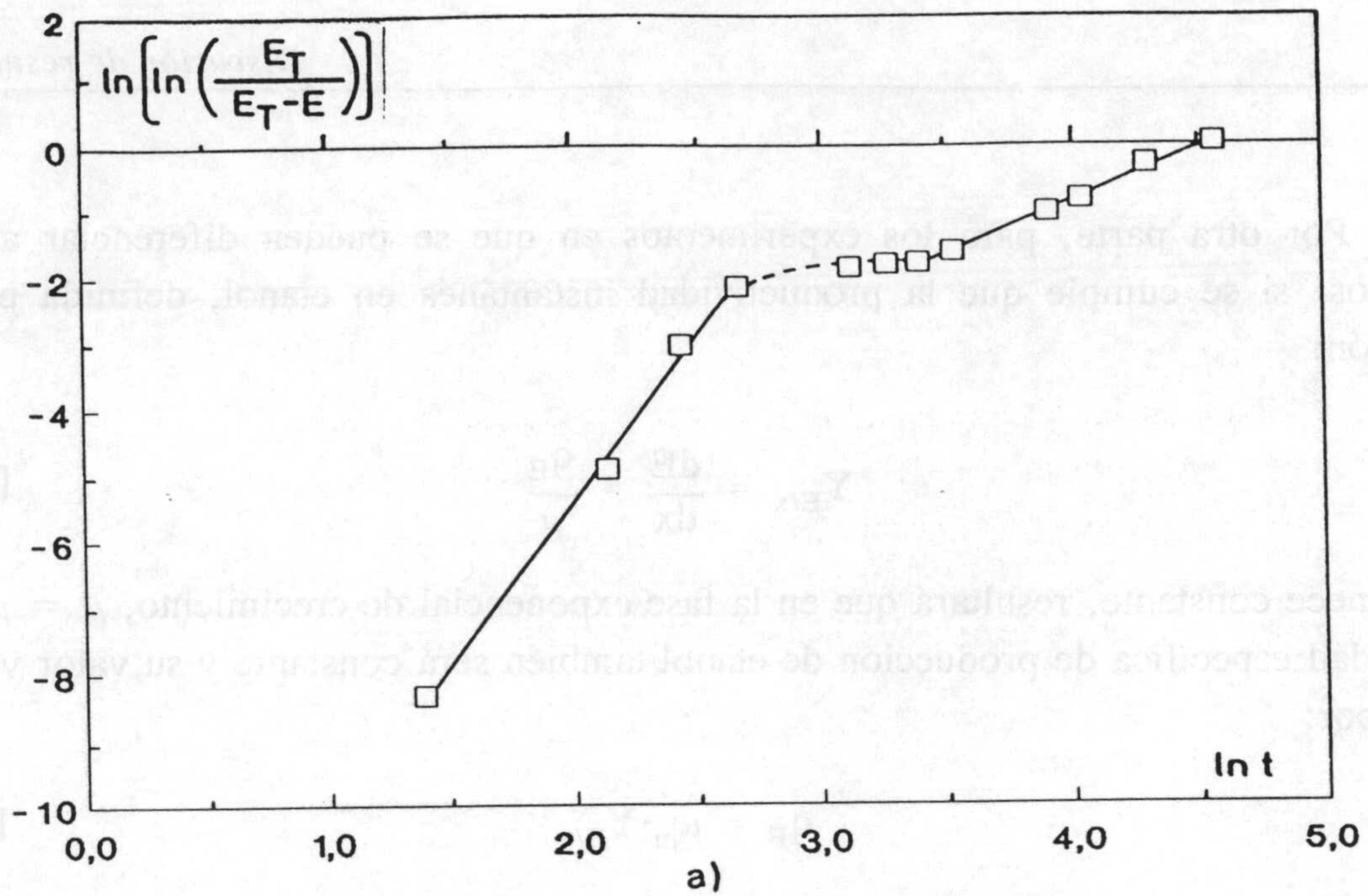


Fig. 5.26.- a) Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol a la ecuación [5.25], experimento P-M2 ($s_0=20$ y $g_0=5 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
 b) Reproducción de la ecuación [5.24], experimento P-M2

Por otra parte, para los experimentos en que se pueden diferenciar ambos períodos, si se cumple que la productividad instantánea en etanol, definida por la ecuación:

$$Y_{E/x} = \frac{dE}{dx} = \frac{q_E}{\mu} \quad [5.24]$$

permanece constante, resultará que en la fase exponencial de crecimiento, $\mu = \mu_m$, la velocidad específica de producción de etanol también será constante y su valor vendrá dado por:

$$q_E = \mu_m \cdot Y_{E/x} \quad [5.25]$$

mientras que en la fase de comportamiento lineal resultará que:

$$q_E = b \cdot \frac{Y_{E/x}}{x} \quad [5.26]$$

es decir, la velocidad específica de producción de etanol disminuirá con la concentración de biomasa y, por tanto, con el tiempo.

Alternativamente a la hipótesis de $Y_{E/x}$ constante, se puede considerar que sea la velocidad específica de producción de etanol la que permanezca constante a lo largo del experimento. Evidentemente, según la ecuación [5.25] esta hipótesis será coincidente con la anterior en la fase de crecimiento exponencial y sólo se podría confrontar en la de crecimiento lineal. En este caso, para verificar la hipótesis de q_E constante por combinación de las ecuaciones:

$$\mu = \frac{dx}{x \cdot dt} = \frac{b}{x}$$

$$\frac{dE}{dx} = \frac{q_E}{\mu}$$

se deduce que:

$$\frac{dE}{x \cdot dx} = \frac{dE}{d(x^2/2)} = \frac{q_E}{b} \quad [5.23]$$

de forma que en un gráfico, restringido a la fase de crecimiento lineal, de E frente a $x^2/2$ debería conducir a una línea recta de cuya pendiente se calcularía el valor de q_E constante en dicha fase de crecimiento.

A partir de los resultados experimentales se efectuaron las representaciones correspondientes a las dos hipótesis propuestas, es decir, E frente a $(x-x_0)$ a lo largo de todo el experimento y de E frente a $x^2/2$ en la fase de crecimiento lineal, deduciéndose que es posible admitir una relación lineal para la primera durante el intervalo en que la producción de etanol es debida al consumo de glucosa y en la segunda, pero para el intervalo en que la formación de etanol es debida al consumo de xilosa. Como ejemplo, en la Figura 5.27, se muestra la representación de E frente a $x^2/2$ correspondiente al experimento P-M1.

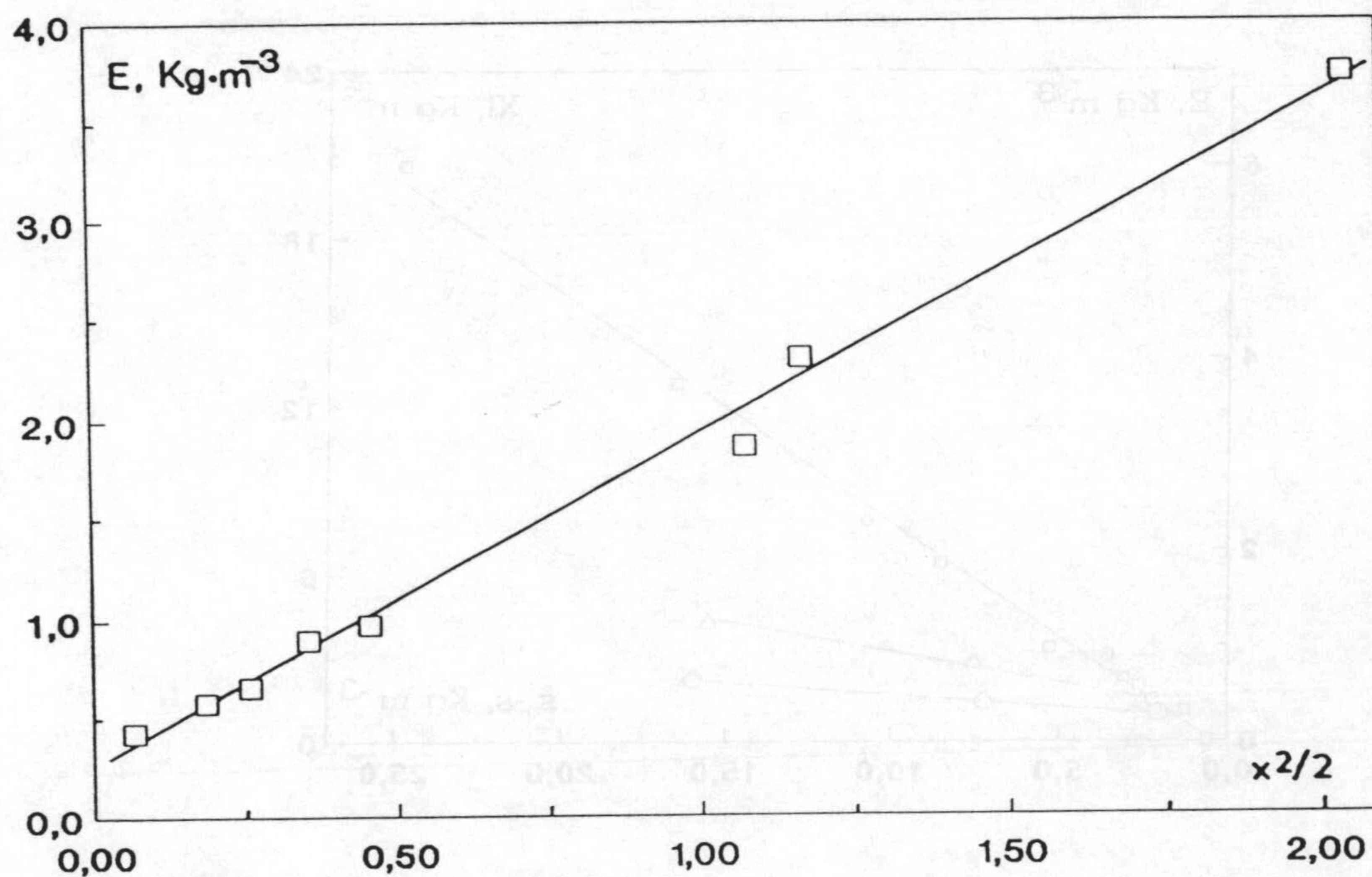


Fig. 5.27.- Aplicación de la ecuación [5.23] al experimento P-M1 ($s_0=24$ y $g_0=1$ Kg·m⁻³)

Mediante este procedimiento se han calculado los valores de q_E que aparecen en la Tabla 5.17 para los mismos tiempos en que se determinó q_E^D .

Puede observarse que se obtienen aceptables concordancias en los valores del parámetro por los dos procedimientos propuestos.

En cuanto al segundo parámetro empleado para caracterizar la formación de etanol, el rendimiento en etanol, con objeto de comprobar si éste permanece constante a lo largo de los cultivos se han realizado representaciones similares a la incluida en la Figura 5.28 para el experimento P-M1 ($s_0=24$, $g_0=1 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$). Las figuras correspondientes al resto de los cultivos de la serie también muestran que puede admitirse una relación lineal del etanol producido frente al sustrato neto consumido, por lo que, mediante ajuste por mínimos cuadrados, se han determinado las respectivas pendientes que corresponden a los rendimientos globales en etanol, $Y_{E/s}^G$, recogidos en la Tabla 5.17.

Puede observarse que el rendimiento global en etanol aumenta cuando lo hace la proporción inicial de glucosa, aunque cuando sólo se emplea este azúcar como sustrato, el valor obtenido es muy semejante al encontrado cuando sólo se utiliza xilosa.

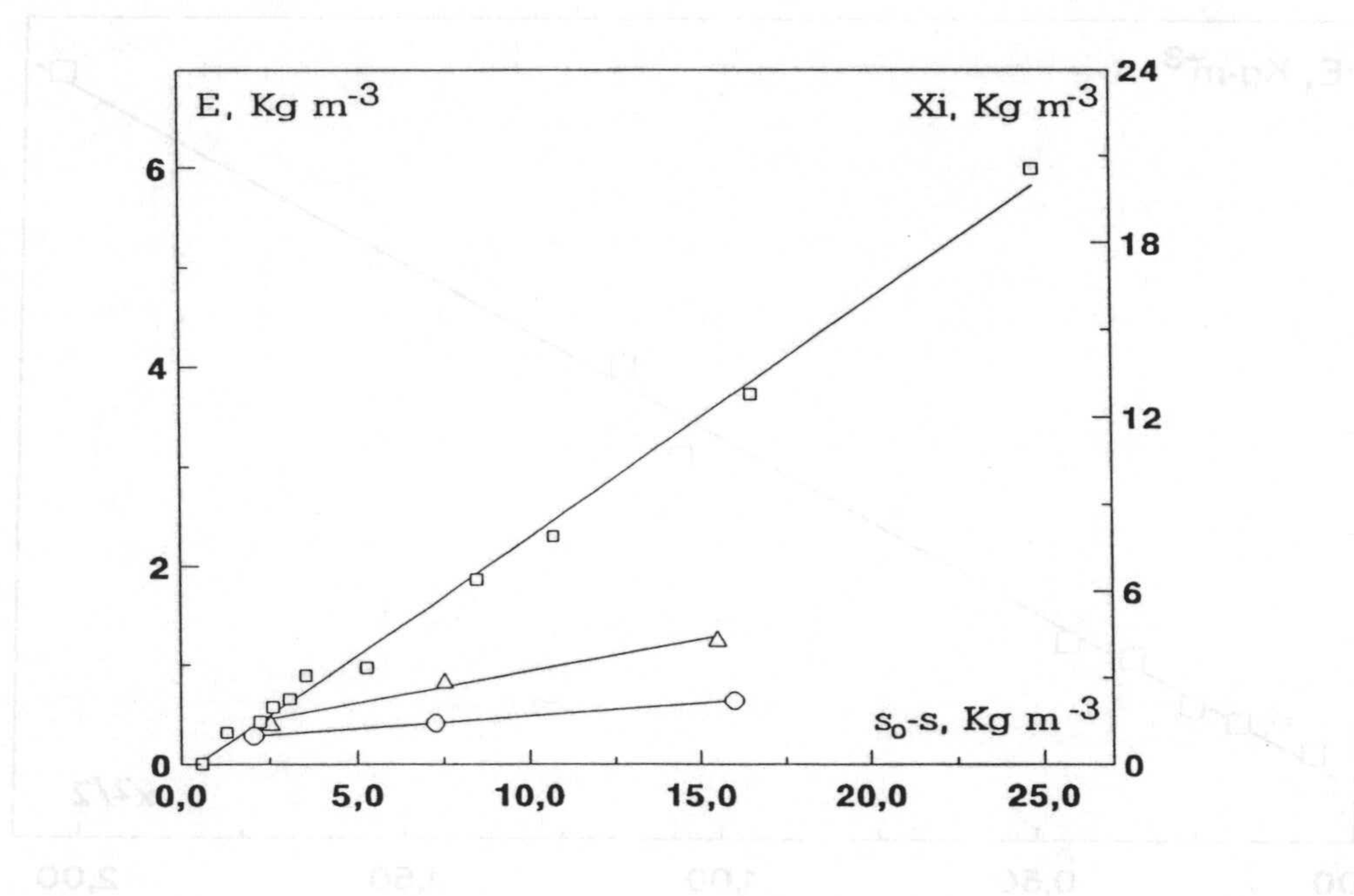


Fig. 5.28.- Rendimientos en etanol (\square), experimento P-M1 ($s_0=24$ y $g_0=1 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$) y en xilitol, experimentos (Δ) P-M1 y (\circ) P-M2 ($s_0=20$ y $g_0=5 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)

Por otra parte, en el caso de *Pachysolen tannophilus* se han determinado las concentraciones de xilitol para tres tiempos de los experimentos P-M1 y P-M2. La representación de X_i frente a s_0-s se muestra igualmente en la Figura 5.28. A partir de las respectivas pendientes, se determinan los correspondientes rendimientos medios en xilitol para cada caso, que resultan ser $0,221$ y $0,0746 \text{ (Kg xilitol)}\cdot\text{(Kg xilosa)}^{-1}$, respectivamente.

5.4 FERMENTACIÓN CON *Candida shehatae*

En general esta levadura se ha caracterizado por la producción de una concentración alta en etanol y baja en xilitol.

Se han realizado tres series experimentales: estudio de la influencia del nivel de aireación (cuyos resultados aparecen en las Tablas 4.26 a 4.28), del pH inicial (Tablas 4.29 a 4.33) y de la composición del medio de cultivo empleando como sustrato disoluciones de xilosa y glucosa en distinta proporción (Tablas 4.34 a 4.38). Las Figuras 4.31 a 4.46 muestran la representación de biomasa formada, sustrato residual y bioproductos obtenidos frente al tiempo, así como la evolución del pH a lo largo de los cultivos.

5.4.1 Influencia del nivel de aireación

5.4.1.1 Formación de biomasa

Partiendo de los valores de concentración de biomasa-tiempo se han trazado las curvas de crecimiento ($\ln(x/x_0)$ vs t) para cada uno de los experimentos de esta serie. En todos los casos las curvas de crecimiento obtenidas son análogas a las que se muestran en la Figura 5.29, en la que se han representado el experimento base, ($Q=0,0$ v/v/min), y el de mayor caudal de aireación, ($Q=0,3$ v/v/min).

En estas curvas de crecimiento se aprecia una pequeña fase lag, que como máximo llega a tener una duración aproximada de cinco horas. A continuación tiene lugar, al igual que en *Pachysolen tannophilus*, una fase exponencial de crecimiento, indicada mediante flechas en la Figura 5.29, de duración reducida, que finaliza cuando la concentración de xilosa es aún próxima a la inicial. El crecimiento celular continúa pero a una velocidad inferior a la de la fase exponencial y, finalmente, se alcanza la fase estacionaria que coincide prácticamente con el consumo total de xilosa.

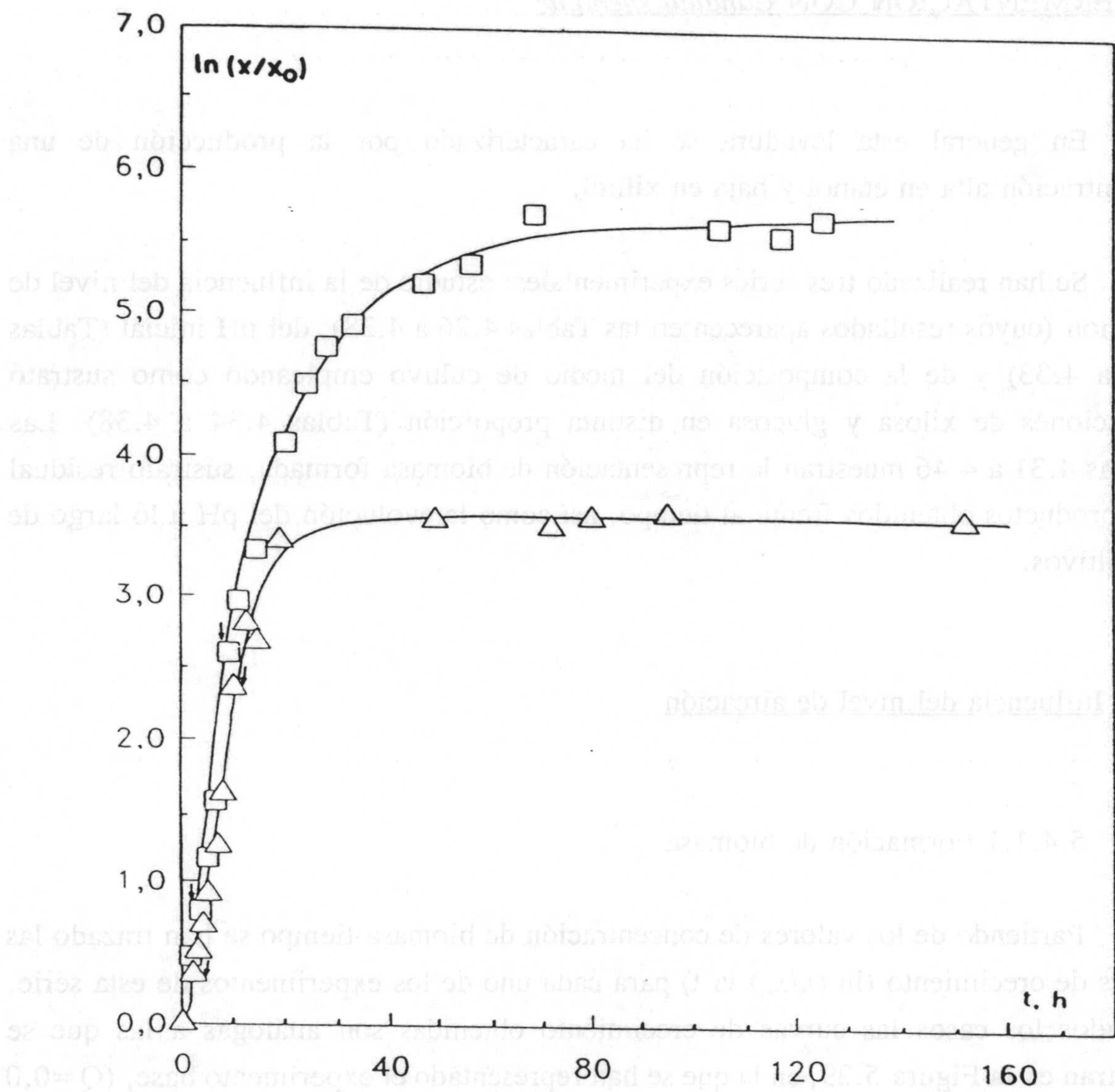


Fig. 5.29.- Curvas de crecimiento de los experimentos:
 (□) C-B ($Q=0,0$ v/v/min) y (Δ) C-A2 ($Q=0,3$ v/v/min)

Los valores de las velocidades específicas máximas de crecimiento, determinadas en la fase exponencial, para cada uno de los experimentos, se recogen en la Tabla 5.19. Se observa que μ_m permanece prácticamente constante para los menores caudales de aireación, mientras que disminuye apreciablemente para $Q=0,300$ v/v/min . Los valores de μ_m son inferiores en *Candida shehatae* a los obtenidos, en condiciones similares, con *Hansenula polymorpha*.

TABLA 5.26
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO
(Candida shehatae)

INFLUENCIA DEL NIVEL DE AIREACIÓN

$s_o = 25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $\text{pH}_i = 4,5$

EXPTO.	Q v/v/min	μ_m h ⁻¹	b Kg · m ⁻³ · h ⁻¹
C-B	0,000	0,329	0,0235
C-A1	0,075	0,338	0,0372
C-A2	0,300	0,242	0,0250

Los valores de μ_m obtenidos en los cultivos con caudal de aire de 0,000 y 0,075 v/v/min son muy parecidos a los determinados por Delgenes y col. (1986). Estos autores obtienen un valor de $\mu_m=0,347 \text{ h}^{-1}$ para la especie *Candida shehatae* (Y12878) en condiciones de operación muy similares; esta velocidad es determinada en "condiciones aeróbicas" empleando un caudal de aire de 1 v/v/min y una velocidad de agitación de 800 rpm en un biorreactor de 2 L. Tanto el caudal de aire como la velocidad de agitación son superiores a los valores empleados en esta investigación.

Asímismo, es necesario indicar que el valor de la velocidad específica máxima de crecimiento en *C. shehatae*, utilizando xilosa como sustrato, está sensiblemente influenciado, no sólo por el caudal de aire suministrado, sino por la especie mutante de que se trate. Así, para *C. shehatae*, en unas mismas condiciones de operación Du Preez

y col. (1989) encuentran valores distintos de μ_m dependiendo de la especie, oscilando el valor de μ_m entre 0,1 y 0,2 h⁻¹; en todos los casos los valores de μ_m obtenidos por estos autores eran inferiores a los observados en esta investigación. Sin embargo, las condiciones de operación eran algo distintas, ya que tanto el caudal de aire como la velocidad de agitación eran inferiores a los empleados en este estudio.

Por otro lado, el período de crecimiento posterior a la fase exponencial, se ha cuantificado mediante el parámetro b , determinado por aplicación de la ecuación [5.4], puesto que, a partir de las representaciones de los resultados experimentales $x-t$ puede admitirse un comportamiento lineal de la biomasa con el tiempo. Los valores obtenidos para cada caudal de aireación también se recogen en la Tabla 5.18, no observándose ninguna tendencia definida; mientras que en *Hansenula polymorpha* se observaba un aumento bastante apreciable de este parámetro con el caudal de aire suministrado; en el experimento H-A3 ($Q=0,3$ v/v/min), el valor de $b=0,0312$ Kg·m⁻³·h⁻¹ es sensiblemente superior al del experimento C-A2 (realizado con igual caudal de aire), donde $b=0,0250$ Kg·m⁻³·h⁻¹.

5.3.1.2 Consumo de xilosa

También en *Candida shehatae* el consumo de xilosa se ha estudiado mediante los parámetros: velocidad específica de consumo de sustrato, q_s , y rendimiento global en biomasa, $Y_{x/s}^G$.

Para el cálculo de q_s a través de la ecuación [5.5] también se ha optado por efectuar un ajuste empírico de los datos experimentales a una ecuación que proporcione la variación de la concentración de sustrato con el tiempo, para posteriormente determinar analíticamente la derivada.

De las distintas ecuaciones ensayadas, al igual que sucede con los microorganismos anteriormente considerados, la que mejor ajusta los resultados experimentales y en un intervalo mayor de tiempo, es la representada por [5.11], que linealizada según [5.12], permite determinar los parámetros α y β .

Como ejemplo de esta linealización, en la Figura 5.30 (a) se representa $\ln [\ln (s_0/s)]$ vs $\ln t$ para el experimento C-B ($Q=0,00$ v/v/min), observándose un buen ajuste de los datos experimentales a la ecuación [5.12] en un intervalo de tiempo que incluye el período donde prácticamente se consume la totalidad del sustrato.

Una vez determinados los parámetros α y β para cada experimento, con la ecuación [5.11] se han recalculado los valores de la concentración residual, s , en el intervalo de tiempo en que se puede aplicar esta expresión. En la Figura 5.30 (b) se muestran los valores reproducidos de s , indicados con una línea continua mientras que los puntos (\square) corresponden a los datos experimentales. Al igual que se observa en la Figura 5.30 (b), en los restantes experimentos de la serie se han obtenido ajustes aceptables.

Con los valores de los parámetros α y β , y mediante la ecuación [5.13] se ha determinado la velocidad específica de consumo de sustrato para cada experimento y en el intervalo de validez de esta ecuación. En todos los casos se ha detectado que q_s^D disminuye en el transcurso del experimento. En la Tabla 5.19 se recogen los valores de q_s^D correspondientes a tiempos iniciales (12-13 h) y medios (19-20 h) del experimento.

TABLA 5.27
RENDIMIENTOS EN BIOMASA Y
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO
(Candida shehatae)
INFLUENCIA DEL NIVEL DE AIREACIÓN

EXPTO.	Q v/v/min	$Y_{x/s}^G$ Kg · Kg ⁻¹	t h	q_s^D Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹	q_s Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹
B-C	0,000	0,036	20,0	2,0	2,2
C-A1	0,075	0,075	12,0	2,0	2,2
			19,0	1,5	1,3
C-A2	0,300	0,093	12,0	1,4	1,6
			19,0	0,8	0,8

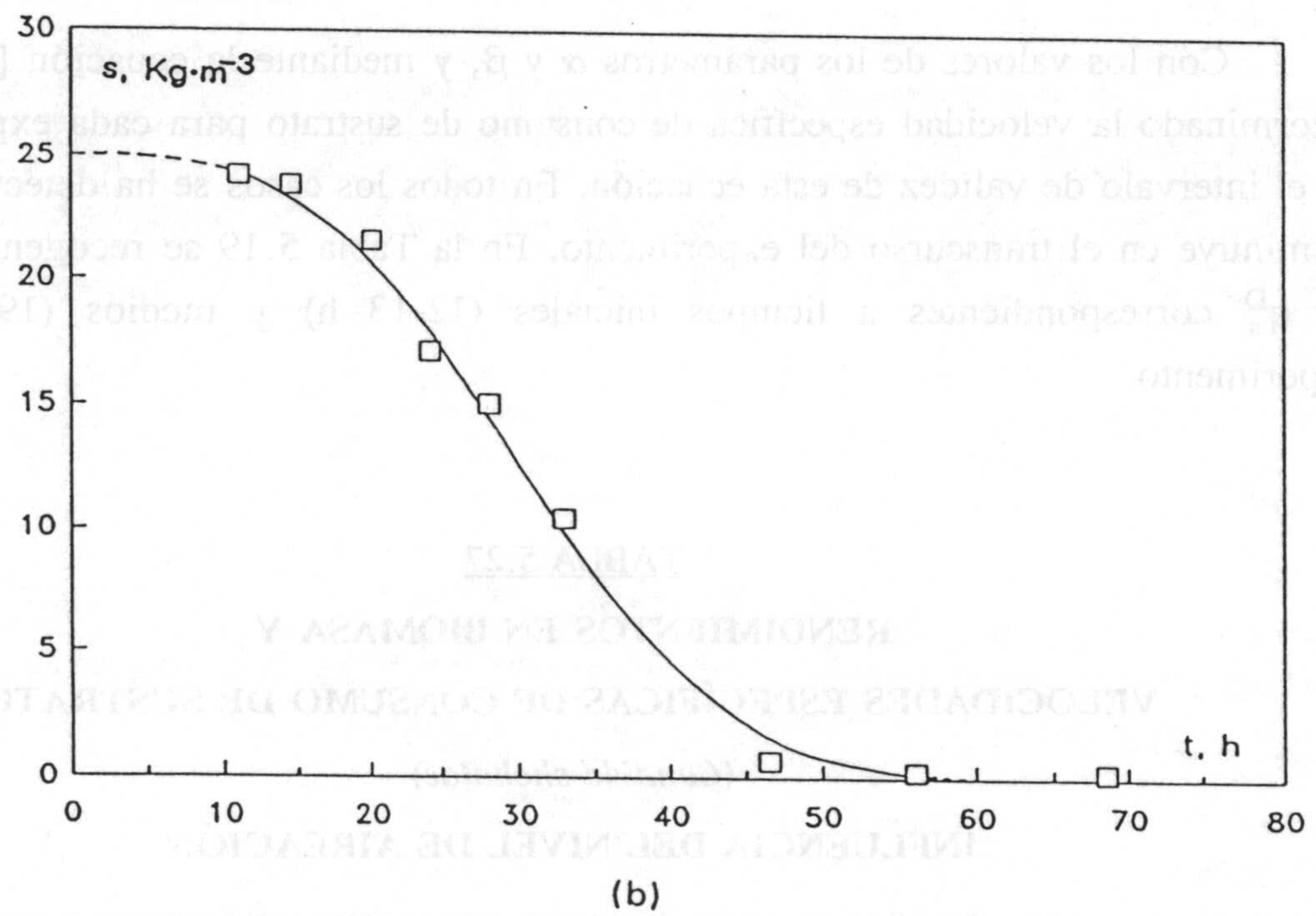
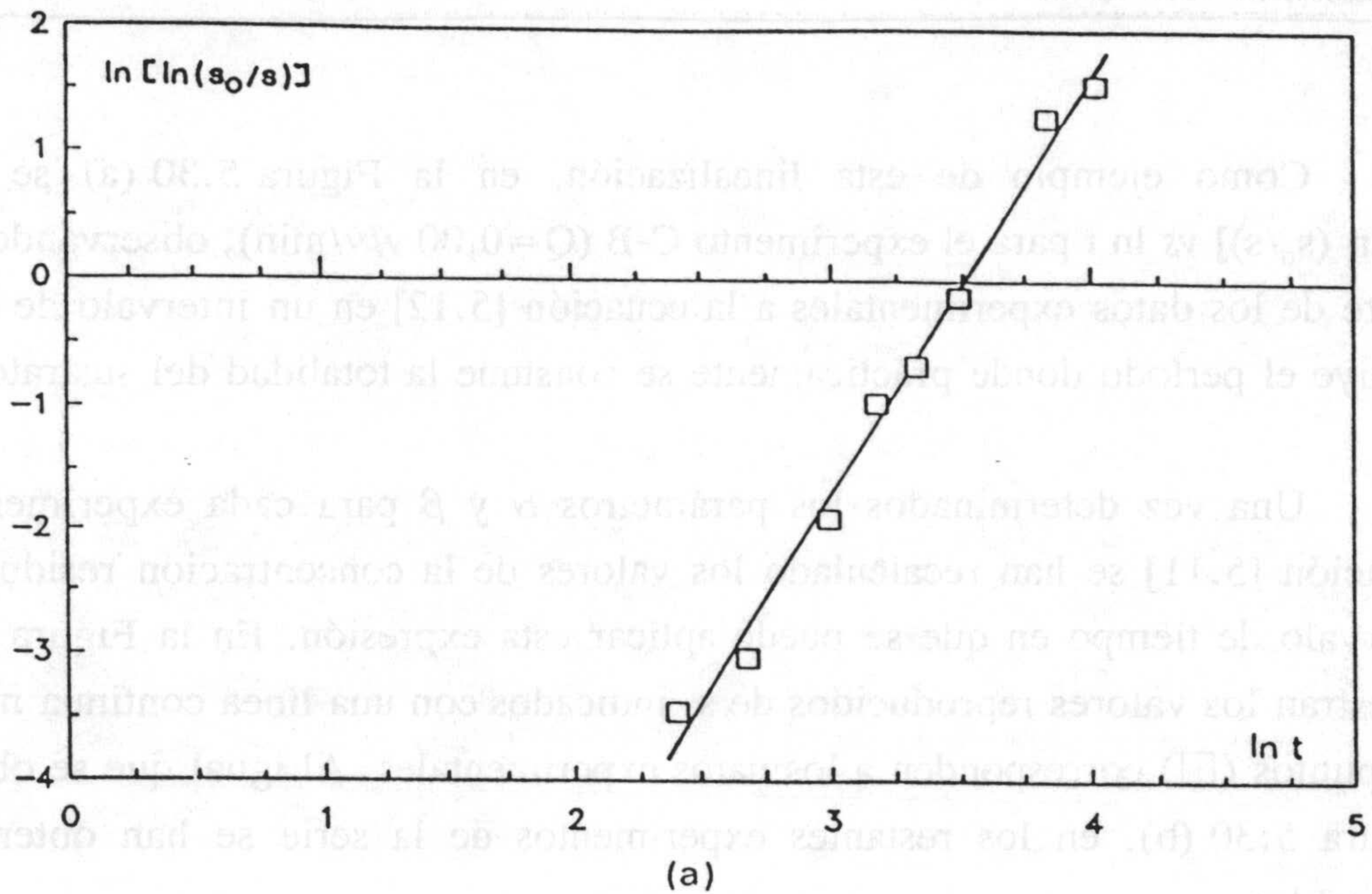


Fig. 5.30.- a) Ajuste de los resultados experimentales de consumo de xilosa para el experimento C-B ($Q=0,0$ v/v/min).
 b) Reproducción de la ecuación [5.12] para el experimento C-B

Para tiempos iguales o muy próximos se observa que q_s^D es más elevado en los cultivos a los que se ha suministrado menor caudal de aire. Así pues, parece que una mayor aireación inhibe el consumo de xilosa.

Las velocidades específicas de consumo de xilosa obtenidas en esta serie de aireación para *Candida shehatae* son de un orden muy superior a las deducidas para *Hansenula polymorpha*. Concretamente si se comparan los experimentos base de ambas levaduras, correspondientes a condiciones de operación muy similares, en el caso de *Hansenula* resulta que $q_s(20) = 0,54 \text{ (Kg xilosa) } \cdot \text{(Kg biomasa)}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ mientras que para *Candida* se ha obtenido un valor de $q_s(20) = 2,2 \text{ (Kg xilosa) } \cdot \text{(Kg biomasa)}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Por otro lado, si se comparan estos valores de q_s^D con los determinados para *Pachysolen tannophilus* en iguales condiciones de operación ($s_0 = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$, $\text{pH}_i = 4,5$, $Q = 0,00 \text{ v/v/min}$) se observa que en *Candida* la velocidad específica de consumo de xilosa es muy superior a la deducida para *Pachysolen*, Castro Galiano, (1989). Así si en ambas levaduras se comparan tiempos próximos a las 20 h, los valores de q_s^D en *Candida* son dos veces superiores a los obtenidos en *Pachysolen*.

Asímismo, estos valores de q_s^D obtenidos en *Candida* son superiores a los determinados por Sreenath y col. (1987) en un cultivo discontinuo con esta misma levadura, aunque en condiciones experimentales distintas. Estos autores determinan valores de q_s del orden de $0,91 \text{ (Kg xilosa) } \cdot \text{(Kg biomasa)}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ al comienzo del experimento para una concentración celular inicial de $0,72 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$, indicando que conforme la concentración celular inicial sea más alta el valor de q_s es menor. Sus condiciones de operación eran 32°C , una agitación de 300 a 400 rpm y una aireación de $0,5 \text{ v/v/min}$; emplean otro medio de cultivo y el pH del mismo no se especifica. El hecho de la disminución de q_s con la concentración inicial de biomasa es coincidente con lo observado en esta investigación donde q_s disminuye en el transcurso del experimento y por tanto, conforme aumenta la concentración de biomasa.

Por otro lado, los rendimientos globales en biomasa, $Y_{x/s}^G$, se han evaluado a partir de representaciones de $(x-x_0)$ vs (s_0-s) , similares a la que se muestra en la Figura 5.31, correspondiente al experimento C-B ($Q = 0,00 \text{ v/v/min}$).

Los valores de $Y_{x/s}^G$ correspondientes a cada cultivo se recogen en la Tabla 5.19.

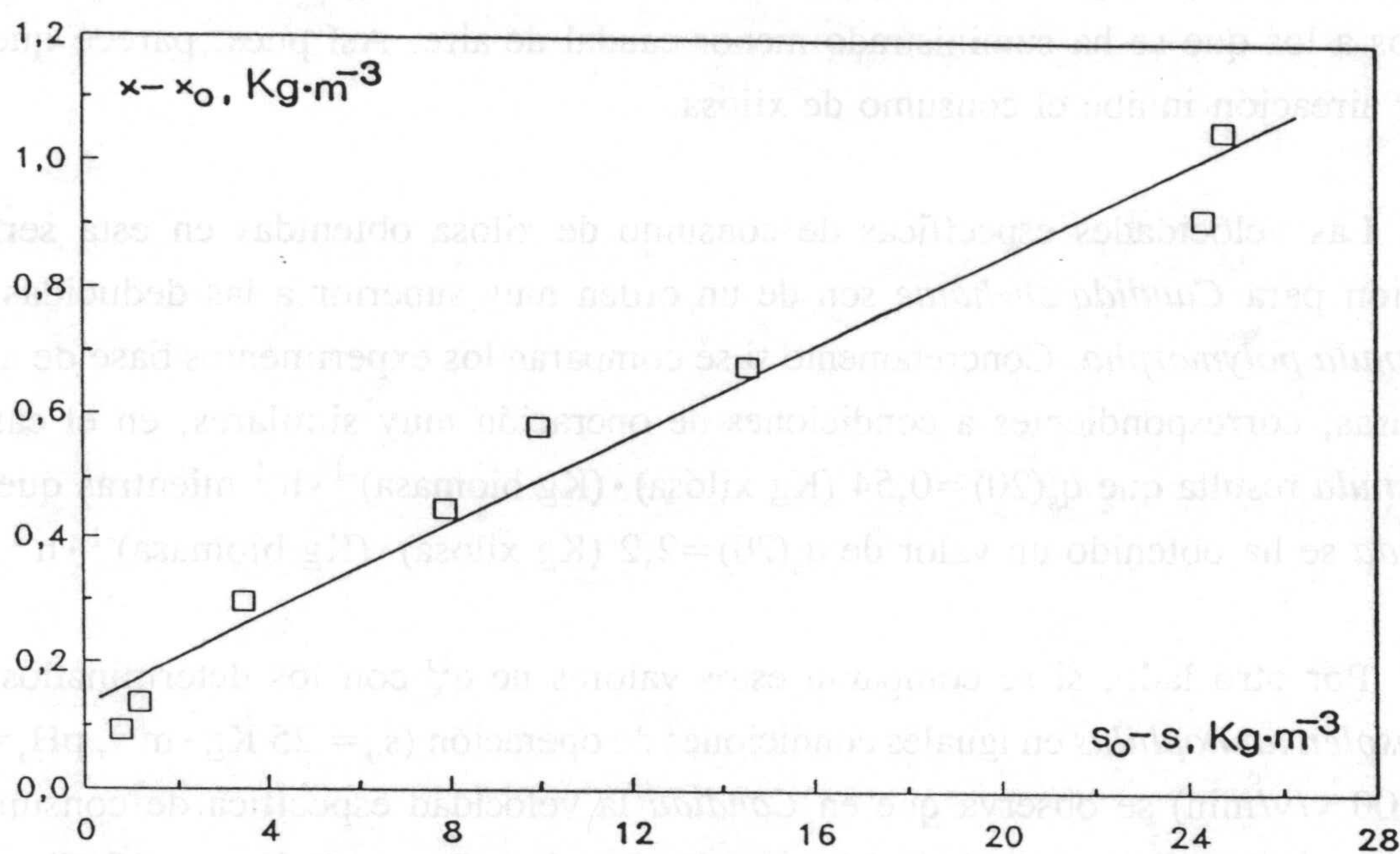


Fig. 5.31.- Rendimiento medio en biomasa, experimento C-B ($Q=0,0$ v/v/min)

En general, parece deducirse que el rendimiento global en biomasa aumenta, en cierta medida, con el caudal de aire suministrado. Este resultado coincide con lo observado en la bibliografía, donde el rendimiento en biomasa obtenido es función de las condiciones de aireación existentes. Así, para este mismo microorganismo, en condiciones aeróbicas, Ligthelm y col. (1988) obtienen un rendimiento $Y_{x/s}=0,33$ ($\text{Kg biomasa}) \cdot (\text{Kg xilosa})^{-1}$, mientras que en condiciones limitadas de oxígeno el valor obtenido era de $Y_{x/s}=0,01$ ($\text{Kg biomasa}) \cdot (\text{Kg xilosa})^{-1}$. Igualmente, Alexander y col. (1988) en condiciones semi-aeróbicas y en un cultivo continuo de *Candida shehatae* encuentran rendimientos en biomasa que oscilan entre 0,01 y 0,41 $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ dependiendo en este caso no sólo de la aireación suministrada sino de la velocidad de dilución empleada. Estos últimos autores en condiciones anaeróbicas no aprecian crecimiento celular, $Y_{x/s} \approx 0$, y sí en cambio consumo de sustrato y formación de etanol.

Con el valor del rendimiento global en biomasa y la velocidad específica calculada en el período lineal, $\mu=b/x$, se ha determinado el valor de q_s mediante la ecuación [5.14].

Esta velocidad específica de consumo de xilosa, así evaluada, también se recoge en la Tabla 5.19, a los mismos tiempos de operación, con el fin de comparar con el valor de q_s^D , determinado usando el método diferencial.

En general se observa una aceptable concordancia entre los valores obtenidos por ambos procedimientos.

5.3.1.3 Formación de bioproductos

A diferencia de lo que ocurría con *Hansenula polymorpha*, en *Candida shehatae* se obtiene una concentración alta de etanol, que no es lineal con el tiempo, y una baja concentración de xilitol. Concretamente en el experimento C-B, de menor aireación, se alcanza una concentración máxima en etanol de $10,2 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$, mientras que la concentración de xilitol para ese mismo instante es $1,9 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$.

Para cada nivel de aireación se ha calculado la velocidad específica de formación de etanol y los rendimientos en etanol y xilitol.

Con objeto de determinar la tasa volumétrica de producción de etanol, dE/dt , y después calcular q_E^D (método diferencial) se ha tratado de encontrar una ecuación empírica que hiciese posible linealizar la variación de la concentración de etanol formado, E , en función del tiempo. De las distintas ecuaciones ensayadas, la que proporciona un mejor ajuste, en el más amplio intervalo de tiempo, es de la forma:

$$\frac{E}{E_T} = A \cdot e^{B/t} \quad [5.24]$$

siendo A y B dos constantes y E_T la concentración teórica máxima de etanol que se puede formar de acuerdo con la reacción [1.2].

La linealización de la ecuación [5.24] conduce a la expresión:

$$\ln \frac{E}{E_T} = \ln A + B \frac{1}{t} \quad [5.25]$$

Una representación de los valores experimentales $\ln(E/E_T)$ frente a $1/t$, hasta que se alcanza la máxima concentración de etanol, permite determinar el valor de los parámetros A y B; como ejemplo en la Figura 5.32 (a) se muestra la representación gráfica correspondiente al experimento C-A2, donde la línea continua corresponde a la variación deducida mediante la ecuación y los puntos representan los datos experimentales. En el intervalo donde es válida la ecuación se observa una aceptable reproducción de los valores empíricos, Figura 5.32 (b).

A partir de la ecuación [5.25] se ha podido determinar analíticamente la derivada dE/dt , y por tanto, sustituyendo en la ecuación [5.6] obtener la expresión para la velocidad específica de producción de etanol en función del tiempo:

$$q_E^D = - \frac{E_T \cdot A \cdot B \cdot e^{B/t}}{x \cdot t^2} \quad [5.26]$$

donde x representa la concentración de biomasa correspondiente al tiempo al que se desea calcular la velocidad específica de formación de etanol. De esta forma se han determinado los valores de q_E^D en función del tiempo en cada uno de los experimentos.

En esta serie no se ha observado ninguna tendencia definida en los valores de la velocidad específica de formación de etanol obtenidos en el transcurso de cada uno de los experimentos. Sin embargo, parece que son algo más elevados durante las primeras 20-25 horas, sobre todo en los cultivos de menor aireación.

En la Tabla 5.20, se muestran los valores de la velocidad específica de formación de etanol en los tres experimentos de la serie, para un tiempo igual o próximo a las 20 horas. En general, se observa que en los cultivos de menor aireación, los valores de q_E^D son más altos.

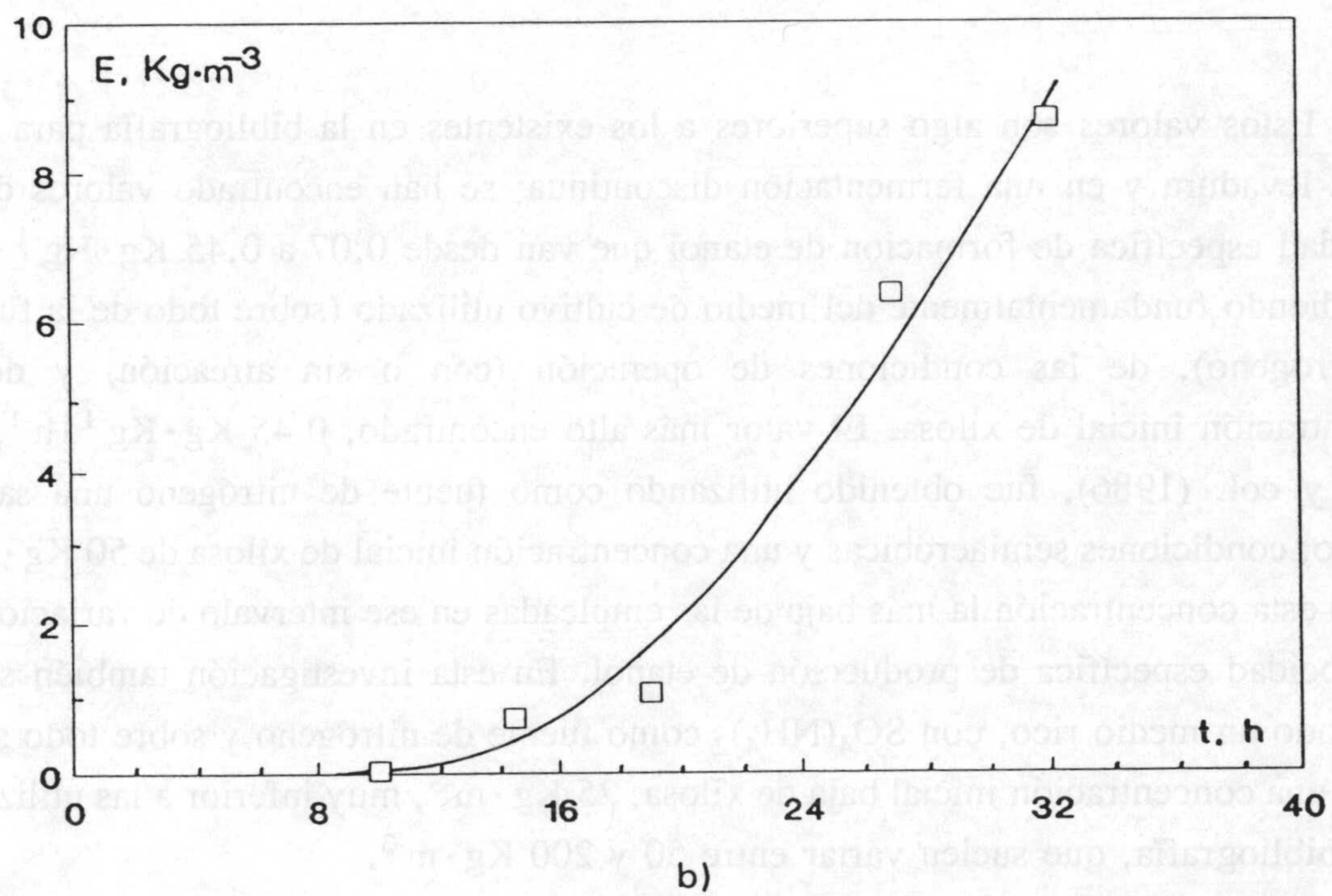
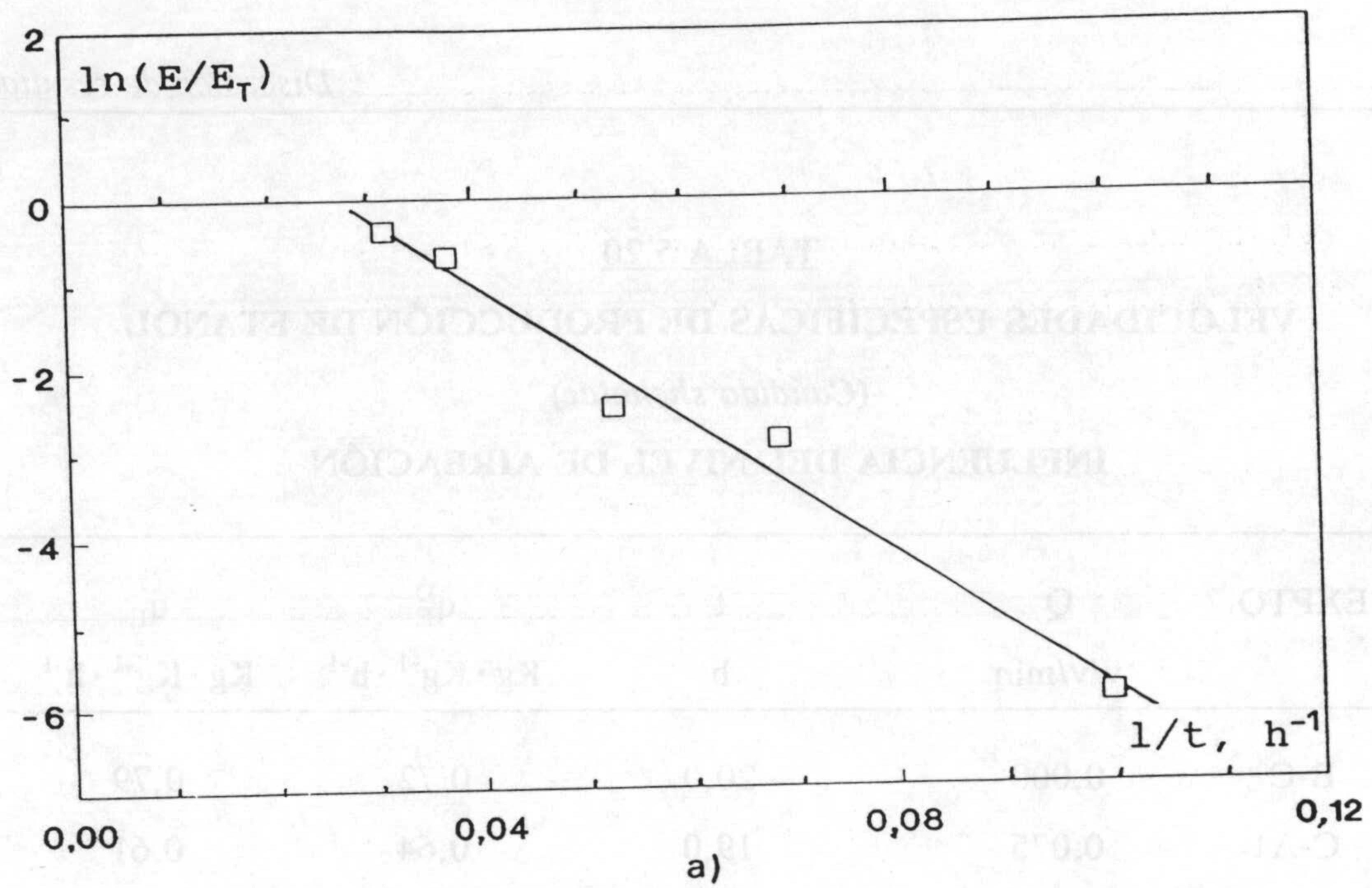


Fig. 5.32.- a) Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol a la ecuación [5.25], experimento C-A1 ($Q=0,075$ v/v/min)
 b) Reproducción de la ecuación [5.24], experimento C-A1

TABLA 5.20
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL
(Candida shehatae)
INFLUENCIA DEL NIVEL DE AIREACIÓN

EXPTO.	Q v/v/min	t h	q_E^D Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹	q_E Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹
B-C	0,000	20,0	0,72	0,79
C-A1	0,075	19,0	0,64	0,61
C-A2	0,300	19,0	0,51	0,42

Estos valores son algo superiores a los existentes en la bibliografía para esta misma levadura y en una fermentación discontinua; se han encontrado valores de la velocidad específica de formación de etanol que van desde 0,07 a 0,45 Kg · Kg⁻¹ · h⁻¹, dependiendo fundamentalmente del medio de cultivo utilizado (sobre todo de la fuente de nitrógeno), de las condiciones de operación (con o sin aireación) y de la concentración inicial de xilosa. El valor más alto encontrado, 0,45 Kg · Kg⁻¹ · h⁻¹, Du Preez y col. (1986), fue obtenido utilizando como fuente de nitrógeno una sal de amonio, condiciones semiaeróbicas y una concentración inicial de xilosa de 50 Kg · m⁻³, siendo esta concentración la más baja de las empleadas en ese intervalo de variación de la velocidad específica de producción de etanol. En esta investigación también se ha empleado un medio rico, con SO₄(NH₄)₂ como fuente de nitrógeno y sobre todo se ha usado una concentración inicial baja de xilosa, 25 Kg · m⁻³, muy inferior a las utilizadas en la bibliografía, que suelen variar entre 50 y 200 Kg · m⁻³.

A partir de representaciones gráficas de la concentración de etanol y xilitol formados frente a la concentración de xilosa consumida, análogas a la que se muestra en la Figura 5.33 (experimento C-A1), se han determinado los rendimientos globales en etanol y xilitol para cada uno de los experimentos de esta serie, valores que se recogen en la Tabla 5.21. En general, se observa que el valor de $Y_{E/s}^G$ disminuye con el caudal de aireación mientras aumenta levemente el rendimiento en xilitol, $\bar{Y}_{Xi/s}$. En relación al etanol, parece evidente que en los cultivos más aireados pueda existir

arrastre y/o evaporación de este componente y por tanto este hecho puede incidir en que el rendimiento disminuya conforme mayor sea el valor de Q. Así pues, desde el punto de vista de producción de etanol, las mejores condiciones corresponderían al experimento de menor aireación, donde se obtiene el más alto valor de $Y_{E/s}^G$ y el menor de $\bar{Y}_{Xi/s}$.

El rendimiento de $Y_{E/s}^G=0,41 \text{ Kg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ es de igual orden que los encontrados en la bibliografía para esta misma levadura. Así, Du Preez y col. (1986) y Wayman y col. (1985) obtienen unos rendimientos de etanol de 0,38 y 0,39 $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ cuando utilizan concentraciones iniciales de xilosa de 50 y 31 $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ respectivamente.

En cuanto al rendimiento en xilitol, próximo a 0,1 $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1}$, es algo inferior al obtenido por Ligthelm y col. (1988) utilizando esta misma levadura y una concentración inicial en xilosa de 40 $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$. Estos autores en condiciones limitadas de oxígeno encontraron un valor de $\bar{Y}_{Xi/s}=0,3 \text{ Kg} \cdot \text{Kg}^{-1}$.

TABLA 5.21

RENDIMIENTOS EN ETANOL Y XILITOL

(Candida shehatae)

INFLUENCIA DEL NIVEL DE AIREACIÓN

$s_o = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$

$\text{pH}_i = 5,5$

EXPTO.	Q v/v/min	$Y_{E/s}^G$ $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1}$	$\bar{Y}_{Xi/s}$ $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1}$
C-B	0,000	0,41	0,078
C-A1	0,075	0,41	0,094
C-A2	0,300	0,29	0,11

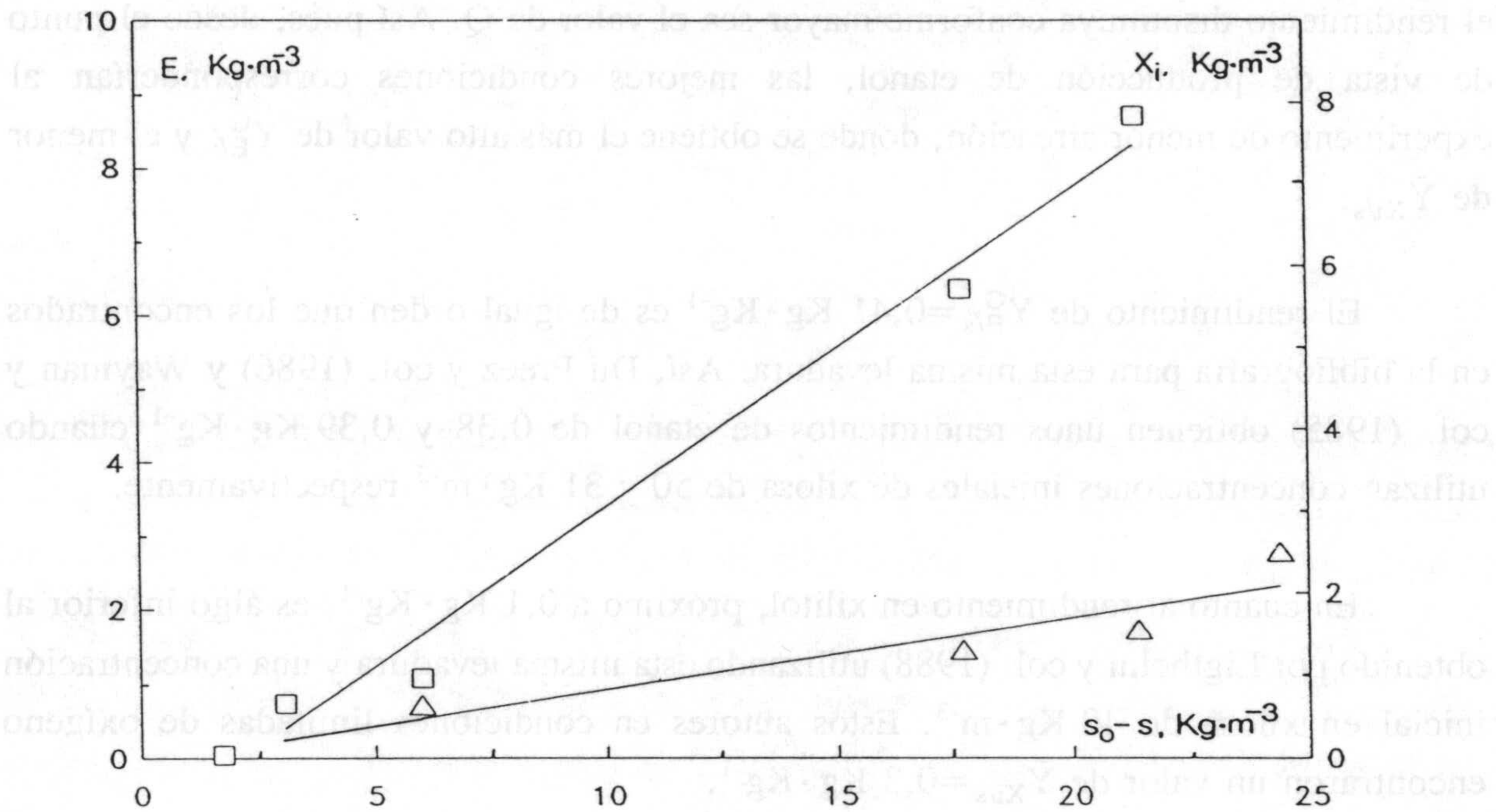


Fig. 5.33.- Rendimientos en etanol (\square) y xilitol (Δ), experimento C-A1 ($Q=0,075$ v/v/min)

Al igual que en *Hansenula polymorpha*, mediante un ajuste por mínimos cuadrados de los valores experimentales $E-(x-x_0)$, se ha podido calcular el parámetro $Y_{E/x}^G$. Como ejemplo en la Figura 5.34 se muestra este ajuste para el experimento base. Con el valor de $Y_{E/x}^G$ correspondiente a cada experimento y la ecuación [5.18], suponiendo que no existe o es despreciable el mantenimiento celular, se ha evaluado la velocidad específica de producción de etanol, q_E (Tabla 5.20) para un tiempo igual o próximo a las 20 horas. Los valores obtenidos por este procedimiento son comparables a los deducidos utilizando el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos.

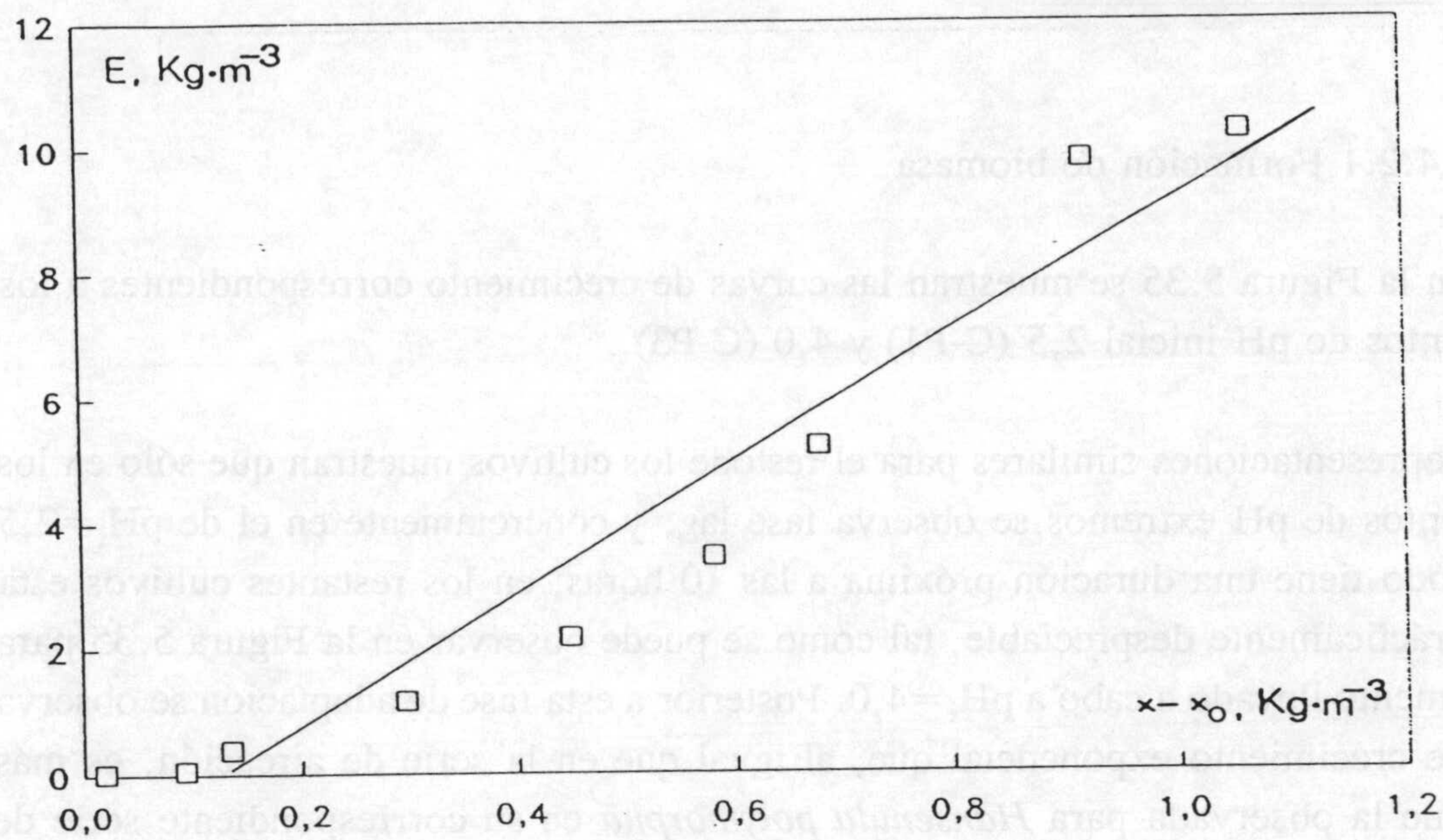


Fig. 5.34.- Etanol producido frente a biomasa neta formada, experimento C-B ($Q=0,0$ v/v/min)

5.4.2 Influencia del pH inicial

5.4.2.1 Formación de biomasa

En la Figura 5.35 se muestran las curvas de crecimiento correspondientes a los experimentos de pH inicial 2,5 (C-P1) y 4,0 (C-P3).

Representaciones similares para el resto de los cultivos muestran que sólo en los experimentos de pH extremos se observa fase lag, y concretamente en el de $\text{pH}_i=2,5$ este período tiene una duración próxima a las 10 horas; en los restantes cultivos esta fase es prácticamente despreciable, tal como se puede observar en la Figura 5.35 para el experimento llevado a cabo a $\text{pH}_i=4,0$. Posterior a esta fase de adaptación se observa la fase de crecimiento exponencial que, al igual que en la serie de aireación, es más amplia que la observada para *Hansenula polymorpha* en su correspondiente serie de pH_i .

Esta fase exponencial se ha cuantificado mediante la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , cuyos valores para cada uno de los experimentos de la serie se recogen en la Tabla 5.22. El valor de μ_m más alto se alcanza en el experimento de $\text{pH}_i=4,5$ (C-B), mientras que los valores más bajos de μ_m se obtienen a los pH_i extremos.

Estas velocidades específicas de crecimiento, obtenidas en la fermentación de xilosa con *Candida shehatae*, son sensiblemente superiores a las que resultan con *Pachysolen tannophilus* en las mismas condiciones de operación, aunque en ambas levaduras el mayor valor de μ_m se alcanza al mismo $\text{pH}_i=4,5$, Castro Galiano (1989). En *Pachysolen*, a $\text{pH}_i=4,5$ resulta que $\mu_m=0,26 \text{ h}^{-1}$, Bravo y col. (1990), mientras que en *Candida* se obtiene que $\mu_m=0,33 \text{ h}^{-1}$.

Por otro lado, Du Preez y col. (1989) encuentran en distintos mutantes de *Candida* valores de μ_m inferiores, que oscilan entre $0,05$ y $0,18 \text{ h}^{-1}$ cuando la concentración inicial de xilosa es $50 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$, la temperatura 30°C y el $\text{pH}_i=5,5$. Sin embargo, en esta investigación a $\text{pH}_i=5,5$, $t^a=30^\circ\text{C}$ y $s_0=25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ el valor de μ_m es $0,29 \text{ h}^{-1}$. Posiblemente las diferencias en estos resultados pueden ser debidas a la distinta concentración inicial de sustrato y al suministro de distinto caudal de aire.

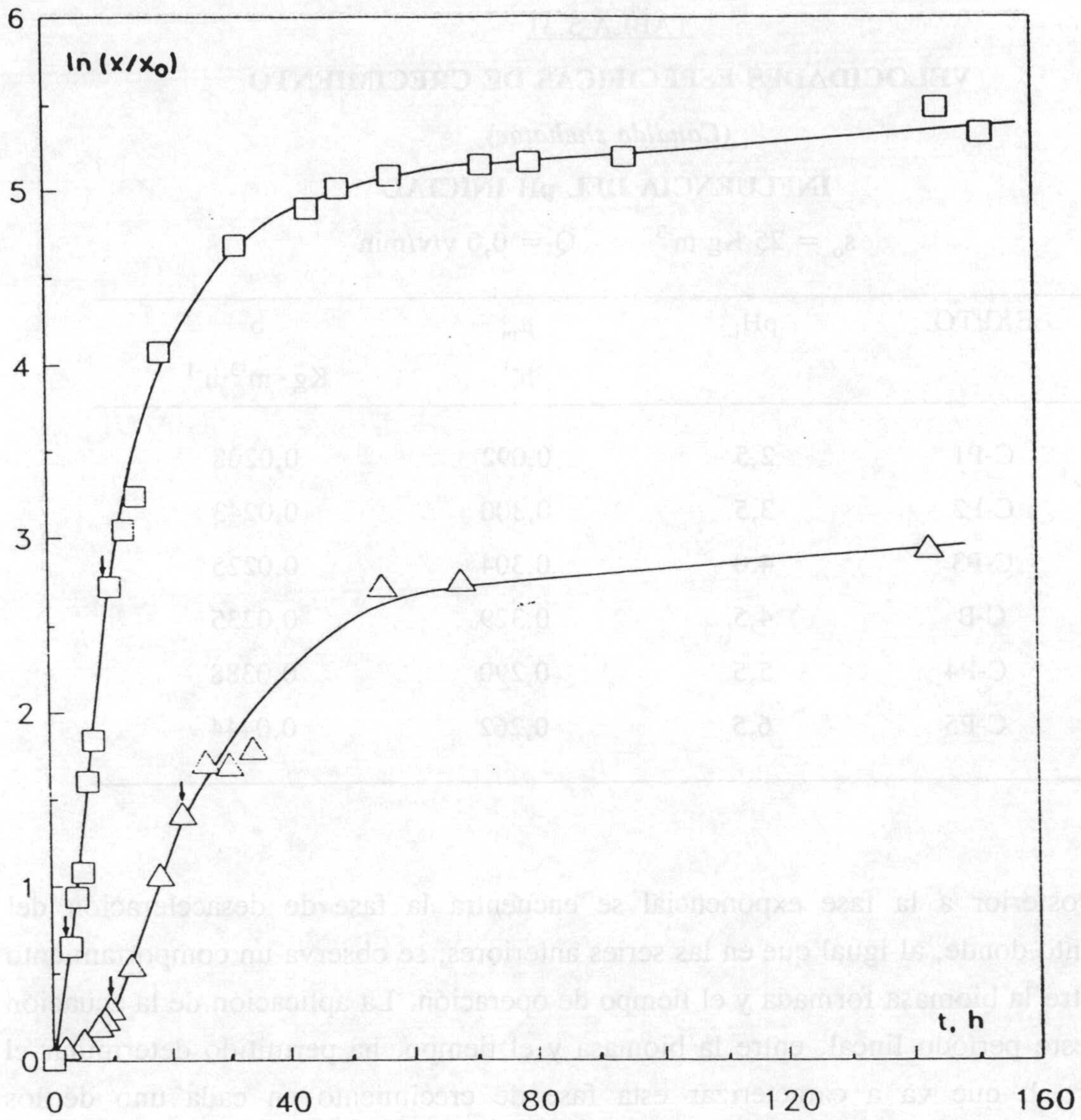


Fig. 5.35.- Curvas de crecimiento de los experimentos:
 (Δ) C-P1 (pH_i=2,5) y (□) C-P3 (pH_i=4,0)

TABLA 5.31
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO
(Candida shehatae)
INFLUENCIA DEL pH INICIAL

$$s_0 = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3} \quad Q = 0,0 \text{ v/v/min}$$

EXPTO.	pH _i	μ_m h ⁻¹	b Kg · m ⁻³ · h ⁻¹
C-P1	2,5	0,092	0,0208
C-P2	3,5	0,300	0,0243
C-P3	4,0	0,304	0,0225
C-B	4,5	0,329	0,0235
C-P4	5,5	0,290	0,0388
C-P5	6,5	0,262	0,0444

Posterior a la fase exponencial se encuentra la fase de desaceleración del crecimiento donde, al igual que en las series anteriores, se observa un comportamiento lineal entre la biomasa formada y el tiempo de operación. La aplicación de la ecuación [5.4] a este período lineal, entre la biomasa y el tiempo, ha permitido determinar el parámetro b que va a caracterizar esta fase de crecimiento en cada uno de los experimentos. Estos valores de b también se recogen en la Tabla 5.22, donde se observa que éste aumenta conforme el pH_i es mayor. También en este caso los valores de b en *Candida shehatae* son superiores a los obtenidos en *Pachysolen tannophilus* en las mismas condiciones de operación, Castro Galiano (1989).

5.3.2.2 Consumo de xilosa

En esta serie experimental el estudio del consumo de xilosa se ha abordado mediante el cálculo de la velocidad específica de consumo de sustrato y del rendimiento global en biomasa, $Y_{x/s}^G$.

26 MAR. 1993

De nuevo, para determinar la velocidad específica, q_s^D (método diferencial), se ha utilizado la ecuación [5.11]. Su linealización conduce a la expresión [5.12], la cual permite determinar los valores de α y β .

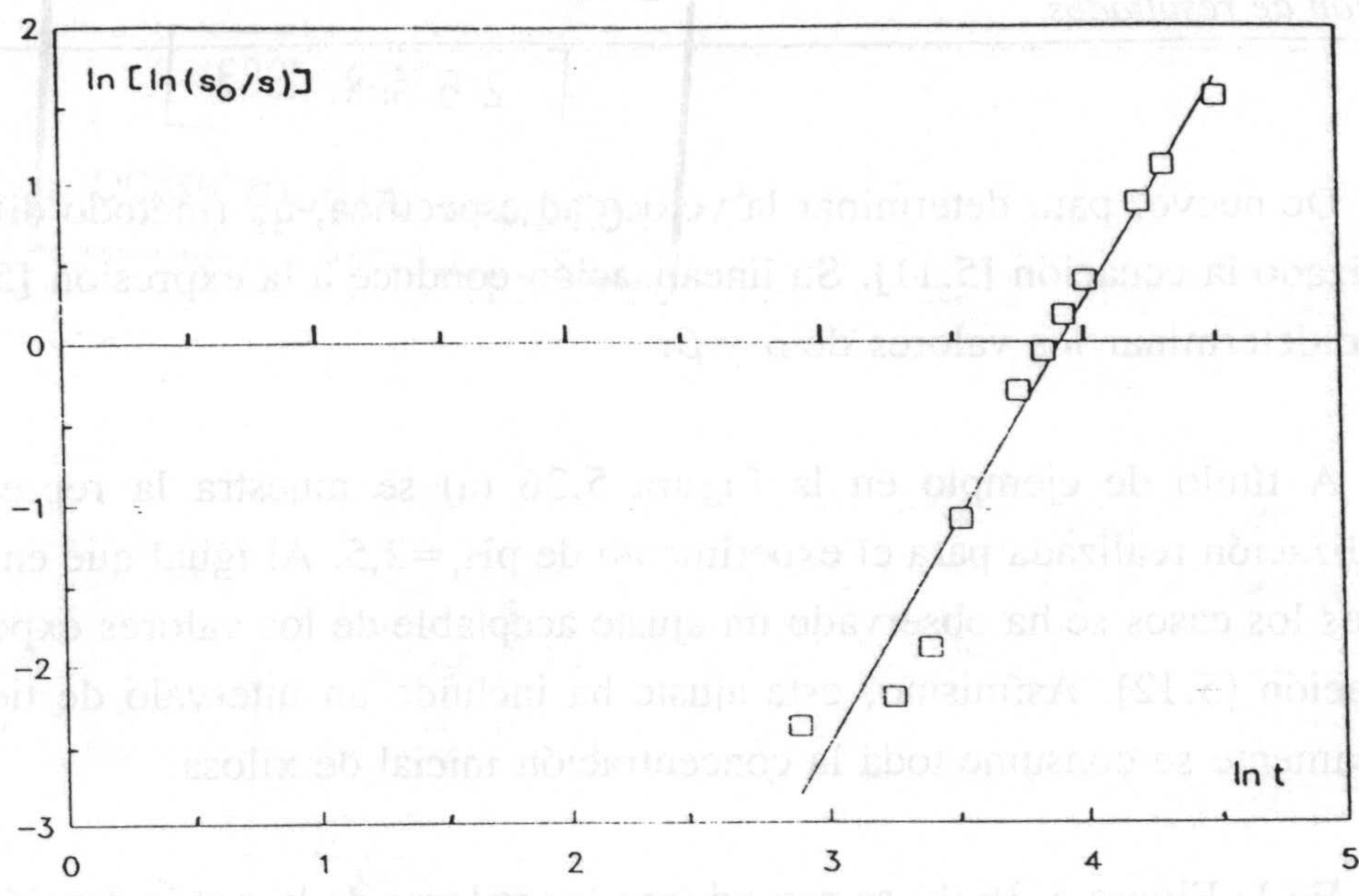
A título de ejemplo en la Figura 5.36 (a) se muestra la representación de la linealización realizada para el experimento de $\text{pH}_i = 2,5$. Al igual que en este cultivo, en todos los casos se ha observado un ajuste aceptable de los valores experimentales a la ecuación [5.12]. Asimismo, este ajuste ha incluido un intervalo de tiempo donde, prácticamente se consume toda la concentración inicial de xilosa.

En la Figura 5.36 (b) se reproducen los valores de la concentración residual de xilosa frente al tiempo por aplicación de la ecuación [5.11], para el cultivo realizado a $\text{pH}_i = 2,5$. Al igual que para éste, en los restantes experimentos de la serie se observan ajustes aceptables en los intervalos en que se han obtenido las correlaciones.

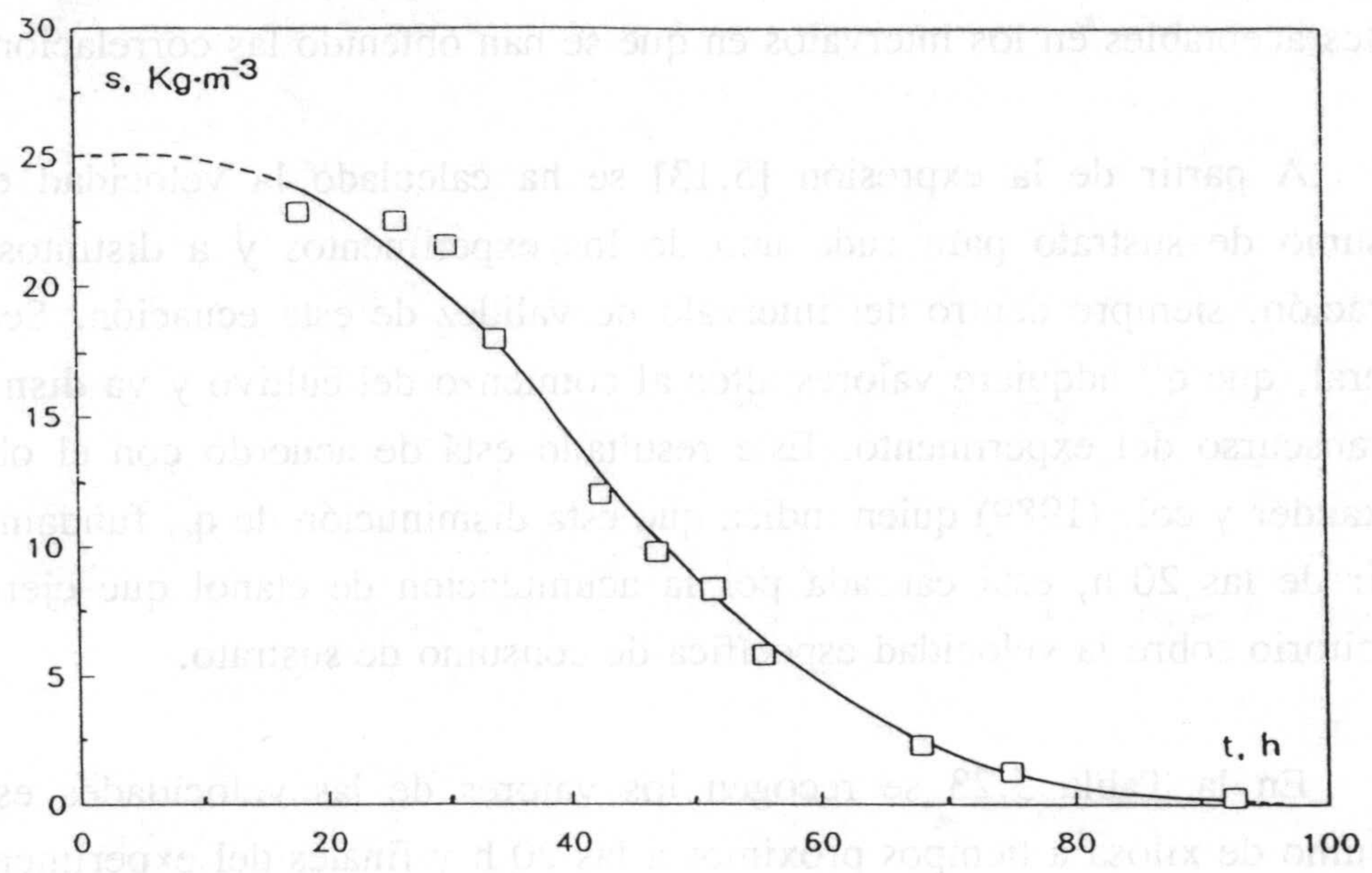
A partir de la expresión [5.13] se ha calculado la velocidad específica de consumo de sustrato para cada uno de los experimentos y a distintos tiempos de operación, siempre dentro del intervalo de validez de esta ecuación. Se observa, en general, que q_s^D adquiere valores altos al comienzo del cultivo y va disminuyendo en el transcurso del experimento. Este resultado está de acuerdo con el observado por Alexander y col. (1989) quien indica que esta disminución de q_s , fundamentalmente a partir de las 20 h, está causada por la acumulación de etanol que ejerce un efecto inhibitorio sobre la velocidad específica de consumo de sustrato.

En la Tabla 5.23 se recogen los valores de las velocidades específicas de consumo de xilosa a tiempos próximos a las 20 h y finales del experimento, 40 h. Se observa que los valores de q_s^D son prácticamente coincidentes en los experimentos realizados entre los pH_i 3,5 y 5,5, mientras que disminuye a los pH_i extremos.

Los valores de q_s^D más altos, obtenidos a tiempos próximos a las 20 h, son del orden de $2 \text{ (Kg xilosa)} \cdot \text{(Kg biomasa)}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, resultado que es bastante coincidente con el obtenido por Ligthelm y col. (1988) con *Candida shehatae*, en condiciones de limitación por oxígeno, a temperatura de 30°C y a un pH de 5,2. Sin embargo, estos mismos autores obtienen en condiciones aeróbicas un $q_s^{\text{MAX}} = 0,55 \text{ (Kg xilosa)} \cdot \text{(Kg biomasa)}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ que es bastante inferior.



a)



b)

Fig. 5.36.- a) Ajuste de los datos experimentales de consumo de xilosa a la ecuación [5.12], experimento C-P1 ($pH_i=2,5$)
 b) Reproducción de la ecuación [5.11], experimento C-P1

TABLA 5.23
RENDIMIENTOS EN BIOMASA Y
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO
(*Candida shehatae*)

INFLUENCIA DEL pH INICIAL

$s_o = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ $Q = 0,0 \text{ v/v/min}$

EXPTO.	pH _i	Y _{x/s} ^G Kg · Kg ⁻¹	t h	q _s ^D Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹	q _s Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹
C-P1	2,5	0,040	18,0	1,2	-
			40,0	0,9	0,9
C-P2	3,5	0,042	20,0	1,8	1,9
			40,0	1,0	0,7
C-P3	4,0	0,038	20,0	1,9	1,7
			40,0	0,7	0,8
C-B	4,5	0,036	20,0	2,0	2,2
			40,0	0,8	0,8
C-P4	5,5	0,052	20,0	2,0	1,9
			30,0	0,9	0,9
C-P5	6,5	0,068	22,0	1,2	1,1
			40,0	0,5	0,5

Por otra parte, a partir de representaciones de la concentración de biomasa neta formada, $x-x_o$, frente a la de sustrato consumido, s_o-s , similares a la que se muestra en la Figura 5.37, se han determinado los rendimientos globales en biomasa, $Y_{x/s}^G$. Estos resultados para cada uno de los experimentos de la serie se indican en la Tabla 5.23. Se observa que entre pH_i 2,5 y 4,5 el rendimiento permanece prácticamente constante y en un valor próximo a 0,04 (Kg biomasa) · (Kg xilosa)⁻¹. A partir de pH_i=4,5 se detecta un aumento de $Y_{x/s}^G$.

Estos rendimientos en biomasa son sensiblemente inferiores a los obtenidos con *Pachysolen tannophilus* en idénticas condiciones de operación. Concretamente para esta levadura, y para un pH_i=4,5, el valor de $Y_{x/s}^G$ fue del orden de 0,1 (Kg biomasa) · (Kg xilosa)⁻¹. Por tanto, se puede decir que *Candida shehatae* en comparación con

Pachysolen tannophilus tiene la posibilidad de invertir un mayor porcentaje de la concentración de xilosa en la formación de bioetanol.

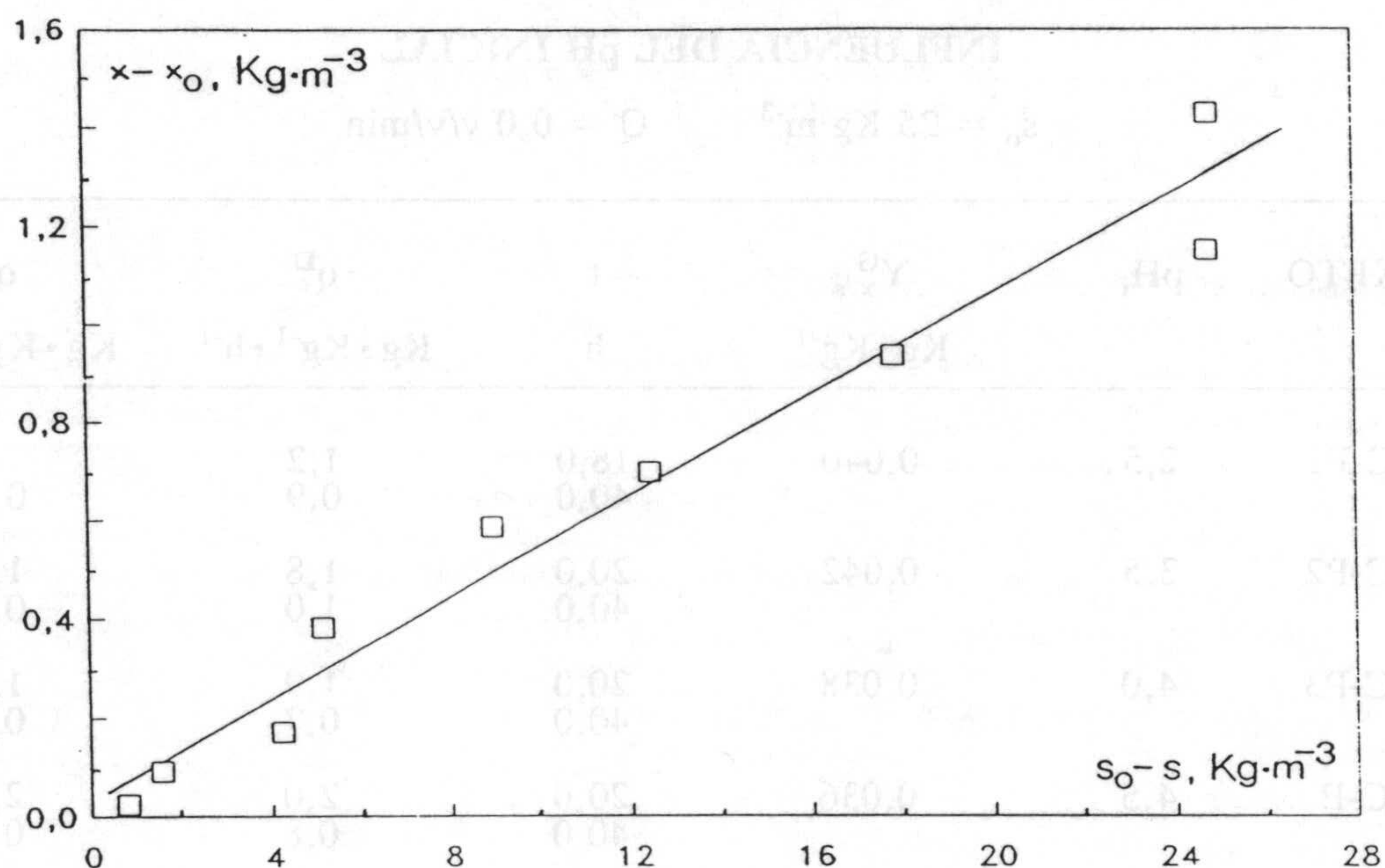


Fig. 5.37.- Rendimiento medio en biomasa, experimento C-P4 ($\text{pH}_i = 5,5$)

Asímismo, a partir del rendimiento en biomasa, $Y_{x/s}^G$, y de la velocidad específica de crecimiento determinada en el período lineal, $\mu = b/x$, se ha calculado la velocidad específica de consumo de xilosa, q_s , mediante la ecuación [5.14] ($q_s = \mu / Y_{x/s}^G$). Estos valores de q_s también se recogen en la Tabla 5.23 a los mismos tiempos de operación que los tabulados para q_s^D (método diferencial), con el fin de poder realizar una mejor comparación entre ambos procedimientos de cálculo de la velocidad específica de consumo de xilosa. En general se observa una aceptable concordancia entre ambos procedimientos.

5.3.2.3. Formación de bioproductos

Al igual que en la serie de aireación, los datos experimentales Etanol-Tiempo se han tratado de ajustar a la ecuación [5.19]. Su forma linealizada, ecuación [5.20], permite determinar las constantes A y B, y posteriormente a partir de la expresión [5.19] calcular la tasa volumétrica de formación de etanol, dE/dt , y con ello obtener finalmente la velocidad específica de formación de etanol, q_E^D (método diferencial). Como ejemplo, en la Figura 5.38 (a) se muestra la representación de $\ln (E/E_T)$ frente a $1/t$ para el experimento de $pH_i=6,5$. Asimismo en la Figura 5.38 (b) se reproduce la ecuación [5.19] junto con los valores experimentales. En todos los casos, los ajustes se han realizado desde un tiempo menor a 10 horas hasta que se alcanza la máxima concentración de etanol; esta última coincide con un tiempo donde la concentración de xilosa suele ser inferior a $0,5 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$.

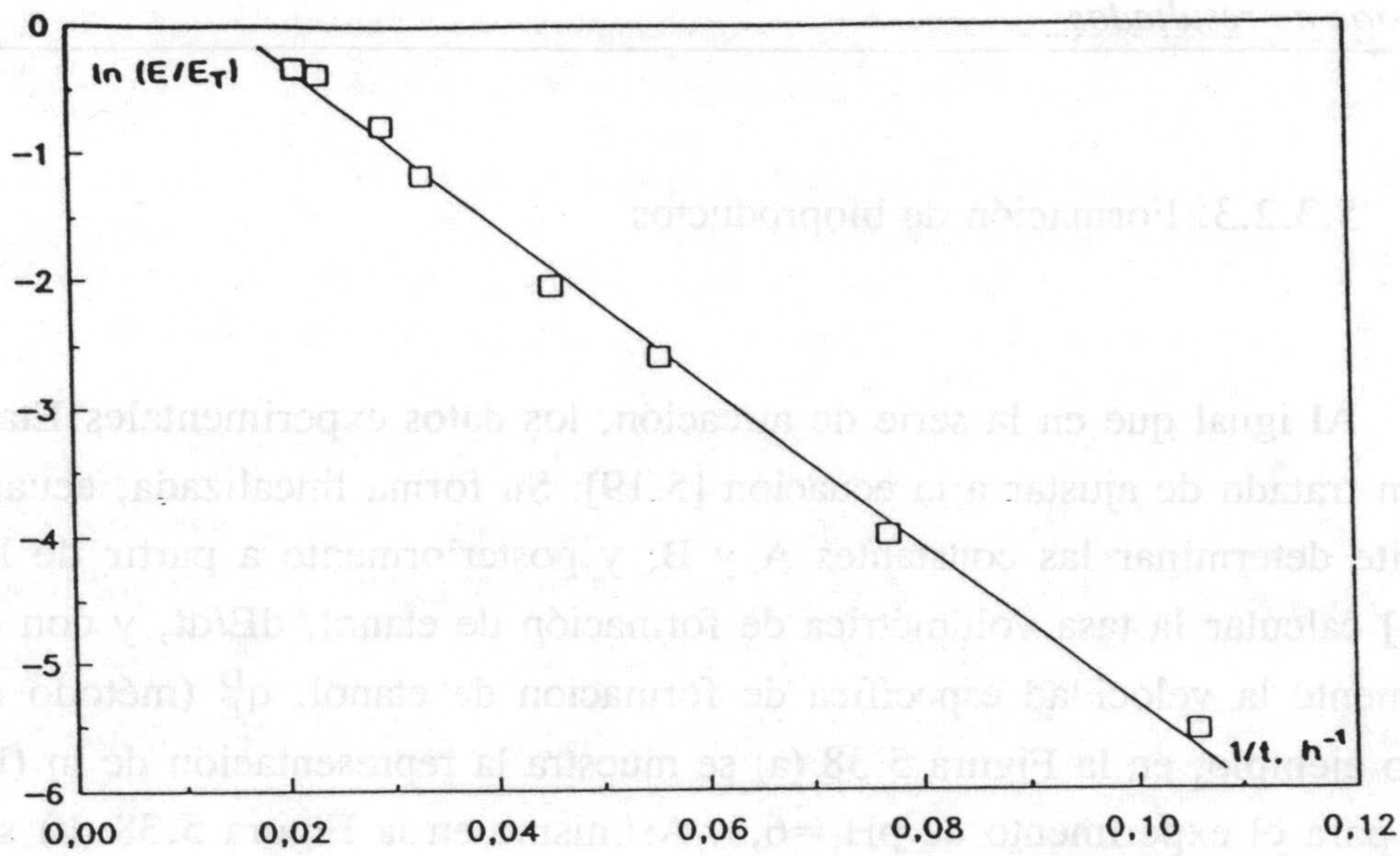
Los valores de q_E^D resultantes, correspondientes a un tiempo igual o próximo a las 20 h, y para cada uno de los cultivos de la serie se recogen en la Tabla 5.24, donde también se ha incluido el experimento base ($pH_i=4,5$) con objeto de poder realizar una mejor comparación.

TABLA 5.24
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL
(*Candida shehatae*)

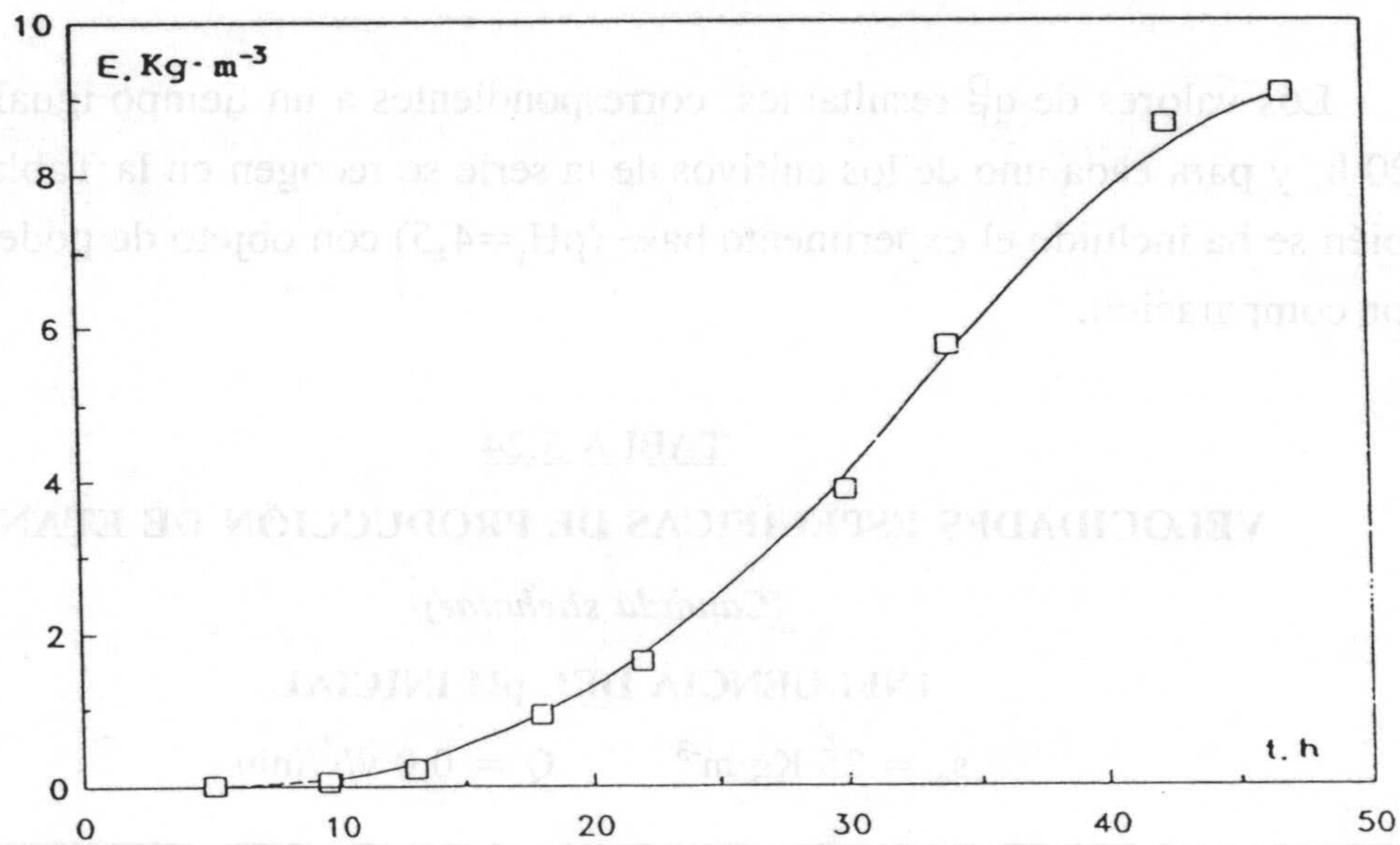
INFLUENCIA DEL pH INICIAL

$s_o = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ $Q = 0,0 \text{ v/v/min}$

EXPTO.	pH _i	t h	q _E ^D Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹	q _E Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹
C-P1	2,5	22,0	0,39	0,56
C-P2	3,5	20,0	0,59	0,65
C-P3	4,0	20,0	0,52	0,64
C-B	4,5	20,0	0,72	0,79
C-P4	5,5	20,0	0,57	0,75
C-P5	6,5	20,0	0,49	0,56



a)



b)

Fig. 5.38.- a) Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol a la ecuación [5.25], experimento C-P5 ($pH_i=6,5$)
 b) Reproducción de la ecuación [5.24], experimento C-P5

Es necesario indicar que los máximos valores de q_E^D se alcanzan a tiempos de operación próximos a las 20 h, posteriormente la velocidad específica de formación de etanol disminuye de forma gradual en el transcurso del experimento. En general, este resultado coincide con el observado por du Preez y col. (1989) en una fermentación discontinua de disoluciones de xilosa con esta misma levadura. Estos autores, al igual que en este trabajo detectan una disminución en el valor de la velocidad específica de formación de etanol conforme aumenta en el medio de cultivo la concentración de éste. Sin embargo, los valores máximos de q_E^D detectados son del orden de $0,4 \text{ Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, mientras que en nuestro caso se han alcanzado velocidades específicas próximas a $0,8 \text{ Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Para $t=20 \text{ h}$, el valor más alto de q_E^D se obtiene en el experimento de $\text{pH}_i=4,5$, observándose una apreciable disminución a los pH iniciales extremos ensayados. Este valor de $\text{pH}_i=4,5$ coincide con el seleccionado para *Pachysolen tannophilus*, Castro Galiano (1989); sin embargo, los valores de la velocidad específica de formación de etanol obtenidos en *Candida shehatae* son muy superiores a los observados en *Pachysolen*, también en la fermentación de disoluciones de xilosa y en las mismas condiciones de operación. Concretamente para $\text{pH}_i=4,5$ en *Pachysolen* q_E^D es del orden de $0,06 \text{ Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, mientras que en *Candida* el valor de q_E^D es próximo a $0,8 \text{ Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Por otro lado, a partir de representaciones de las concentraciones de etanol y xilitol formadas frente a la de xilosa consumida, similares a la que se muestra en la Figura 5.39, se han podido calcular los rendimientos global en etanol, $Y_{E/s}^G$, y medio en xilitol, $\bar{Y}_{Xi/s}$. Estos rendimientos se recogen en la Tabla 5.25 para cada uno de los experimentos de la serie. Se observa que mientras $\bar{Y}_{Xi/s}$ disminuye con el pH_i , el rendimiento global en etanol permanece prácticamente constante y próximo a $0,4 (\text{Kg etanol}) \cdot (\text{Kg xilosa})^{-1}$, excepto en el experimento de $\text{pH}_i=2,5$ donde $Y_{E/s}^G$ alcanza el valor más bajo.

El valor del rendimiento en xilitol es del mismo orden que el obtenido por Sreenath y col. (1987) en la fermentación de disoluciones de xilosa con *Candida shehatae*. Estos autores obtienen un valor de $\bar{Y}_{Xi/s}=0,1 \text{ Kg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ en condiciones de operación muy parecidas a las empleadas en esta investigación: temperatura entre 30 y 32°C , agitación 400 rpm y un pH_i de $3,2$ a $3,5$. Hay que indicar, de acuerdo con la

Tabla 5.25 que para $\text{pH}_i=3,5$ resulta $\bar{Y}_{X_i/s}=0,082 \text{ Kg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, valor obtenido con una agitación de 500 rpm y una temperatura constante de 30°C .

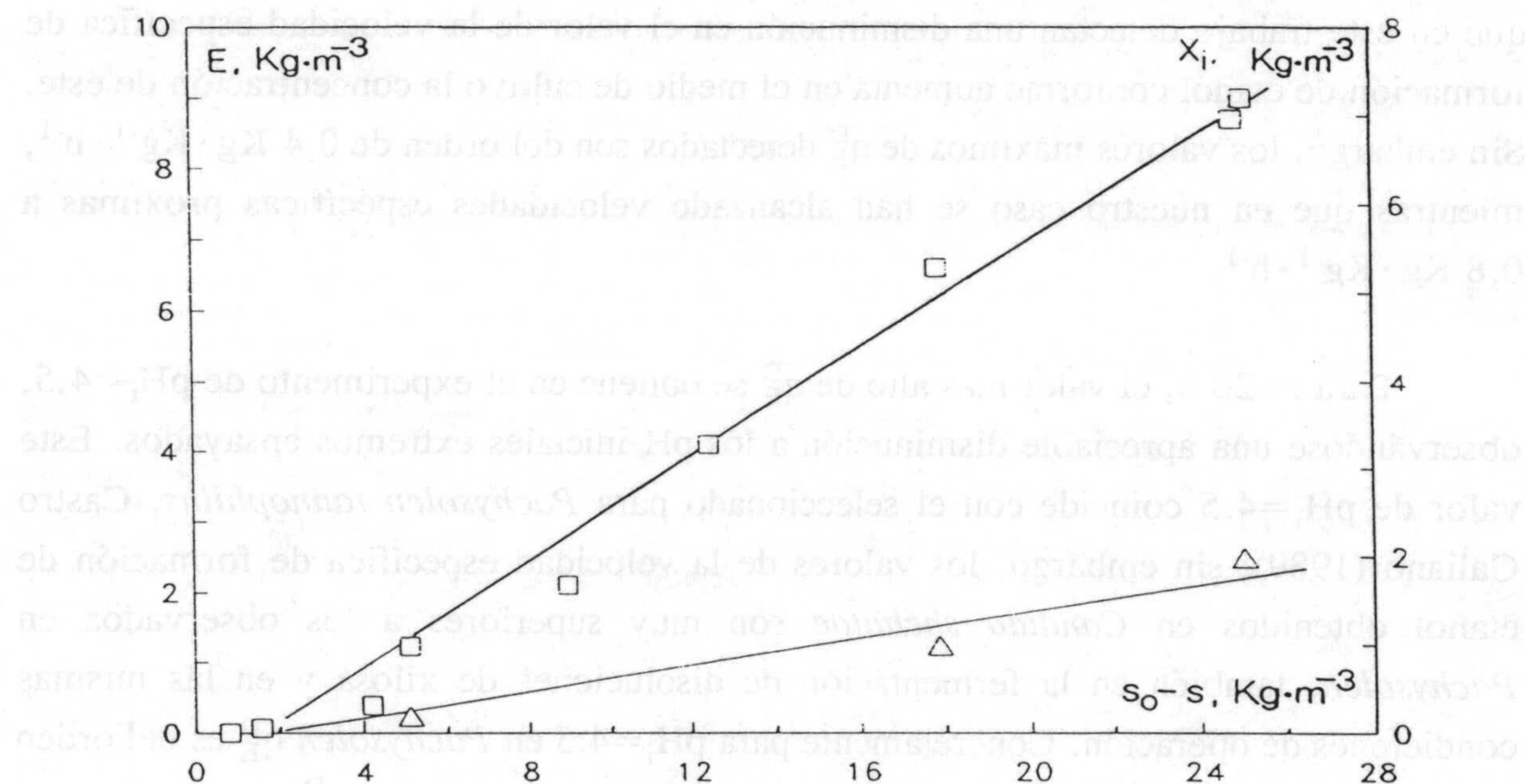


Fig. 5.39.- Rendimientos en etanol (\square) y xilitol (Δ), experimento C-P4 ($\text{pH}_i=4,5$)

En cuanto al rendimiento global en etanol, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por du Preez y col. (1989) y du Preez y Prior (1981) con esta misma levadura y en condiciones de operación similares. Estos autores también obtienen rendimientos máximos comprendidos entre $0,38$ y $0,45 \text{ Kg}\cdot\text{Kg}^{-1}$.

Finalmente, mediante representaciones de la concentración de etanol frente a la correspondiente de biomasa neta formada, se ha evaluado la productividad de etanol por unidad de biomasa, $Y_{E/x}^G$, mediante un ajuste por regresión lineal de los valores de E y $(x-x_0)$. En todos los casos se han obtenido gráficos similares al que se muestra en la Figura 5.40. Posteriormente, con el valor de $Y_{E/x}^G$ y con la velocidad específica correspondiente a un tiempo del período de crecimiento lineal se ha calculado la velocidad específica de formación de etanol, q_E , por aplicación de la ecuación [5.18]. Estos valores también se recogen en la Tabla 5.24 junto con los de q_E^D (método diferencial) con el fin de realizar una mejor comparación. En general, se observa que

los valores de la velocidad específica de formación de etanol determinados por ambos procedimientos son próximos.

TABLA 5.35
RENDIMIENTOS EN ETANOL Y XILITOL
(Candida shehatae)
INFLUENCIA DEL pH INICIAL

EXPTO.	pH _i	$Y_{E/s}^G$ Kg · Kg ⁻¹	$\bar{Y}_{Xi/s}$ Kg · Kg ⁻¹
C-P1	2,5	0,30	0,097
C-P2	3,5	0,39	0,082
C-P3	4,0	0,34	0,080
C-B	4,5	0,41	0,078
C-P4	5,5	0,38	0,076
C-P5	6,5	0,40	0,063

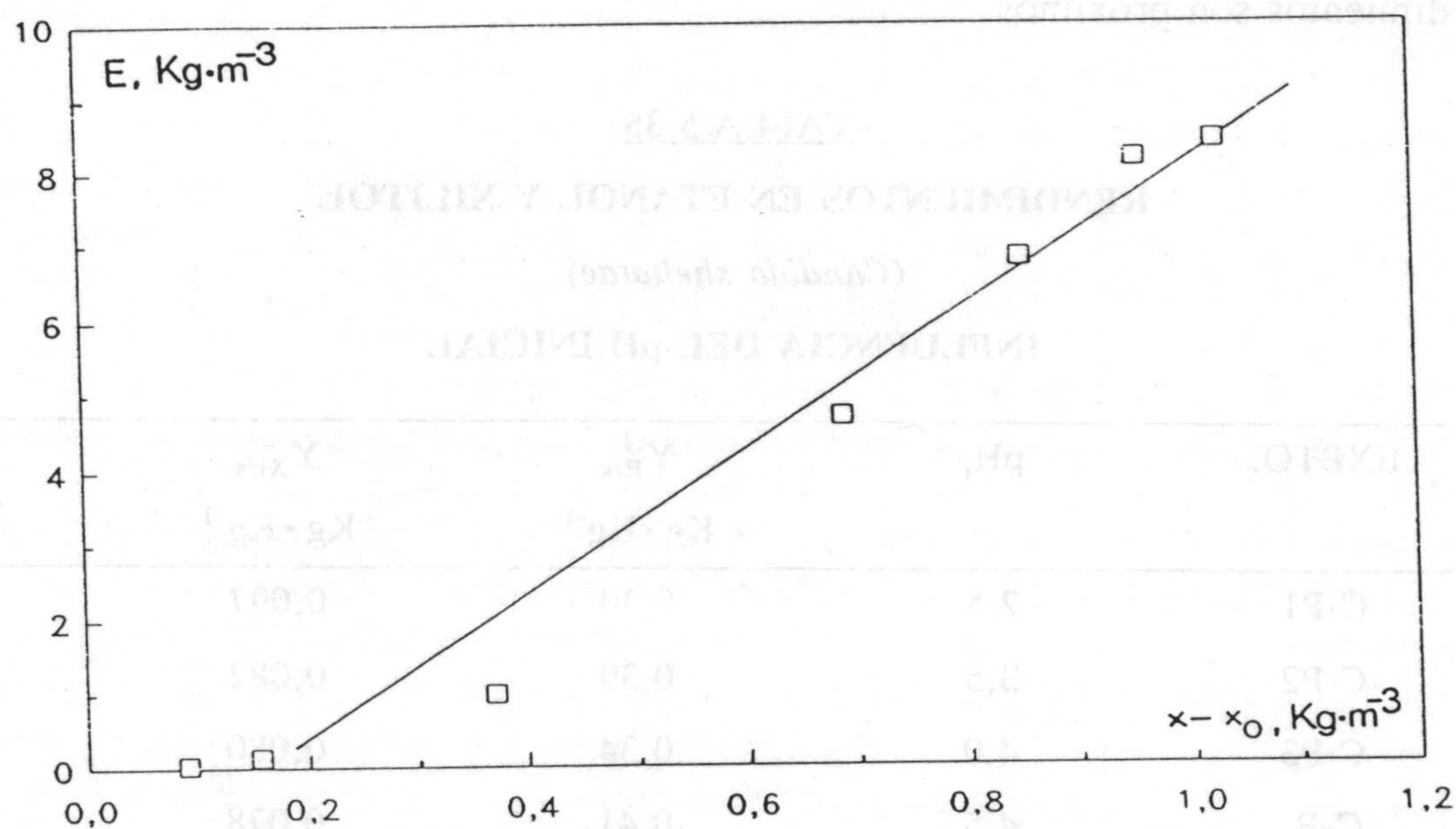


Fig. 5.40.- Etanol producido frente a biomasa neta formada, experimento C-P3 ($\text{pH}_i=4,0$)

5.4.3 Utilización de disoluciones de xilosa y glucosa

En esta serie de experimentos se ha analizado la influencia de la composición del medio de cultivo, en cuanto a la proporción inicial de xilosa y glucosa, sobre el crecimiento, el consumo de sustrato y la formación de bioproductos. Se han realizado cuatro cultivos en los que la concentración inicial de xilosa se ha modificado desde 20 a 0 $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ mientras que la de glucosa se ha variado, en sentido inverso, desde 5 a 25 $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$, de forma que la concentración inicial total de los dos sustratos ha sido de 25 $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Además, se ha realizado un experimento en ausencia de sustrato.

5.4.3.1 Formación de biomasa

En la Figura 5.41 aparecen las curvas de crecimiento correspondientes a los experimentos con disoluciones de xilosa+glucosa en proporciones extremas (C-M1 y C-M4) y al cultivo realizado en ausencia de sustrato (C-M5).

La fase lag es prácticamente despreciable en todos los casos. Seguidamente existe una fase de crecimiento exponencial de duración reducida.

Como puede observarse, en los cultivos con mayor proporción inicial de glucosa se alcanza la fase estacionaria de crecimiento inmediatamente después de la exponencial, de forma que no existe crecimiento lineal neto posterior. Además el final de la fase exponencial coincide con el consumo total de sustrato.

En los experimentos realizados con una mayor proporción de xilosa, la fase exponencial es seguida por un período de crecimiento a menor velocidad, de forma que puede admitirse un comportamiento lineal entre la biomasa formada y el tiempo transcurrido; en estos casos, la fase exponencial termina cuando la concentración de sustrato residual es aún próxima a la inicial, mientras que la fase estacionaria corresponde prácticamente al consumo total de sustrato.

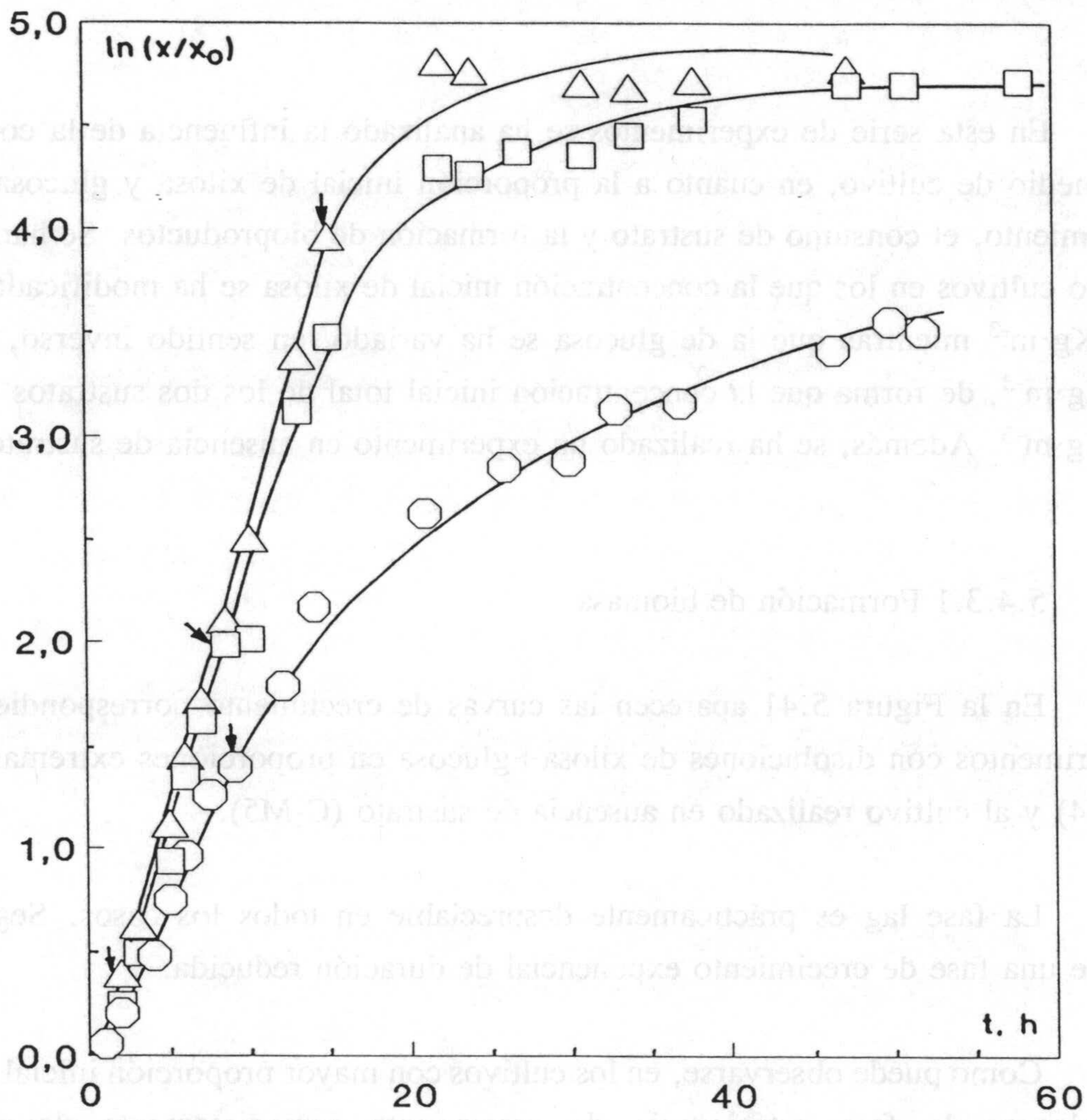


Fig. 5.41.- Curvas de crecimiento para los experimentos:

- C-M1 ($s_0=20, g_0=5 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
- △ C-M4 ($s_0=0, g_0=25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$) y
- C-M5 ($s_0=0, g_0=0 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)

Esta diferencia de comportamiento se refleja más claramente en el cultivo realizado en ausencia de sustrato, en el que se observa la transición de la fase exponencial a la estacionaria, a través del período de comportamiento lineal. Además, los valores de las velocidades correspondientes a cada período son lógicamente inferiores a los correspondientes para los experimentos en que sí se empleó una concentración no nula de sustrato.

En la Figura 5.41 aparecen marcadas entre flechas las fases de crecimiento exponencial. Los valores de la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , correspondientes se recogen en la Tabla 5.26, junto a los del experimento base. Asimismo, en dicha tabla aparecen los valores encontrados para la productividad en biomasa, b, característica de los cultivos en que existe un período de formación de biomasa lineal con el tiempo.

TABLA 5.26
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO
(Candida shehatae)

SUSTRATOS: XILOSA-GLUCOSA
 $Q = 0,0 \text{ v/v/min}$ $\text{pH}_i = 4,5$

EXPTO.	s_0 $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$	g_0 $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$	μ_m h^{-1}	b $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$
C-B	25	0	0,329	0,024
C-M1	20	5	0,273	0,030
C-M2	15	10	0,279	0,025
C-M3	5	20	0,280	--
C-M4	0	25	0,268	--
C-M5	0	0	0,186	0,013

Como puede observarse, la presencia de glucosa en el medio de cultivo, incluso en pequeña proporción, produce una reducción de los valores de μ_m , si bien no existe una relación significativa entre éstos y la concentración inicial de glucosa, por lo que se podría concluir que, al igual que con *Pachysolen tannophilus*, serían μ_m

correspondientes a un crecimiento exclusivo sobre glucosa. El valor de la velocidad específica máxima de crecimiento cuando se utiliza exclusivamente glucosa como sustrato es superior al obtenido por Ligthelm y col. (1988), $\mu_m = 0,17 \text{ h}^{-1}$ en condiciones aerobias. Sin embargo, estos autores utilizan condiciones de operación más desfavorables, $\text{pH} = 5,2$ y una concentración inicial de glucosa de $40 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$.

En los experimentos con mayor proporción de glucosa no puede determinarse productividades en biomasa porque, como se ha indicado, la fase exponencial de crecimiento es seguida por la fase estacionaria. Por otra parte, el experimento realizado en ausencia de sustrato presenta los menores valores de ambos parámetros.

5.4.3.2 Consumo de sustrato

Como en el caso de *Pachysolen tannophilus*, se ha observado que en *Candida shehatae* se produce un consumo secuencial de los dos sustrato utilizados, de forma que el empleo de xilosa prácticamente no tiene lugar hasta que no ha sido consumida la glucosa.

En este sentido, du Preez y col. (1986) también observan el fenómeno diáuxico en la utilización de glucosa y xilosa por *Candida shehatae*. Estos autores, utilizando mezclas de azúcares con porcentajes del 1% en el medio de cultivo, detectan que en primer lugar se consume glucosa y posteriormente xilosa.

En la Figura 5.42 (a) aparece un ejemplo de la linealización realizada a la ecuación [5.11] para evaluar la derivada $d(s_0 - s)/dt$ que aparece en la expresión de la velocidad específica de consumo de sustrato, q_s . La figura corresponde al experimento C-M2.

Puede observarse que se obtienen dos intervalos de tiempo que se pueden caracterizar mediante dos ecuaciones distintas (línea continua de la figura) y que corresponden a los períodos de consumo preferente de cada uno de los sustratos, comenzando por glucosa. Entre ambos intervalos, existe un período de adaptación del microorganismo al nuevo sustrato (línea discontinua).

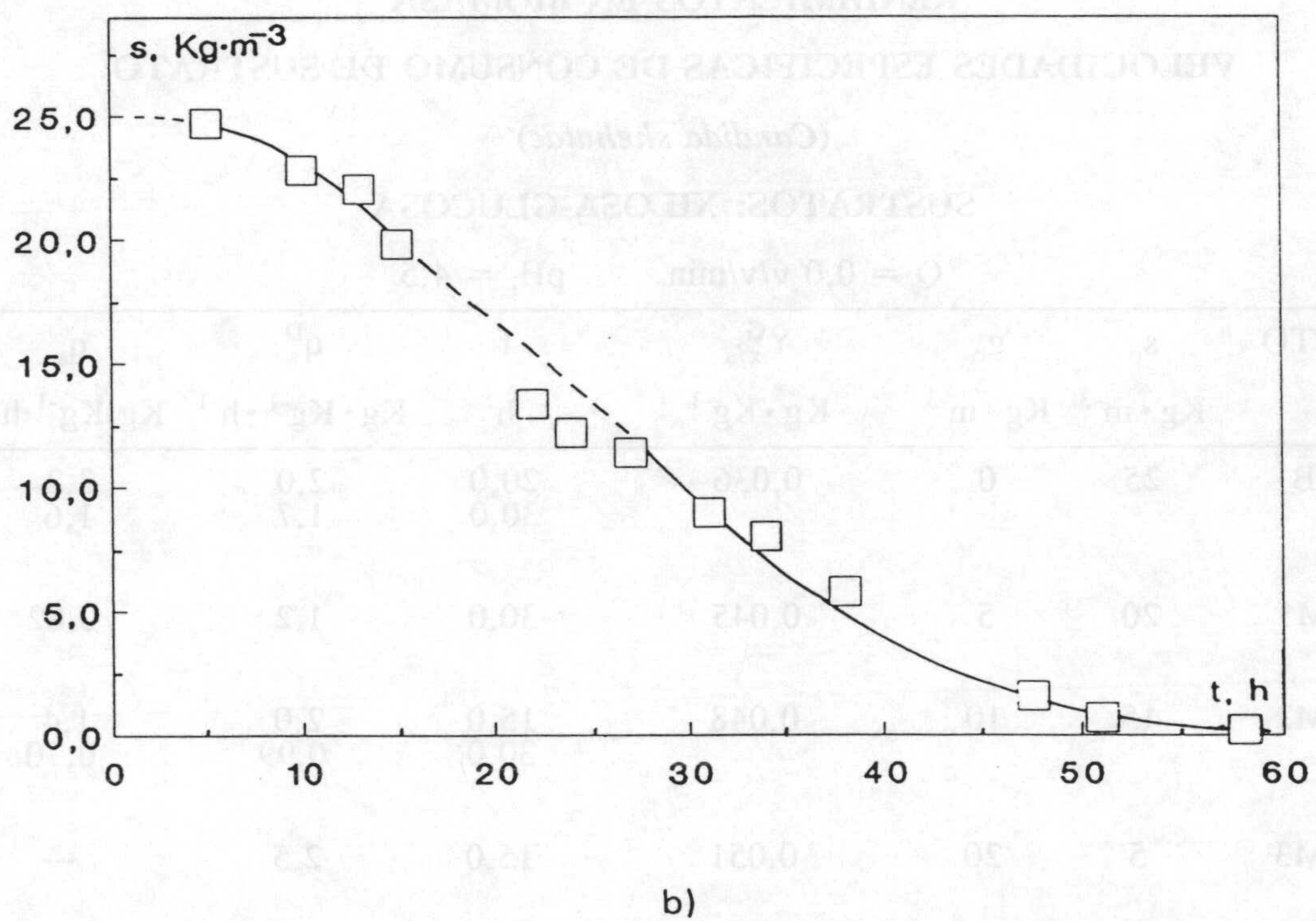
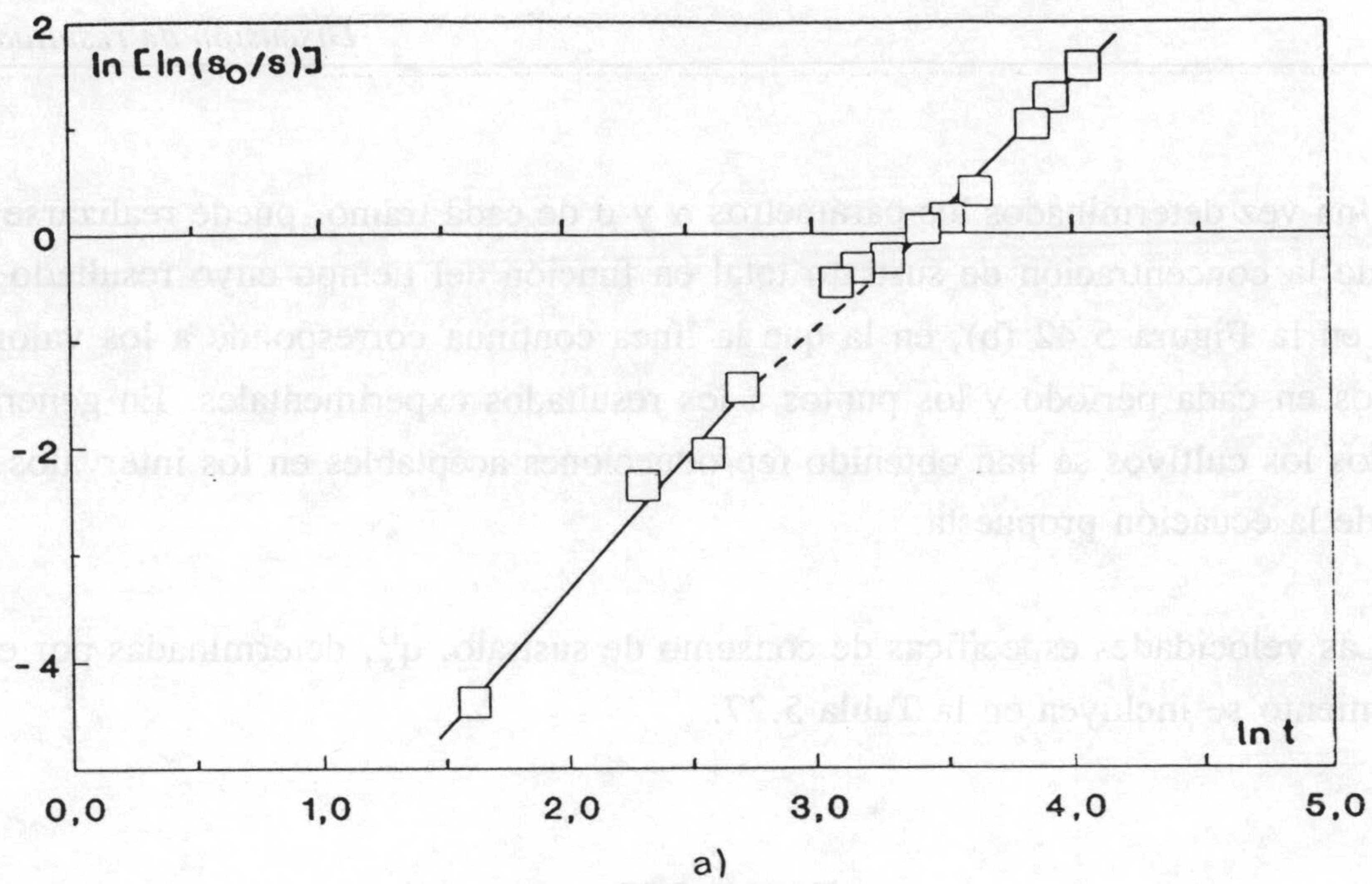


Fig. 5.42.- a) Aplicación de la ecuación [5.12] al experimento C-M2 ($s_0 = 15$ y $g_0 = 10 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
 b) Reproducción de los resultados experimentales para el cultivo C-M2

Una vez determinados los parámetros α y β de cada tramo, puede realizarse el cálculo de la concentración de sustrato total en función del tiempo cuyo resultado se muestra en la Figura 5.42 (b), en la que la línea continua corresponde a los valores calculados en cada período y los puntos a los resultados experimentales. En general, para todos los cultivos se han obtenido reproducciones aceptables en los intervalos de validez de la ecuación propuesta.

Las velocidades específicas de consumo de sustrato, q_s^D , determinadas por este procedimiento se incluyen en la Tabla 5.27.

TABLA 5.27
RENDIMIENTOS EN BIOMASA
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO
(*Candida shehatae*)
SUSTRATOS: XILOSA-GLUCOSA

EXPTO	$Q = 0,0 \text{ v/v/min}$		$pH_i = 4,5$			
	s_0 $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$	g_0 $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$	$Y_{x/s}^G$ $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1}$	t h	q_s^D $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	q_s $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
C-B	25	0	0,036	20,0	2,0	2,2
				30,0	1,7	1,6
C-M1	20	5	0,045	30,0	1,2	0,82
C-M2	15	10	0,048	15,0	2,0	1,4
				30,0	0,99	0,70
C-M3	5	20	0,051	15,0	2,5	---
C-M4	0	25	0,060	15,0	4,8	4,5

Los valores obtenidos para tiempos de cultivo más pequeños corresponden al período en el que se consume preferentemente glucosa, mientras que los de tiempos superiores (30 horas) son característicos de la etapa de consumo preferente de xilosa.

Los valores de q_s^D aumentan a medida que lo hace la concentración inicial en

glucosa. Por otra parte, para los experimentos realizados con mayor proporción de xilosa, la velocidad específica de consumo de sustrato disminuye, en general, con el tiempo, siendo la reducción mayor cuanto mayor es el contenido en glucosa.

Este resultado coincide en parte por el indicado por Jeffries y Sreenath (1988); cuando emplean xilosa y glucosa observan que ambos azúcares, por separado, son asimilados perfectamente por *Candida shehatae*, siendo glucosa más rápidamente consumida que xilosa. Sin embargo, en sus mezclas detectan que la utilización o consumo de glucosa está inhibido por xilosa y que el consumo de xilosa está inhibido por la presencia de glucosa. En la presente investigación, tal como muestra la Tabla 5.27, se observa en cierta medida un fenómeno similar, que puede ser debido, como indican estos autores, a una competencia directa de ambos azúcares por el mismo sistema de transporte.

Por otro lado, a partir de representaciones análogas a las de la Figura 5.43, correspondiente al experimento C-M4, se han evaluado los rendimientos globales en biomasa, $Y_{x/s}^G$, que se recogen también en la Tabla 5.27.

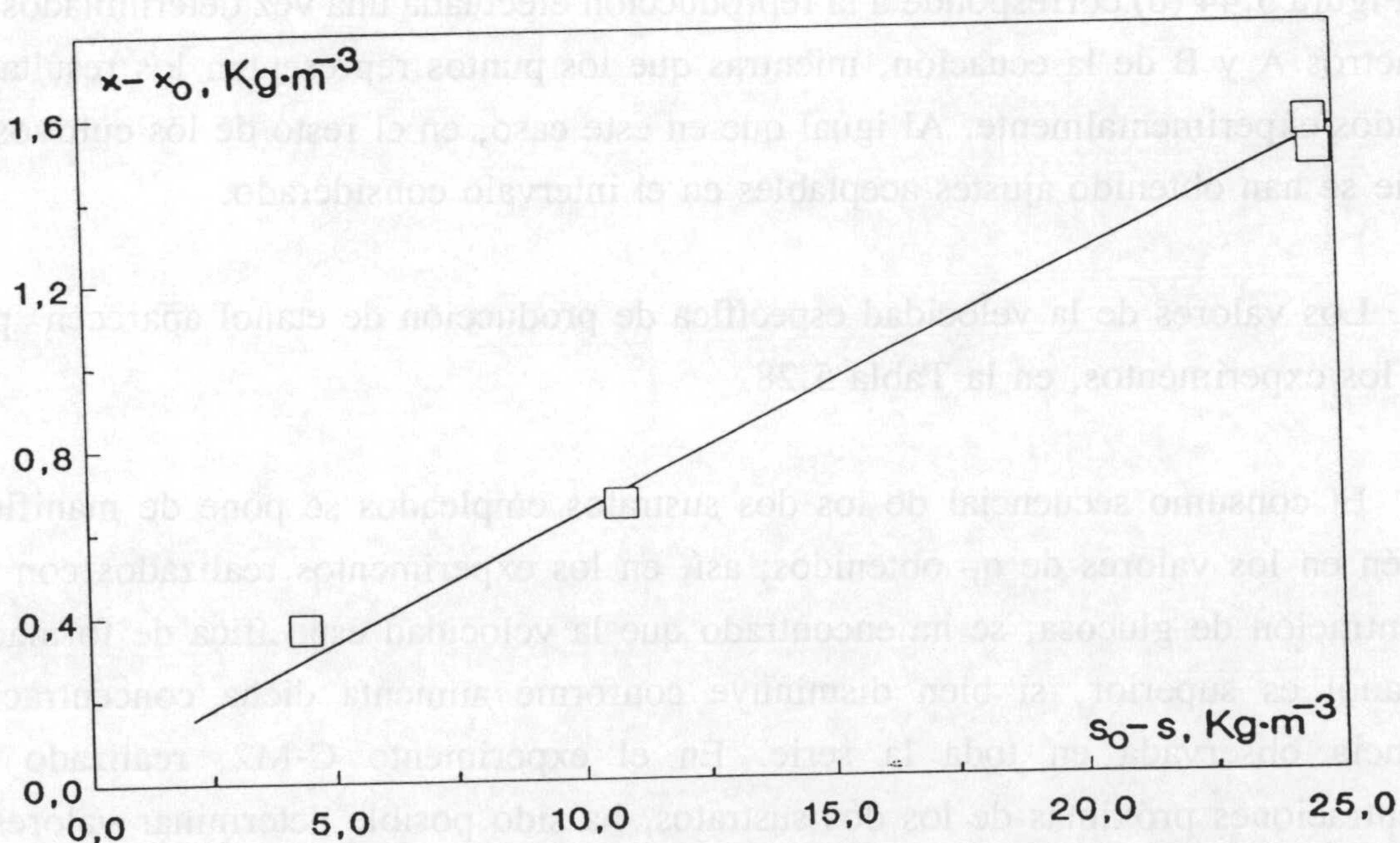


Fig. 5.43.- Rendimiento en biomasa para el experimento C-M4 ($s_0=0$, $g_0=25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)

El rendimiento en biomasa aumenta con la proporción de glucosa en el medio de cultivo.

Cuando el rendimiento en biomasa permanece constante a lo largo del experimento y, admitiendo que no existe mantenimiento celular o que es despreciable, puede calcularse, según la ecuación [5.14], la velocidad específica de consumo de sustrato, q_s , a partir de los valores correspondientes de μ y de $Y_{x/s}^G$. De esta forma se han determinado los valores de q_s que aparecen, junto a los de q_s^D , en la Tabla 5.27, a iguales tiempos de cultivo. En general, se han obtenidos valores similares de ambos parámetros por los dos procedimientos de cálculo.

5.4.3.3 Formación de bioproductos

Para evaluar la velocidad específica de formación de etanol se ha partido, al igual que en series anteriores, de la ecuación [5.19]. Una representación de dicha ecuación linealizada [5.20] aparece, a título de ejemplo, en la Figura 5.44 (a), que corresponde al experimento realizado con $s_0=15$ y $g_0=10 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$. La línea continua de la Figura 5.44 (b) corresponde a la reproducción efectuada una vez determinados los parámetros A y B de la ecuación, mientras que los puntos representan los resultados obtenidos experimentalmente. Al igual que en este caso, en el resto de los cultivos de la serie se han obtenido ajustes aceptables en el intervalo considerado.

Los valores de la velocidad específica de producción de etanol aparecen, para todos los experimentos, en la Tabla 5.28.

El consumo secuencial de los dos sustratos empleados se pone de manifiesto también en los valores de q_E obtenidos; así, en los experimentos realizados con alta concentración de glucosa, se ha encontrado que la velocidad específica de formación de etanol es superior, si bien disminuye conforme aumenta dicha concentración, tendencia observada en toda la serie. En el experimento C-M2, realizado con concentraciones próximas de los dos sustratos, ha sido posible determinar valores de q_E correspondientes a los dos períodos en que se consumen preferentemente glucosa, en primer lugar, y xilosa, después. Nuevamente se observa que para el primer período se obtienen velocidades específicas muy superiores.

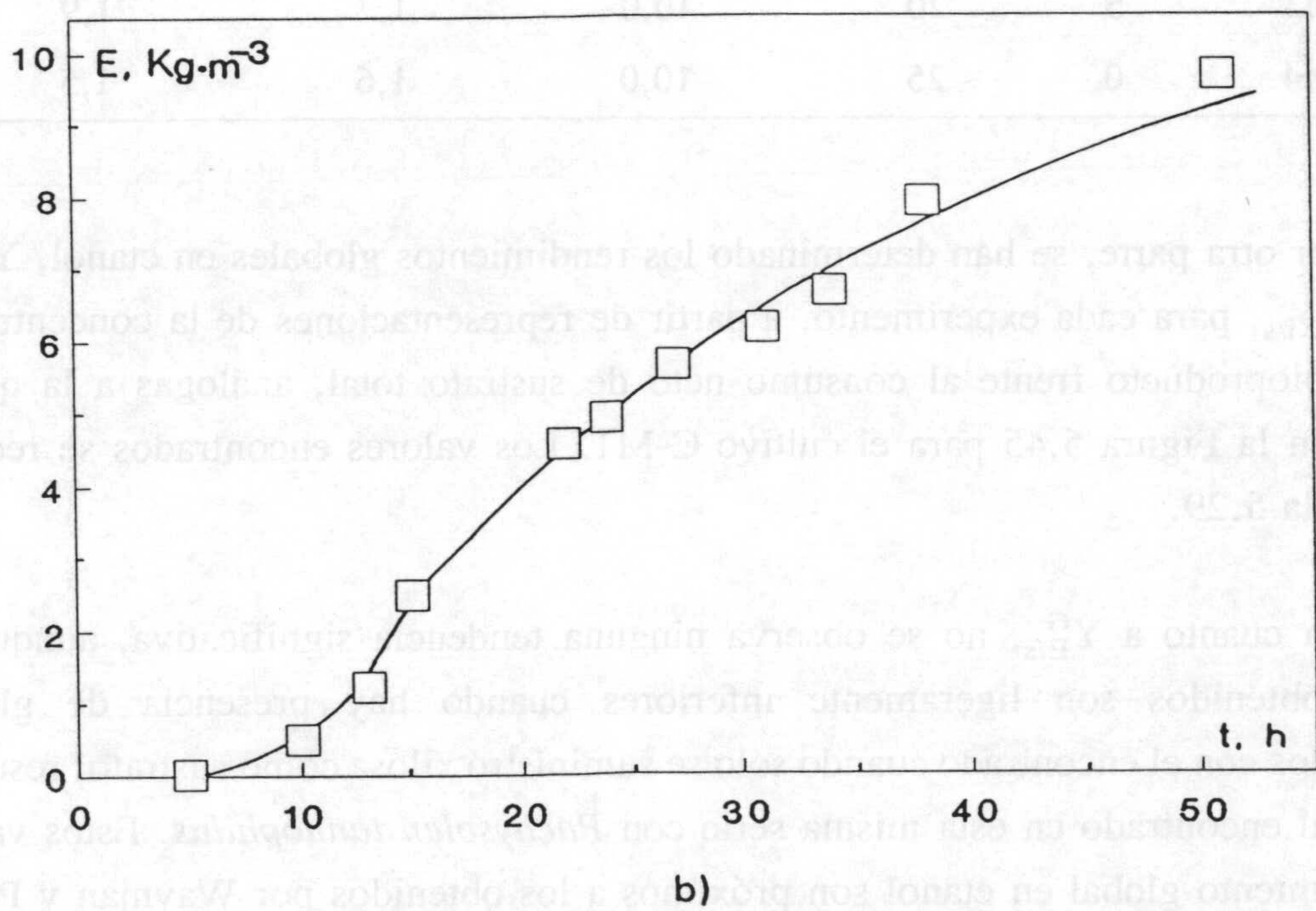
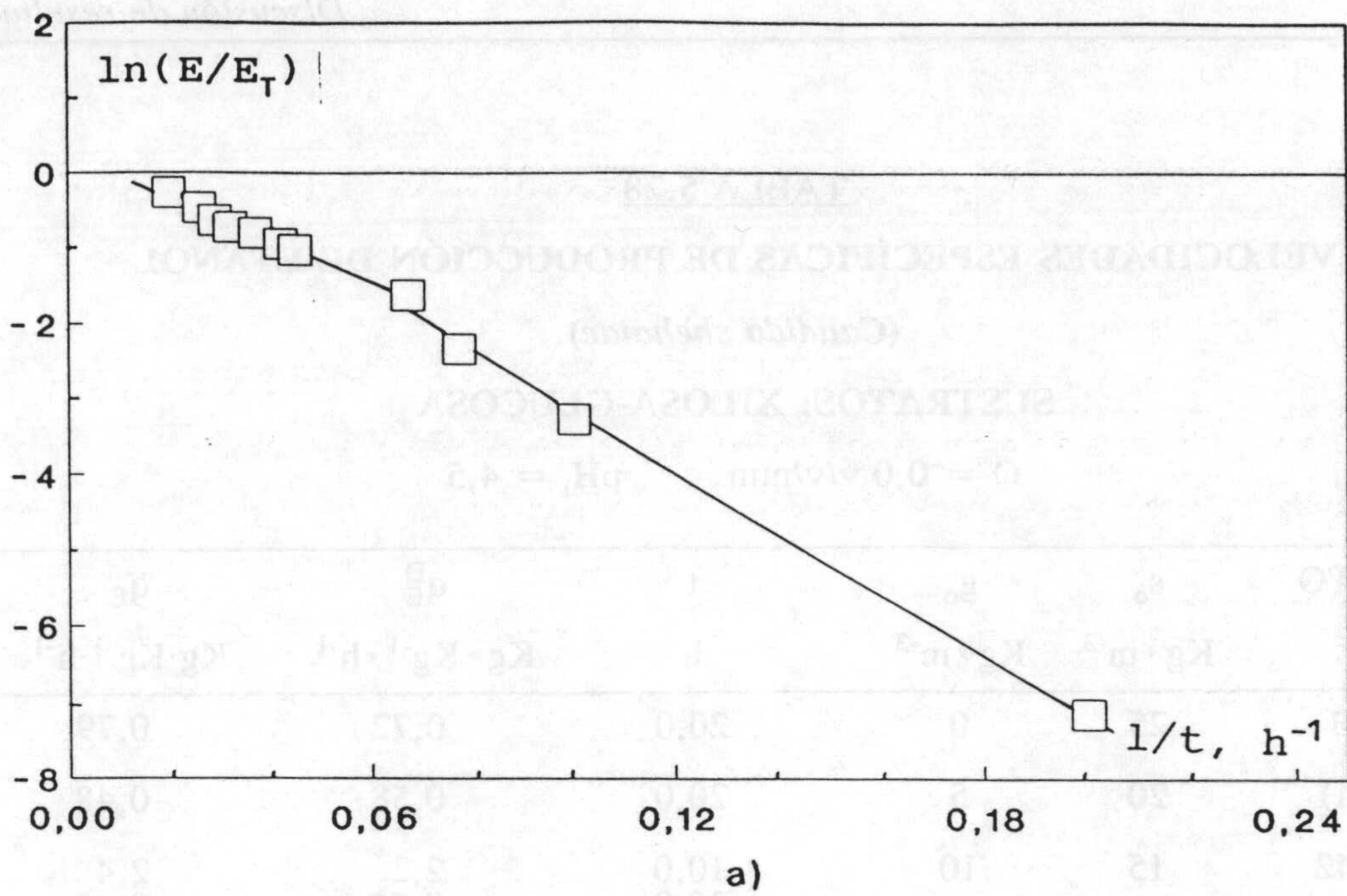


Fig. 5.44.- (a) Aplicación de la ecuación [5.23] al experimento C-M2 ($s_0 = 15$ y $g_0 = 10 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$)
 (b) Reproducción de los resultados experimentales para el cultivo Pi-M2

TABLA 5.28
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL
(*Candida shehatae*)
SUSTRATOS: XILOSA-GLUCOSA

$Q = 0,0 \text{ v/v/min}$ $\text{pH}_i = 4,5$

EXPTO	s_o $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$	g_o $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$	t h	q_E^D $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	q_E $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
C-B	25	0	20,0	0,72	0,79
C-M1	20	5	20,0	0,58	0,48
C-M2	15	10	10,0 20,0	2,2 0,55	2,4 0,43
C-M3	5	20	10,0	1,7	1,9
C-M4	0	25	10,0	1,6	1,5

Por otra parte, se han determinado los rendimientos globales en etanol, $Y_{E/s}^G$ y xilitol, $\bar{Y}_{Xi/s}$, para cada experimento, a partir de representaciones de la concentración de cada bioproducto frente al consumo neto de sustrato total, análogas a la que se muestra en la Figura 5.45 para el cultivo C-M1. Los valores encontrados se recogen en la Tabla 5.29.

En cuanto a $Y_{E/s}^G$, no se observa ninguna tendencia significativa, aunque los valores obtenidos son ligeramente inferiores cuando hay presencia de glucosa comparados con el encontrado cuando sólo se suministró xilosa como sustrato, resultado análogo al encontrado en esta misma serie con *Pachysolen tannophilus*. Estos valores del rendimiento global en etanol son próximos a los obtenidos por Wayman y Parekh (1985) que para mezclas de concentraciones iniciales comprendidas entre $s_o = 14,7$ y $g_o = 34,3 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ hasta $s_o = 54,9$ y $g_o = 128,1 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$, encuentran rendimientos en etanol en el intervalo $0,38-0,41 (\text{Kg etanol}) \cdot (\text{Kg sustrato})^{-1}$.

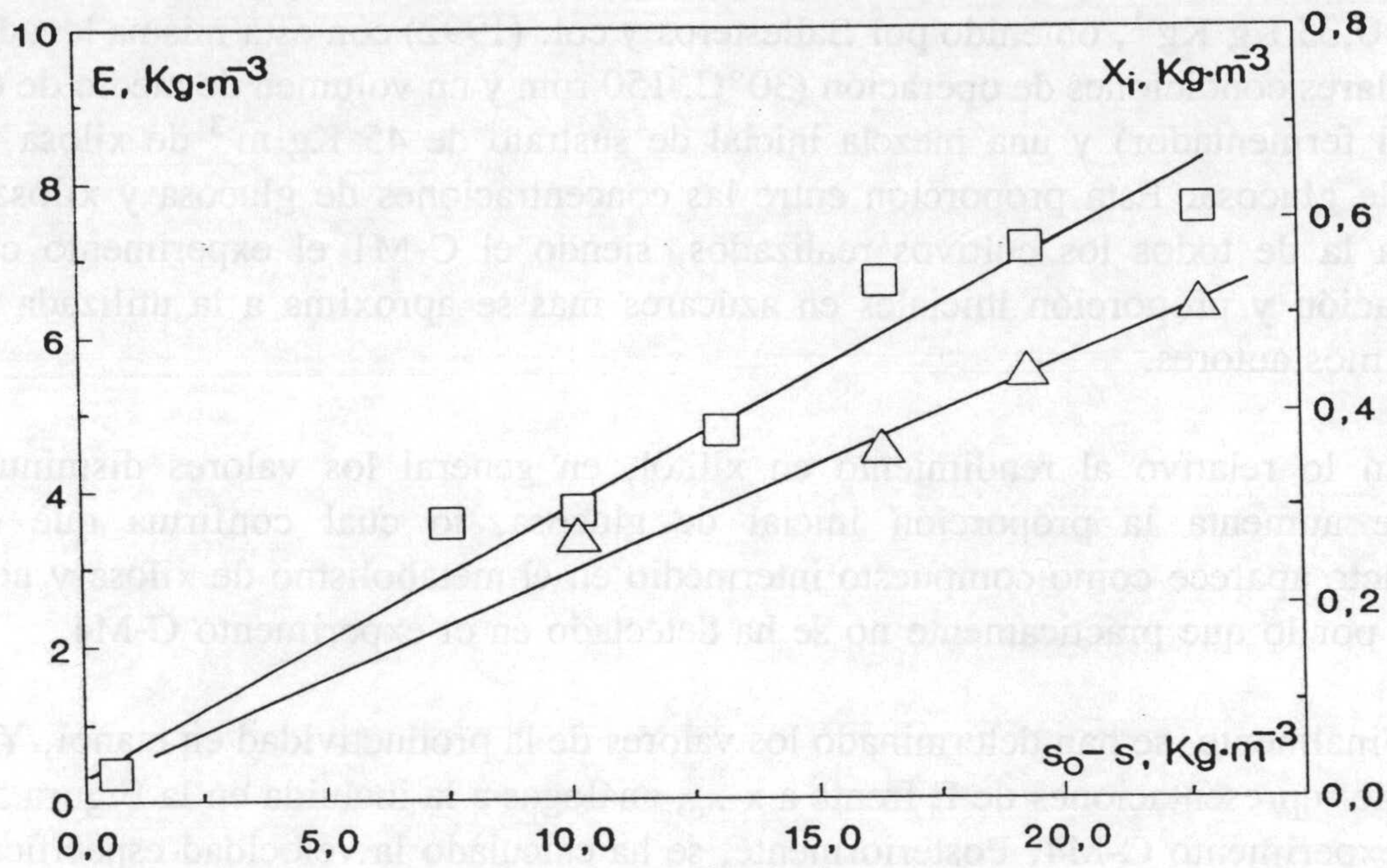


Fig. 5.45.- Rendimientos en etanol (□) y xilitol (Δ), experimento C-M1 ($s_0=20$ y $g_0=5$ Kg·m⁻³)

TABLA 5.29

RENDIMIENTOS EN ETANOL Y XILITOL

(*Candida shehatae*)

SUSTRATOS: XILOSA-GLUCOSA

Q = 0,0 v/v/min pH_i = 4,5

EXPTO.	s_0 Kg·m ⁻³ ·h ⁻¹	g_0 Kg·m ⁻³ ·h ⁻¹	$Y_{E/s}^G$ Kg·Kg ⁻¹	$\bar{Y}_{X_i/s}$ Kg·Kg ⁻¹
C-B	25	0	0,41	0,078
C-M1	20	5	0,35	0,022
C-M2	15	10	0,39	0,026
C-M3	5	20	0,37	0,011
C-M4	0	25	0,38	--

También los rendimientos indicados en la Tabla 5.29 son muy próximos al valor de $Y_{E/s} = 0,35 \text{ Kg} \cdot \text{Kg}^{-1}$, obtenido por Ballesteros y col. (1992) con esta misma levadura y en similares condiciones de operación (30°C , 150 rpm y un volumen de medio de 600 mL en el fermentador) y una mezcla inicial de sustrato de $45 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ de xilosa y $5 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ de glucosa. Esta proporción entre las concentraciones de glucosa y xilosa es distinta a la de todos los cultivos realizados, siendo el C-M1 el experimento cuya concentración y proporción iniciales en azúcares más se aproxima a la utilizada por estos últimos autores.

En lo relativo al rendimiento en xilitol, en general los valores disminuyen conforme aumenta la proporción inicial de glucosa, lo cual confirma que este bioproducto aparece como compuesto intermedio en el metabolismo de xilosa y no en glucosa, por lo que prácticamente no se ha detectado en el experimento C-M4.

Finalmente, se han determinado los valores de la productividad en etanol, $Y_{E/x}^G$, a partir de representaciones de E frente a $x-x_0$, análogas a la incluida en la Figura 5.46 para el experimento C-M4. Posteriormente, se ha calculado la velocidad específica de formación de etanol, q_E , por aplicación de la ecuación [5.18]. Estos valores también se recogen en la Tabla 5.28 junto con los de q_E^D (método diferencial) con el fin de realizar una mejor comparación. En general, se observa que los valores de la velocidad específica de formación de etanol determinados por ambos procedimientos son próximos.

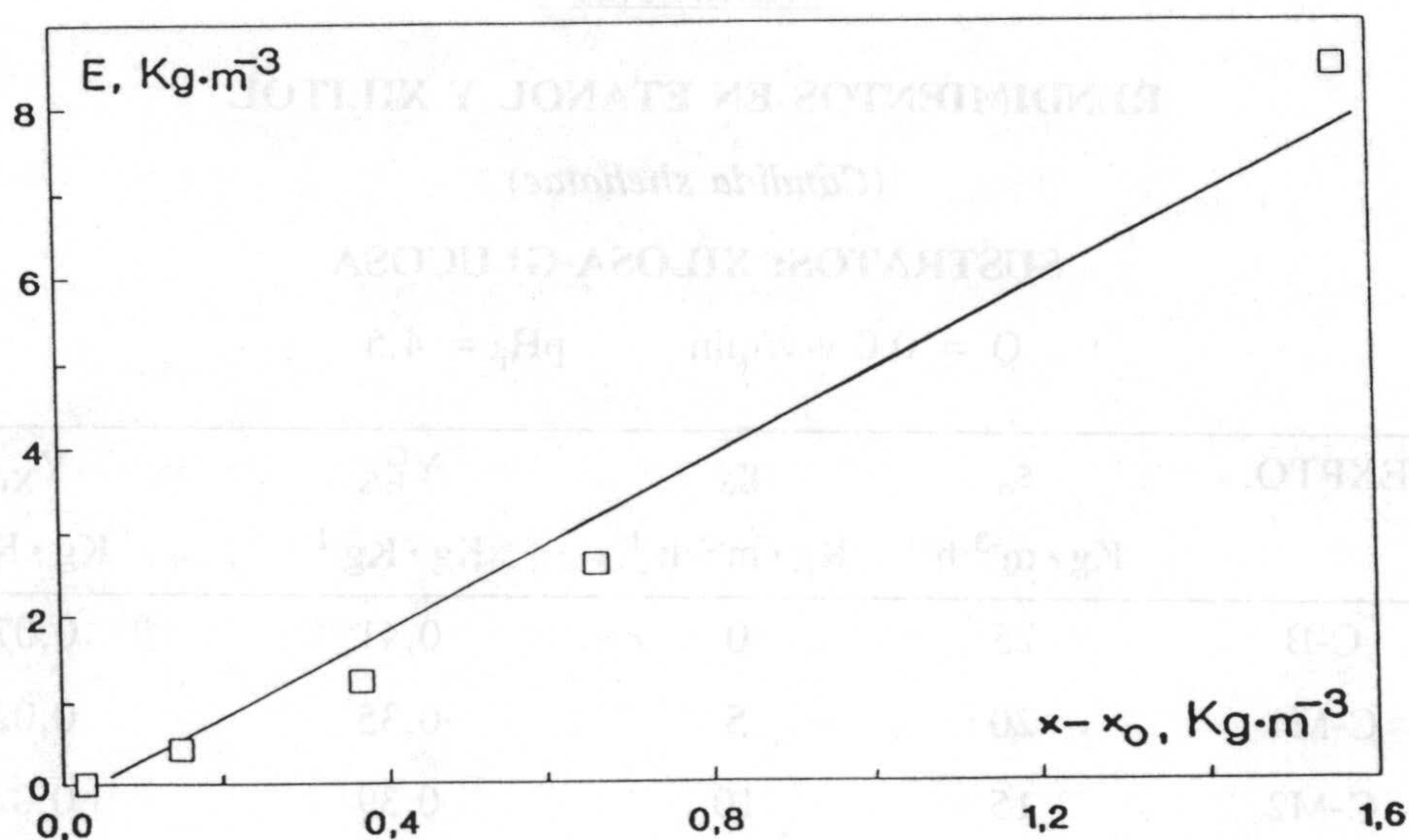


Fig. 5.46.- Etanol producido frente a biomasa neta formada, experimento C-M4 ($s_0 = 0$ y $g_0 = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$)

5.5 FERMENTACIÓN CON *Pichia stipitis*

Como característica general de esta levadura, puede decirse que, al igual que ocurría con *Candida shehatae*, se han obtenido altas concentraciones en etanol y bajas en xilitol.

Los resultados correspondientes a las tres series experimentales realizadas aparecen en las Tablas 4.39 a 4.42 (correspondientes a la serie Pi-A, en la que se estudia el nivel de aireación), 4.43 a 4.46, (serie de pH inicial, Pi-P) y 4.47 a 4.54 (serie Pi-M, en la que se estudia la influencia de la composición del medio de cultivo empleando como sustrato disoluciones de xilosa y glucosa en distinta proporción). Las Figuras 4.47 a 4.65 muestran la representación de biomasa formada, sustrato residual y bioproductos obtenidos y la evolución del pH a lo largo de los cultivos.

5.5.1 Influencia del nivel de aireación

5.5.1.1 Formación de biomasa

La representación de los valores del logaritmo neperiano de la concentración adimensional de biomasa, $\ln(x/x_0)$, obtenidos a partir de los correspondientes valores de biomasa formada, frente al tiempo, permite obtener las curvas de crecimiento para todos los cultivos. La Figura 5.47 muestra dichas curvas para dos experimentos de la serie: el Pi-B, realizado sin aporte externo de aire (sólo el incorporado a través del vórtice de agitación) y el cultivo con un caudal adicional de 0,300 v/v/min (experimento Pi-A3).

Como sucede en el resto de microorganismos estudiados, el crecimiento celular puede describirse mediante las siguientes fases sucesivas: lag o de adaptación, prácticamente despreciable en la mayor parte de los cultivos; exponencial, de duración reducida, en la que el microorganismo crece a gran velocidad, finaliza cuando la concentración residual de sustrato es todavía próxima a la inicial; lineal, en la cual

continúa el crecimiento pero a una velocidad inferior; y estacionaria, que se caracteriza por una producción neta de biomasa prácticamente nula.

En la Figura 5.47 se observa que la fase lag o de adaptación es de duración muy reducida; la fase de crecimiento exponencial se ha caracterizado mediante la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , y la fase lineal mediante la productividad en biomasa, b . Los valores de estos parámetros se recogen en la Tabla 5.30; ambos se han obtenido mediante ajustes por mínimos cuadrados de los valores experimentales a las ecuaciones [5.3] y [5.4], respectivamente.

TABLA 5.30

VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO

(Pichia stipitis)

INFLUENCIA DEL CAUDAL DE AIRE

$$s_0 = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$$

$$\text{pH}_i = 4,5$$

EXPTO.	Q v/v/min	μ_m h ⁻¹	b Kg · m ⁻³ · h ⁻¹
Pi-B	0,000	0,554	0,0743
Pi-A1	0,075	0,639	0,119
Pi-A2	0,150	0,675	0,155
Pi-A3	0,300	0,673	0,221

En cuanto a los valores de μ_m , aumentan con el caudal de aire aportado, aunque se alcanza un valor prácticamente constante para los dos cultivos de mayor aireación (Pi-A2 y Pi-A3). Conviene destacar que los valores obtenidos son sensiblemente superiores a los correspondientes, para esta serie, a las tres restantes levaduras estudiadas.

Asimismo, los valores obtenidos de k_m son superiores a los obtenidos por

DeWitt y col. (1989) con $Pi-B$ (0,3 v/v/min) y $Pi-A3$ (0,3 v/v/min) en condiciones

análogas. Estos valores pueden deberse a que el sistema de flujo utilizado en este

trabajo es un reactor de flujo continuo, lo que permite un mayor tiempo de residencia

de las partículas y, por lo tanto, un mayor tiempo de reacción. En todos los casos

se obtuvieron valores de k_m superiores a los obtenidos por DeWitt y col. (1989) con

condiciones análogas. Esto puede deberse a que el sistema de flujo utilizado en este

trabajo es un reactor de flujo continuo, lo que permite un mayor tiempo de residencia

de las partículas y, por lo tanto, un mayor tiempo de reacción. En todos los casos

se obtuvieron valores de k_m superiores a los obtenidos por DeWitt y col. (1989) con

condiciones análogas. Esto puede deberse a que el sistema de flujo utilizado en este

trabajo es un reactor de flujo continuo, lo que permite un mayor tiempo de residencia

de las partículas y, por lo tanto, un mayor tiempo de reacción. En todos los casos

se obtuvieron valores de k_m superiores a los obtenidos por DeWitt y col. (1989) con

condiciones análogas. Esto puede deberse a que el sistema de flujo utilizado en este

trabajo es un reactor de flujo continuo, lo que permite un mayor tiempo de residencia

de las partículas y, por lo tanto, un mayor tiempo de reacción. En todos los casos

se obtuvieron valores de k_m superiores a los obtenidos por DeWitt y col. (1989) con

condiciones análogas. Esto puede deberse a que el sistema de flujo utilizado en este

trabajo es un reactor de flujo continuo, lo que permite un mayor tiempo de residencia

de las partículas y, por lo tanto, un mayor tiempo de reacción. En todos los casos

se obtuvieron valores de k_m superiores a los obtenidos por DeWitt y col. (1989) con

condiciones análogas. Esto puede deberse a que el sistema de flujo utilizado en este

trabajo es un reactor de flujo continuo, lo que permite un mayor tiempo de residencia

de las partículas y, por lo tanto, un mayor tiempo de reacción. En todos los casos

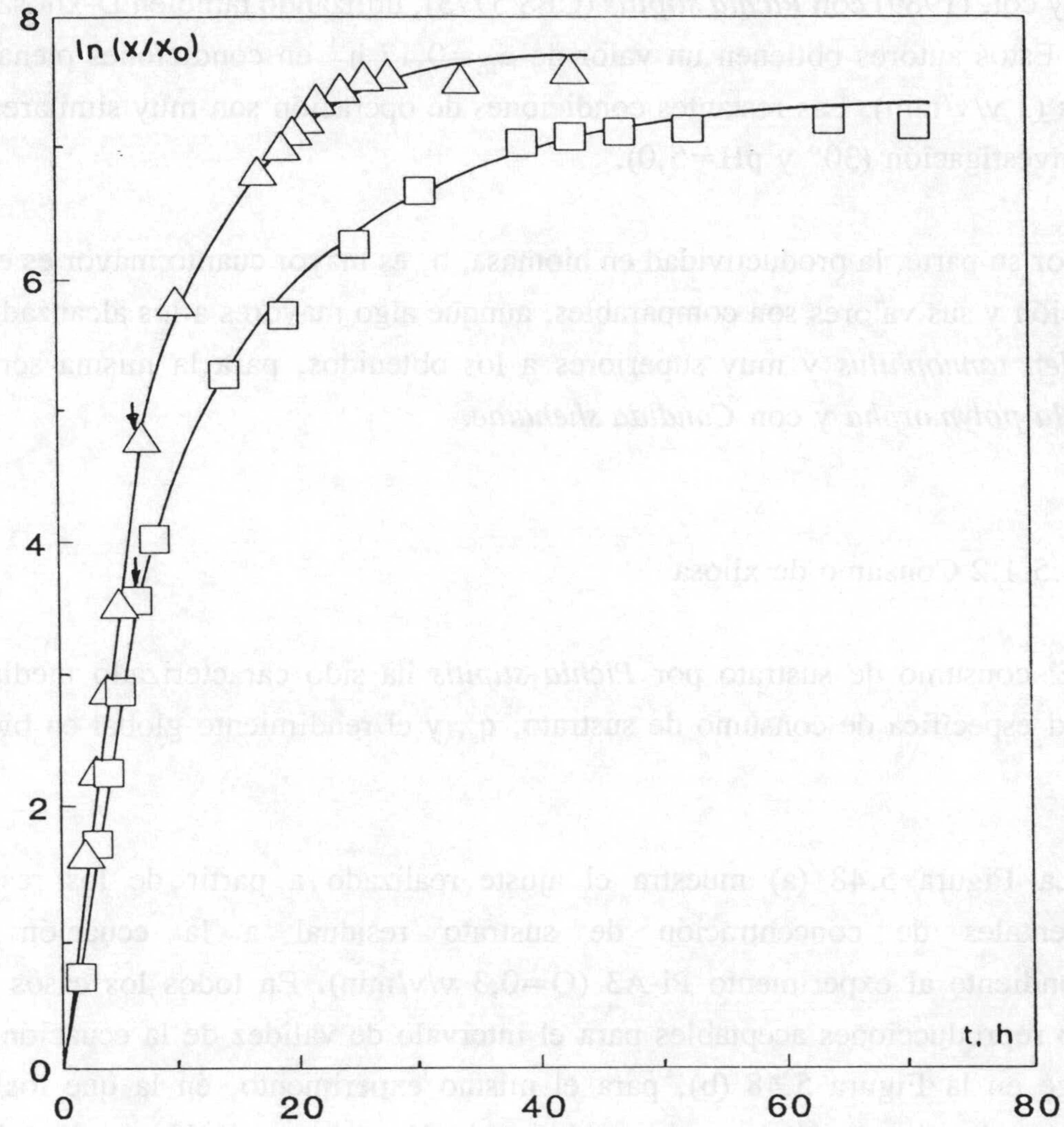


Fig. 5.47.- Curvas de crecimiento de los experimentos:
(\square) Pi-B ($Q=0,0$ v/v/min) y (Δ) Pi-A3 ($Q=0,3$ v/v/min)

Asímismo, los valores alcanzados de μ_m son superiores a los obtenidos por Dellweg y col. (1989) con *Pichia stipitis* (CBS 5773), utilizando también D-xilosa como sustrato. Estos autores obtienen un valor de $\mu_m=0,17 \text{ h}^{-1}$ en condiciones plenamente aeróbicas (1 v/v/min). Las restantes condiciones de operación son muy similares a las de esta investigación (30° y pH=5,0).

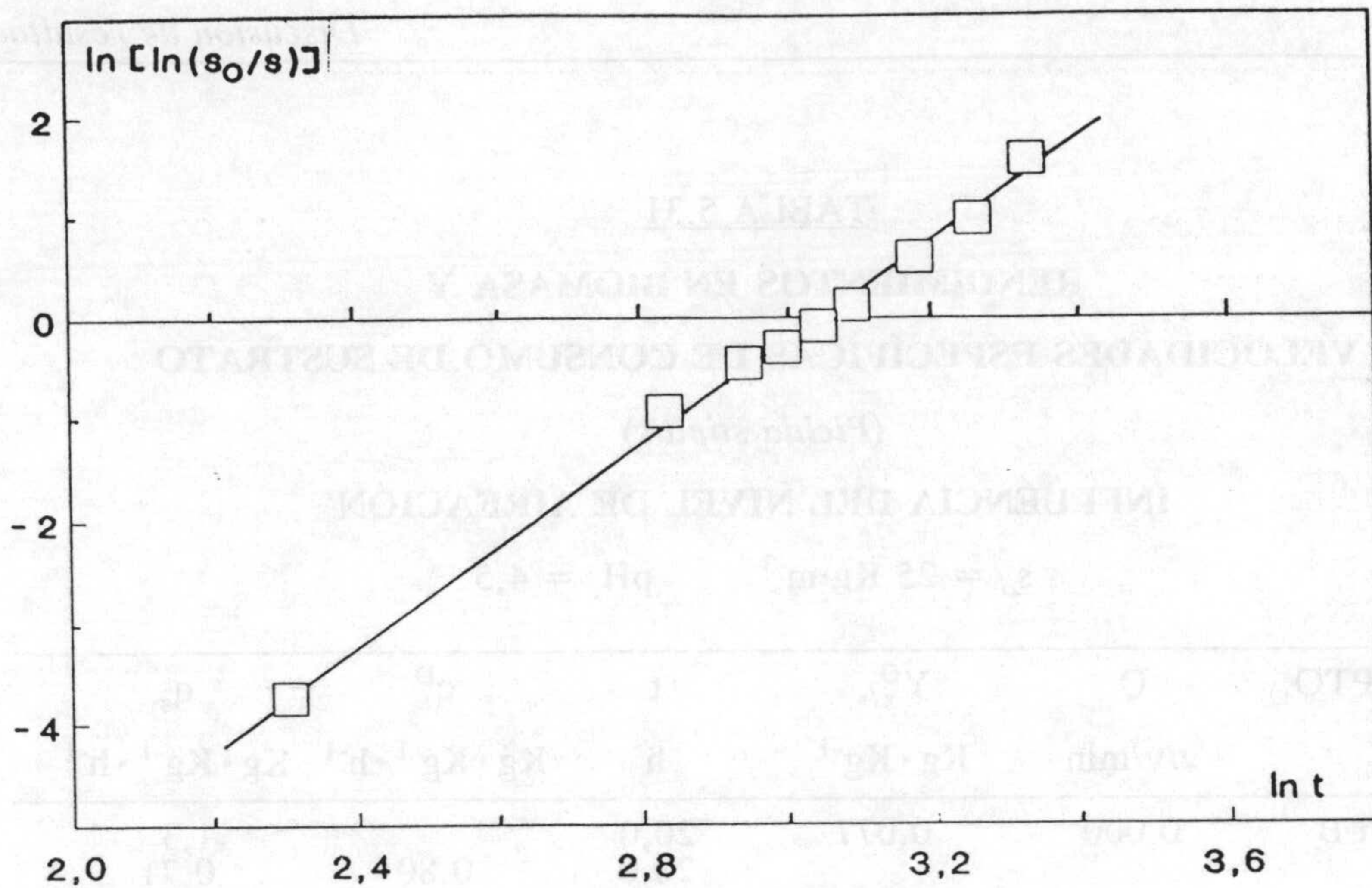
Por su parte, la productividad en biomasa, b , es mayor cuanto mayor es el nivel de aireación y sus valores son comparables, aunque algo mayores a los alcanzados con *Pachysolen tannophilus* y muy superiores a los obtenidos, para la misma serie con *Hansenula polymorpha* y con *Candida shehatae*.

5.5.1.2 Consumo de xilosa

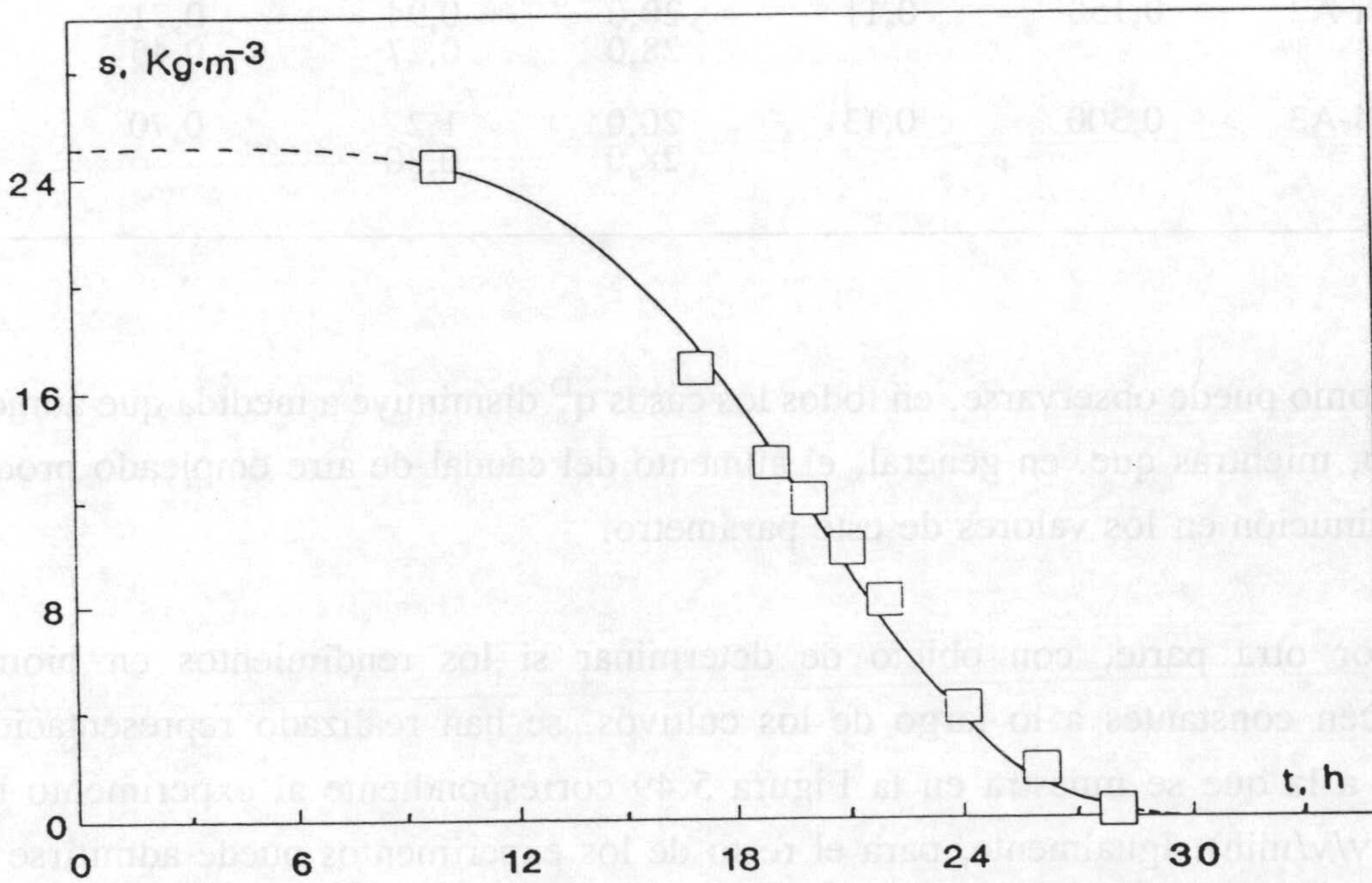
El consumo de sustrato por *Pichia stipitis* ha sido caracterizado mediante la velocidad específica de consumo de sustrato, q_s , y el rendimiento global en biomasa, $Y_{x/s}^G$.

La Figura 5.48 (a) muestra el ajuste realizado a partir de los resultados experimentales de concentración de sustrato residual a la ecuación [5.12] correspondiente al experimento Pi-A3 ($Q=0,3 \text{ v/v/min}$). En todos los casos se han obtenido reproducciones aceptables para el intervalo de validez de la ecuación, como se recoge en la Figura 5.48 (b), para el mismo experimento, en la que los puntos representan los resultados experimentales y la línea la evolución temporal de la concentración de sustrato, una vez determinados los parámetros θ y β que intervienen en la ecuación [5.11].

A partir de estos parámetros se han determinado las velocidades específicas de consumo de sustrato que aparecen en la Tabla 5.31 para tiempos medios y finales de los cultivos.



a)



b)

Fig. 5.48.- a) Ajuste de los resultados experimentales de consumo de xilosa para el experimento Pi-A3 ($Q=0,3$ v/v/min).

b) Reproducción de la ecuación [5.12] para el experimento Pi-A3

TABLA 5.31
RENDIMIENTOS EN BIOMASA Y
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO
(Pichia stipitis)
INFLUENCIA DEL NIVEL DE AIREACIÓN
 $s_o = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ $\text{pH}_i = 4,5$

EXPTO.	Q	$Y_{x/s}^G$	t	q_s^D	q_s
	v/v/min	$\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1}$	h	$\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
Pi-B	0,000	0,077	20,0	0,80	1,3
			28,0		0,71
Pi-A1	0,075	0,084	20,0	1,0	0,93
			28,0	0,53	0,58
Pi-A2	0,150	0,11	20,0	0,94	0,71
			28,0	0,27	0,45
Pi-A3	0,300	0,13	20,0	1,2	0,70
			28,0	0,30	

Como puede observarse, en todos los casos q_s^D disminuye a medida que aumenta el tiempo, mientras que, en general, el aumento del caudal de aire empleado produce una disminución en los valores de este parámetro.

Por otra parte, con objeto de determinar si los rendimientos en biomasa permanecen constantes a lo largo de los cultivos, se han realizado representaciones análogas a la que se muestra en la Figura 5.49 correspondiente al experimento base ($Q=0,0$ v/v/min). Igualmente, para el resto de los experimentos puede admitirse que dicho parámetro es constante; los valores, determinados por ajuste de mínimos cuadrados, se recogen en la Tabla 5.31.

El rendimiento global en biomasa aumenta a medida que lo hace el nivel de aireación suministrado. La tendencia observada puede justificar el resultado de Dellweg y col. (1989) en *Pichia stipitis*; con esta levadura obtienen un rendimiento elevado en biomasa, $Y_{x/s} = 0,52 \text{ (g biomasa)} \cdot \text{(g xilosa)}^{-1}$, cuando el caudal de aire es de 1 v/v/min y la concentración de sustrato de $60 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$.

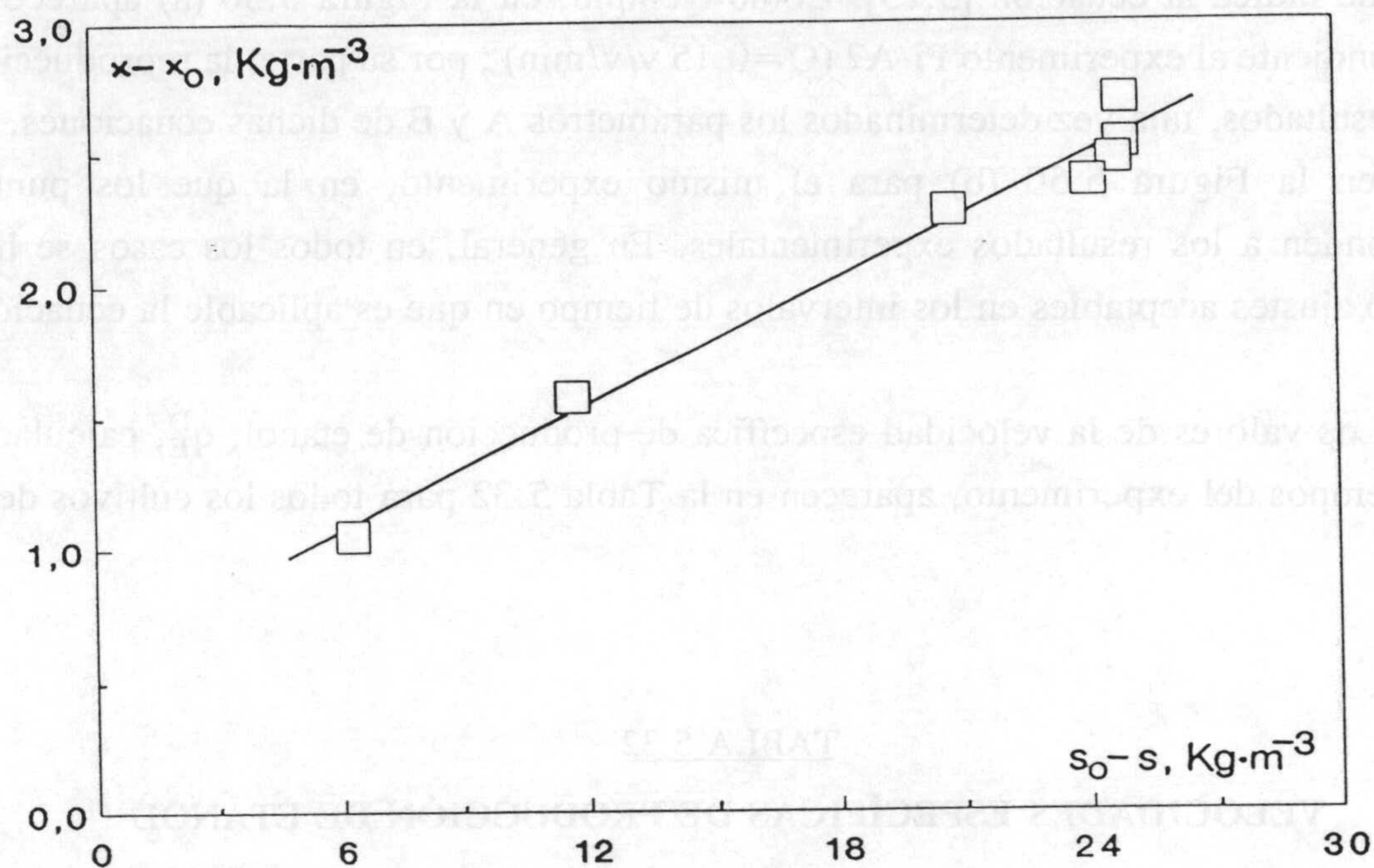


Fig. 5.49.- Rendimiento medio en biomasa, experimento Pi-B ($Q=0,0 \text{ v/v/min}$)

A partir de los valores del rendimiento global en biomasa se pueden determinar nuevamente los de la velocidad específica de consumo de sustrato, q_s , cuyos valores se incluyen, para los mismos tiempos en que se evaluó q_s^D en la Tabla 5.31, apreciándose que se alcanzan resultados similares por los dos procedimientos propuestos.

5.5.1.3 Formación de bioproductos

Pichia stipitis se ha caracterizado por producir elevadas concentraciones en etanol y pequeñas en xilitol; los valores máximos alcanzados en ambos bioproductos han sido $9,888$ y $0,16 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$, respectivamente.

La velocidad específica de producción de etanol se ha evaluado, al igual que en las restantes levaduras, mediante el ajuste de los resultados experimentales a una ecuación empírica; de las distintas ensayadas, la que mejor reproduce la evolución de la concentración de etanol con el tiempo es la [5.24], que se puede linealizar en la

forma que indica la ecuación [5.25]. Como ejemplo, en la Figura 5.50 (a) aparece la correspondiente al experimento Pi-A2 ($Q=0,15$ v/v/min) ; por su parte, la reproducción de los resultados, una vez determinados los parámetros A y B de dichas ecuaciones, se recoge en la Figura 5.50 (b) para el mismo experimento, en la que los puntos corresponden a los resultados experimentales. En general, en todos los casos se han obtenido ajustes aceptables en los intervalos de tiempo en que es aplicable la ecuación.

Los valores de la velocidad específica de producción de etanol, q_E^D , calculados a dos tiempos del experimento, aparecen en la Tabla 5.32 para todos los cultivos de la serie.

TABLA 5.32
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL
(*Pichia stipitis*)

INFLUENCIA DEL NIVEL DE AIREACIÓN

$s_o = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ $\text{pH}_i = 4,5$

EXPTO.	Q v/v/min	t h	q_E^D $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	q_E $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
Pi-B	0,000	19,0	0,37	0,47
		28,0	0,18	0,21
Pi-A1	0,075	19,0	0,34	0,37
		28,0	0,21	0,20
Pi-A2	0,150	19,0	0,30	0,28
		28,0	0,18	0,16
Pi-A3	0,300	19,0	0,28	0,27
		28,0	0,18	0,16

Para todos los casos se ha obtenido que q_E^D aumenta hasta alcanzar su valor máximo alrededor de las 20 h de cultivo, disminuyendo a continuación a medida que transcurre el experimento. Esto indica que, una vez obtenido el valor máximo, la concentración de etanol en el medio de cultivo produce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y, por lo tanto, sobre la transformación del sustrato en etanol.

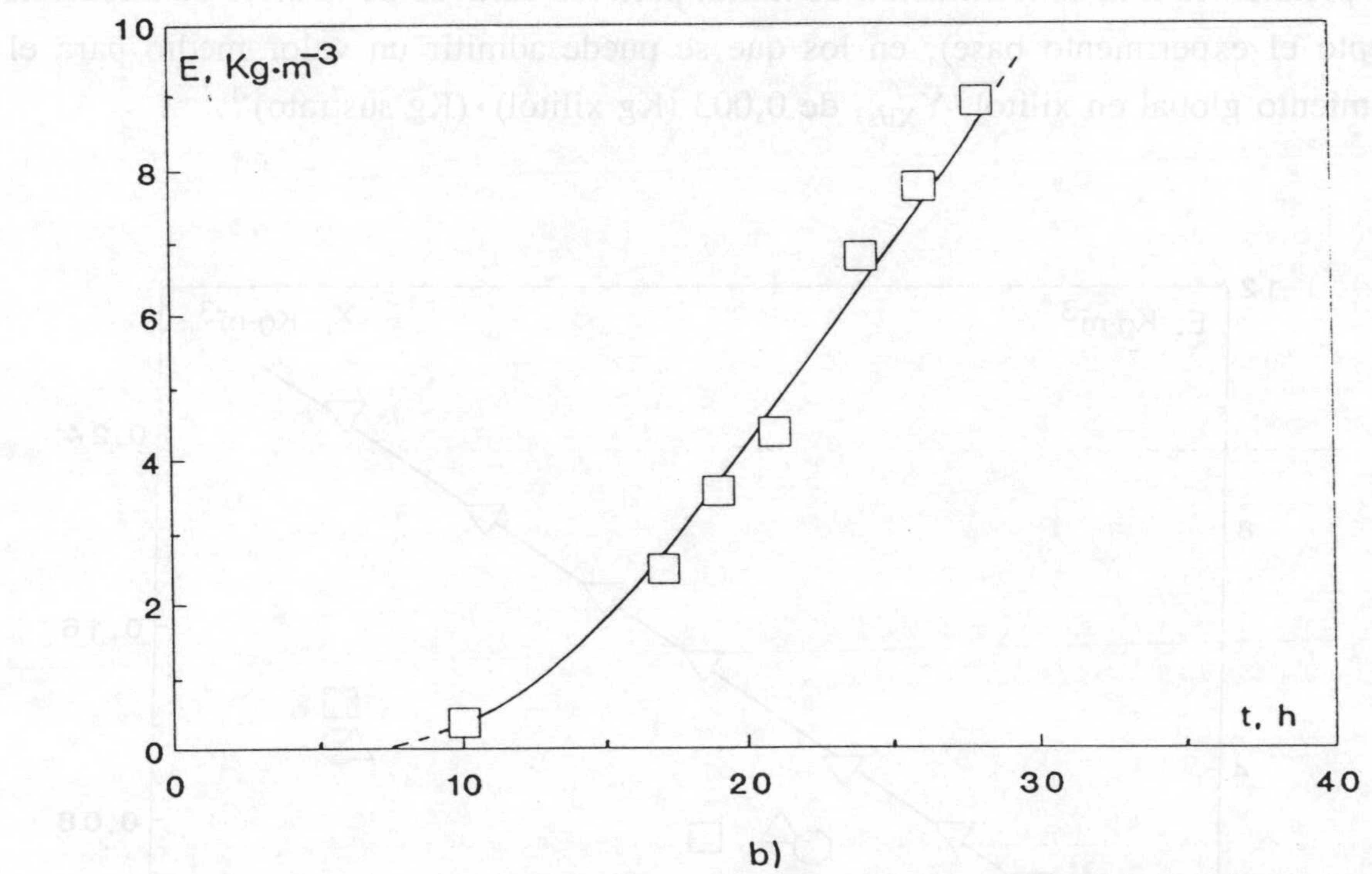
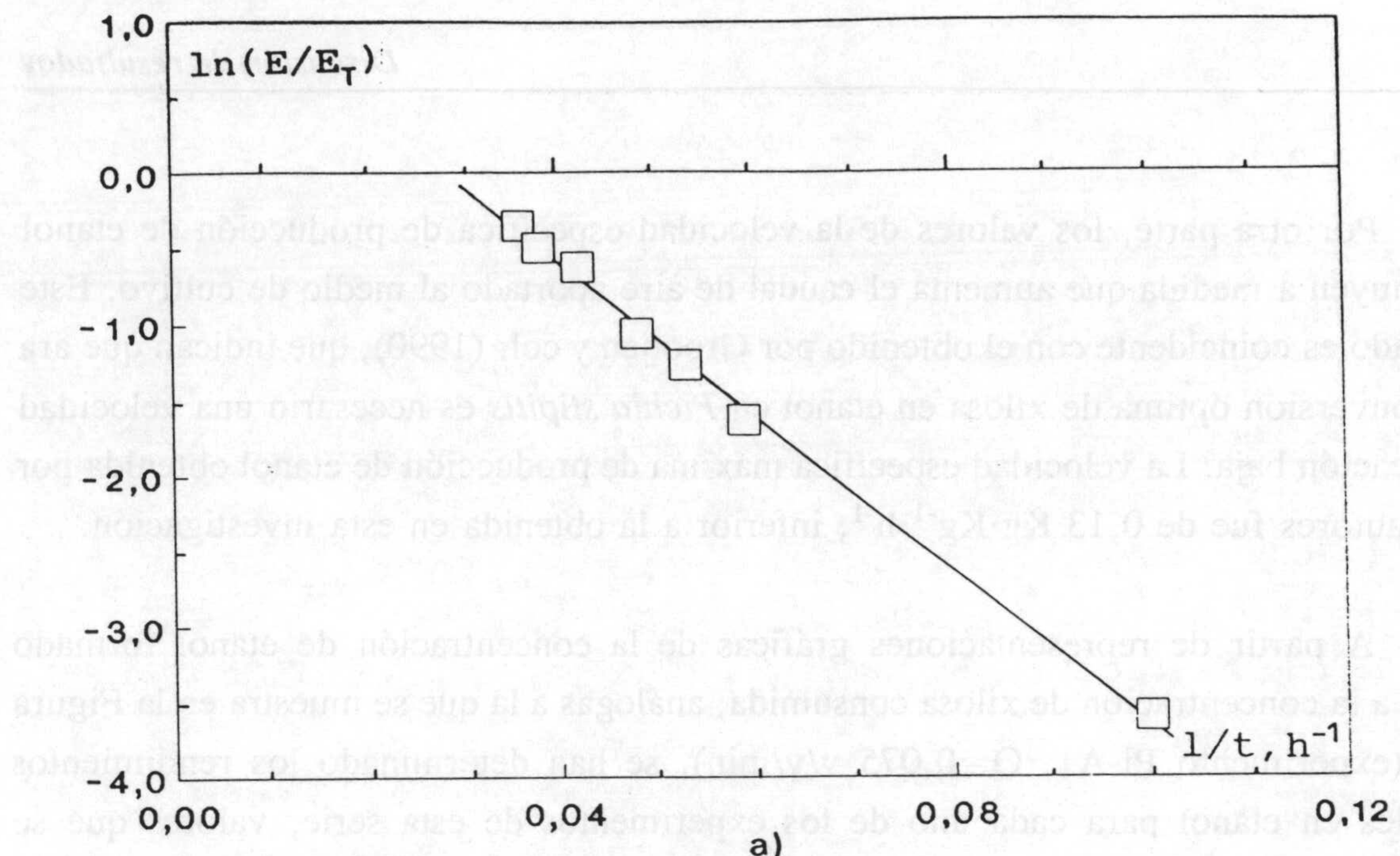


Fig. 5.50.- a) Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol a la ecuación [5.25], experimento Pi-A2 ($Q=0,150$ v/v/min)
 b) Reproducción de la ecuación [5.24], experimento Pi-A2

Por otra parte, los valores de la velocidad específica de producción de etanol disminuyen a medida que aumenta el caudal de aire aportado al medio de cultivo. Este resultado es coincidente con el obtenido por Grootjen y col. (1990), que indican que para una conversión óptima de xilosa en etanol en *Pichia stipitis* es necesario una velocidad de aireación baja. La velocidad específica máxima de producción de etanol obtenida por estos autores fue de $0,13 \text{ Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, inferior a la obtenida en esta investigación.

A partir de representaciones gráficas de la concentración de etanol formado frente a la concentración de xilosa consumida, análogas a la que se muestra en la Figura 5.51 (experimento Pi-A1, $Q=0,075 \text{ v/v/min}$), se han determinado los rendimientos globales en etanol para cada uno de los experimentos de esta serie, valores que se recogen en la Tabla 5.33. En esta Figura se recogen además los resultados correspondientes a la concentración de xilitol para los cultivos de la serie de aireación (excepto el experimento base), en los que se puede admitir un valor medio para el rendimiento global en xilitol, $\bar{Y}_{X_i/s}$, de $0,003 \text{ (Kg xilitol)} \cdot \text{(Kg sustrato)}^{-1}$.

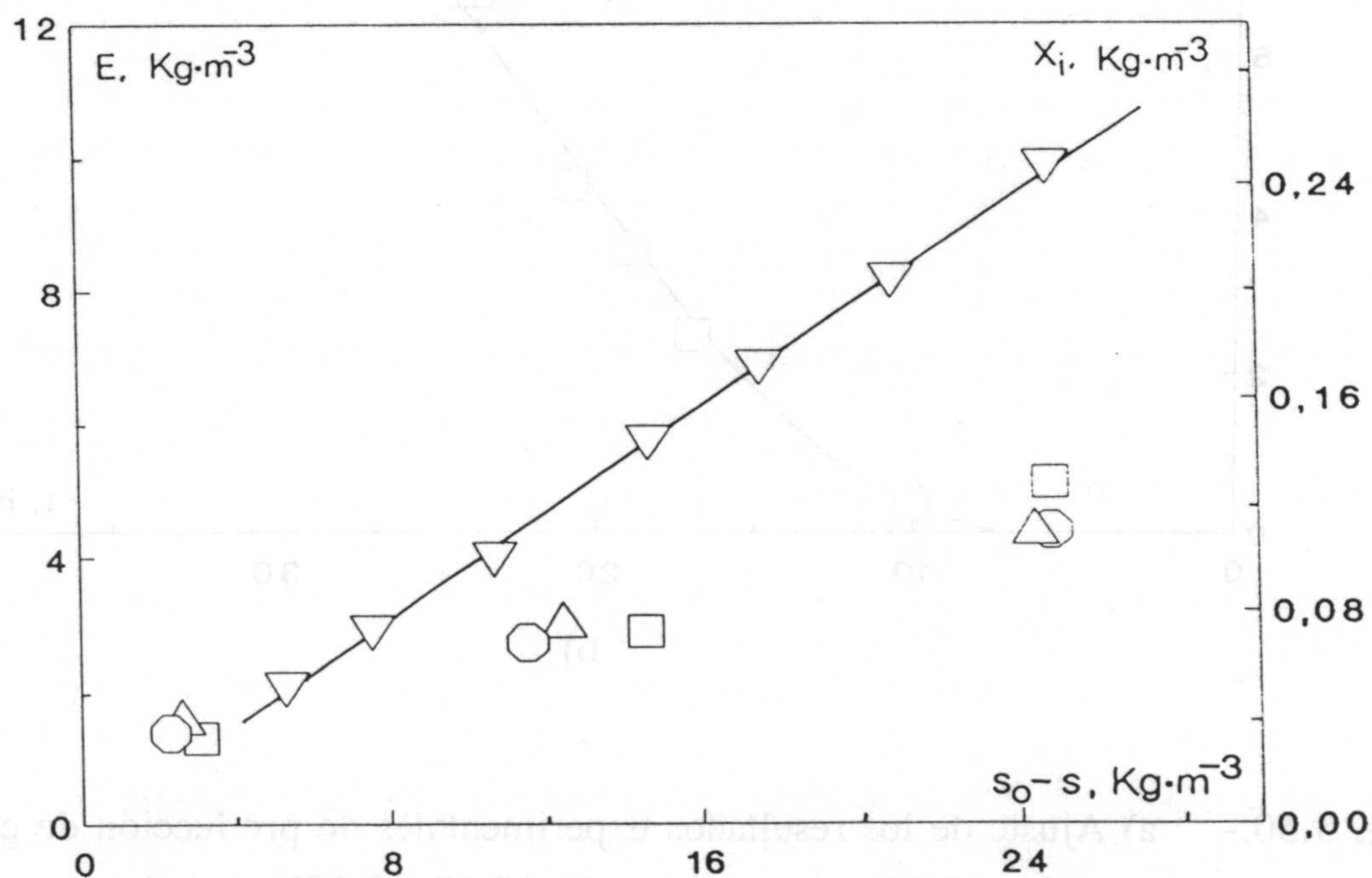


Fig. 5.51.- Rendimiento en etanol (∇), experimento Pi-A1 ($Q=0,075 \text{ v/v/min}$) y en xilitol, serie de Aireación (excepto Base)

TABLA 5.33
RENDIMIENTOS EN ETANOL Y XILITOL
(Pichia stipitis)
INFLUENCIA DEL NIVEL DE AIREACIÓN

$s_o = 25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $\text{pH}_i = 4,5$

EXPTO.	Q	$Y_{E/s}^G$	$\bar{Y}_{Xi/s}$
	v/v/min	$\text{Kg}\cdot\text{Kg}^{-1}$	$\text{Kg}\cdot\text{Kg}^{-1}$
Pi-B	0,000	0,37	0,006
Pi-A1	0,075	0,40	0,004
Pi-A2	0,150	0,37	0,003
Pi-A3	0,300	0,37	0,003

En cuanto al rendimiento global en etanol, no se observan variaciones significativas cuando se modifica el caudal de aire, si bien es necesario indicar que el máximo valor encontrado corresponde, como se observa, al experimento realizado con un caudal de 0,075 v/v/min, lo cual parece indicar que las mejores condiciones de cultivo para *Pichia stipitis* con vistas a la formación de etanol incluyen un pequeño aporte de aire al medio de cultivo. Este resultado es algo inferior al alcanzado por Ligthelm y col. (1988) ($Y_{E/s} = 0,47 \text{ Kg etanol}\cdot\text{Kg xilosa}^{-1}$) en condiciones de limitación de oxígeno, pero superior al obtenido por estos mismos autores en condiciones aerobias ($Y_{E/s} = 0,18 \text{ Kg etanol}\cdot\text{Kg xilosa}^{-1}$). Sin embargo, el rendimiento en xilitol ($Y_{Xi/s} = 0,06 \text{ Kg xilitol}\cdot\text{Kg xilosa}^{-1}$) es superior al obtenido en esta investigación.

Por otra parte, los rendimientos en xilitol no se ven influenciados significativamente por el nivel de aireación, excepto para el caso de $Q=0,0 \text{ v/v/min}$ en que se alcanza un valor doble de $\bar{Y}_{Xi/s}$ que para el resto de los cultivos. Estos rendimientos en xilitol son sensiblemente inferiores a los obtenidos por Ligthelm y col. (1988) en condiciones de limitación de oxígeno ($Y_{Xi/s} = 0,06 \text{ Kg xilitol}\cdot\text{Kg xilosa}^{-1}$). Desde el punto de vista de formación de etanol, una disminución en la producción de xilitol puede ser una ventaja ya que conllevaría un aumento en el valor de $Y_{E/s}$.

Por último, se han determinado los valores de la productividad en etanol, $Y_{E/x}^G$, a partir de representaciones de E frente a $x-x_0$, análogas a la incluida en la Figura 5.52 para el experimento realizado con un caudal de aire adicional de 0,3 v/v/min, a partir de las cuales se ha calculado la velocidad específica de formación de etanol, q_E , por aplicación de la ecuación [5.18]. Estos valores también se recogen en la Tabla 5.32 junto con los de q_E^D (método diferencial) y a iguales tiempos con el fin de realizar una mejor comparación. En general, se observa que los valores de la velocidad específica de formación de etanol determinados por ambos procedimientos son próximos.

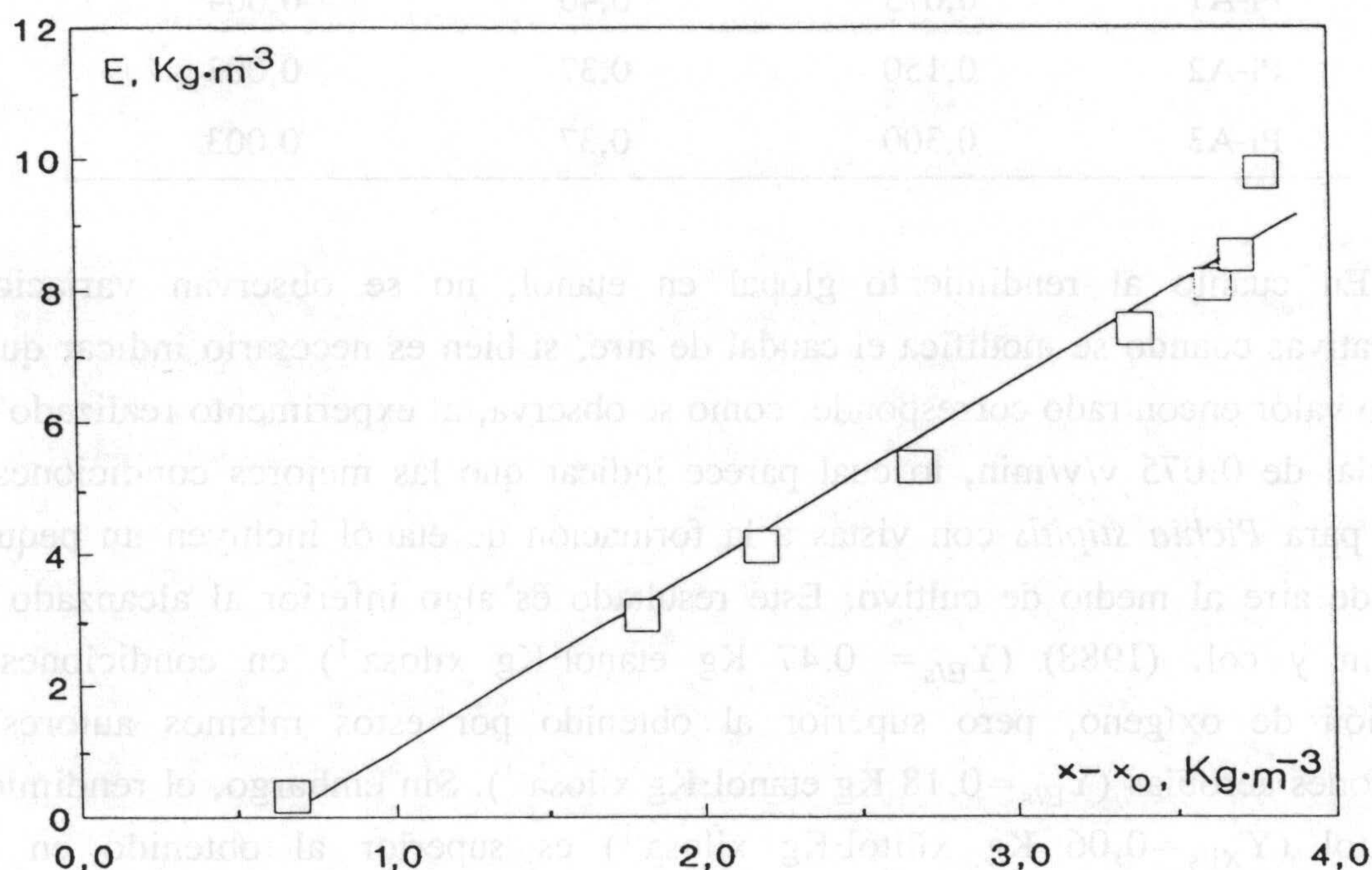


Fig. 5.52.- Etanol producido frente a biomasa neta formada, experimento Pi-A3 ($Q=0,3$ v/v/min)

5.5.2 Influencia del pH inicial

5.5.2.1 Formación de biomasa

En la Figura 5.53 aparecen las curvas de crecimiento de los experimentos Pi-P1 y Pi-P4, correspondientes a cultivos con pH inicial 2,5 y 6,5, respectivamente. Nuevamente, las curvas se han obtenido a partir de los valores experimentales de biomasa formada y tiempo.

Como se aprecia en la Figura 5.53 y en las Figuras 4.29 a 4.33, el crecimiento para esta serie experimental puede también caracterizarse mediante las fases lag, exponencial, lineal y estacionaria.

La fase lag o de adaptación es también despreciable en este caso, igual que ocurría en la serie de aireación; a continuación, el microorganismo crece de forma exponencial con el tiempo, mientras que el consumo de sustrato es aún muy reducido; posteriormente, la velocidad de crecimiento disminuye, de forma que puede admitirse que es lineal frente al tiempo transcurrido y, finalmente, el consumo prácticamente total del sustrato coincide con el comienzo de la fase estacionaria, en la que no existe crecimiento neto de la población microbiana.

Para el período de crecimiento exponencial (indicado mediante flechas en la figura), se ha obtenido, como se describe para el resto de levaduras, la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , para cada cultivo. Los valores se recogen en la Tabla 5.34. Puede observarse un aumento de este parámetro con el pH inicial, si bien, para el cultivo Pi-P4 ($\text{pH}_i=6,5$), se obtiene una reducción significativa de μ_m . Este se ha observado también en las restantes levaduras para esta misma serie experimental.

En relación a la fase lineal de crecimiento, caracterizada, como en ocasiones anteriores, mediante la productividad en biomasa, b , la misma Tabla recoge los valores encontrados para todos los cultivos. En comparación con el resto de levaduras, para *Pichia stipitis* se obtienen productividades en biomasa cinco o seis veces superiores a las obtenidas, para el mismo pH inicial, con *Hansenula polymorpha* y, en general, mayores a las de los demás microorganismos objeto de estudio. Por otra parte, no se observa una influencia definida del pH inicial del medio de cultivo sobre la productividad en biomasa, excepto para el cultivo con $\text{pH}_i=2,5$ en el que se obtiene el menor valor.

5.2.2 Influencia del pH inicial

En la figura 5.53 aparecen las curvas de crecimiento de los experimentos Pi-P1 y Pi-P4, correspondientes a cultivos con pH inicial 2,5 y 6,5, respectivamente. Asimismo, las curvas se han obtenido a partir de los valores experimentales de biomasa formada y tiempo.

Como se aprecia en la figura 5.53 y en la Tabla 5.23 a 4.3, el crecimiento para este experimento puede describirse mediante las fases lag, exponencial, lineal y estacionaria.

La fase lag o de adaptación es también despreciable en este caso, lo que ocurre en la serie de sucesión a continuación, el microorganismo entra en fase exponencial con el tiempo, mientras que el consumo de sustrato es muy limitado; posteriormente, la velocidad de crecimiento disminuye, de forma que disminuye que es igual al tiempo transcurrido y, finalmente, el consumo de sustrato total es igual al tiempo transcurrido y, finalmente, el consumo de sustrato existente en el sustrato coincide con el consumo de la fase estacionaria, en la que no existe crecimiento neto de la población microbiana.

Para el período de crecimiento exponencial, indicado mediante la línea recta en la figura, se ha obtenido como se describe para el caso de levaduras, la velocidad específica de crecimiento μ_{max} para estos cultivos. Los valores obtenidos en la Tabla 5.24, donde se observan un aumento de este parámetro con el pH inicial, si bien para el cultivo Pi-P4 (pH_i=6,5), se obtiene una reducción significativa de μ_{max} . Esto se ha observado también en los tests con levaduras para esta misma serie experimental.

En relación a la fase lineal de crecimiento, caracterizada, como en ocasiones anteriores, mediante la productividad en biomasa, la misma Tabla recoge los valores obtenidos para todos los cultivos. En esta Tabla se observa que la productividad a partir de la fase lag se obtiene por la misma biomasa polimérica y, en general, las obtenidas para el mismo pH inicial, con bastante polimérica y, en general, mayores a las de los demás microorganismos objeto de estudio. Por otra parte, no se observa una influencia definida del pH inicial del medio de cultivo sobre la productividad en biomasa, excepto para el cultivo con pH_i=2,5 en el que se obtiene el menor valor.

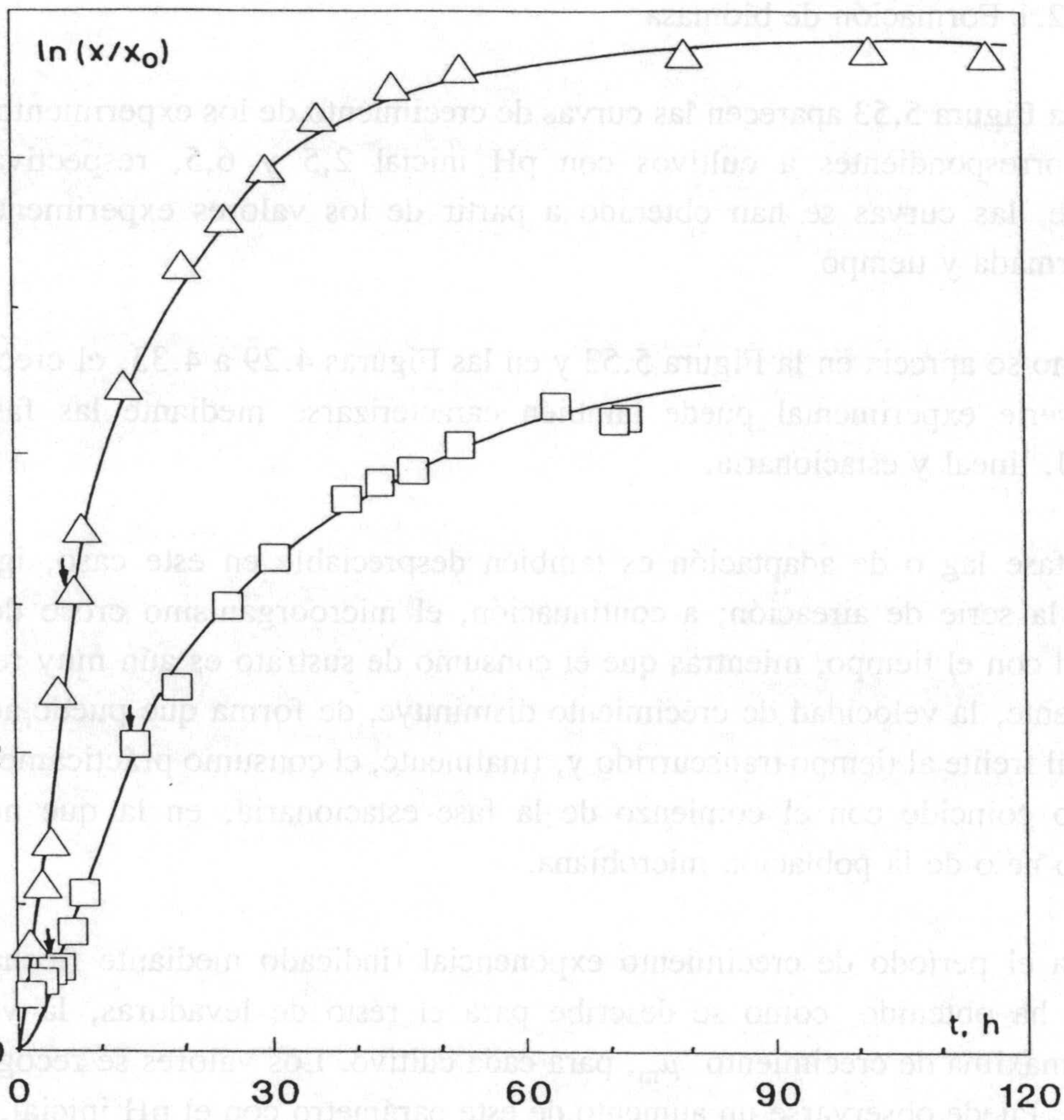


Fig. 5.53.- Curvas de crecimiento de los experimentos:
 (□) Pi-P1 (pH_i=2,5) y (Δ) Pi-P4 (pH_i=6,5)

UNIVERSIDAD DE GRANADA

26 MAR. 1993

COMISION DE DOCTORADO

TABLA 5.34
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO
(Pichia stipitis)

INFLUENCIA DEL pH INICIAL

$s_0 = 25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $Q = 0,0 \text{ v/v/min}$

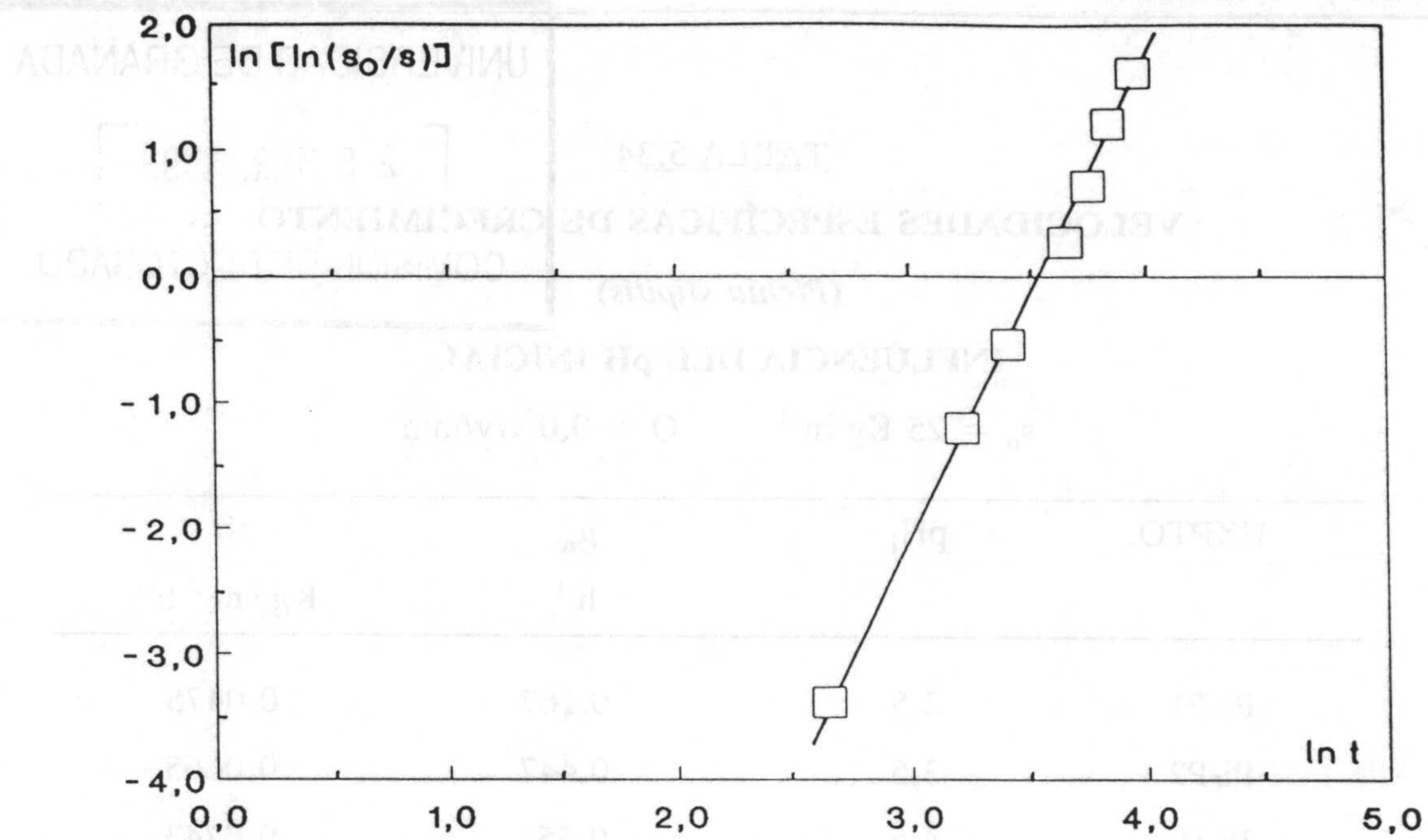
EXPTO.	pH _i	μ_m h ⁻¹	b Kg · m ⁻³ · h ⁻¹
Pi-P1	2,5	0,167	0,0475
Pi-P2	3,5	0,447	0,0665
Pi-B	4,5	0,554	0,0743
Pi-P3	5,5	0,629	0,0695
Pi-P4	6,5	0,471	0,0693

5.5.2.2 Consumo de sustrato

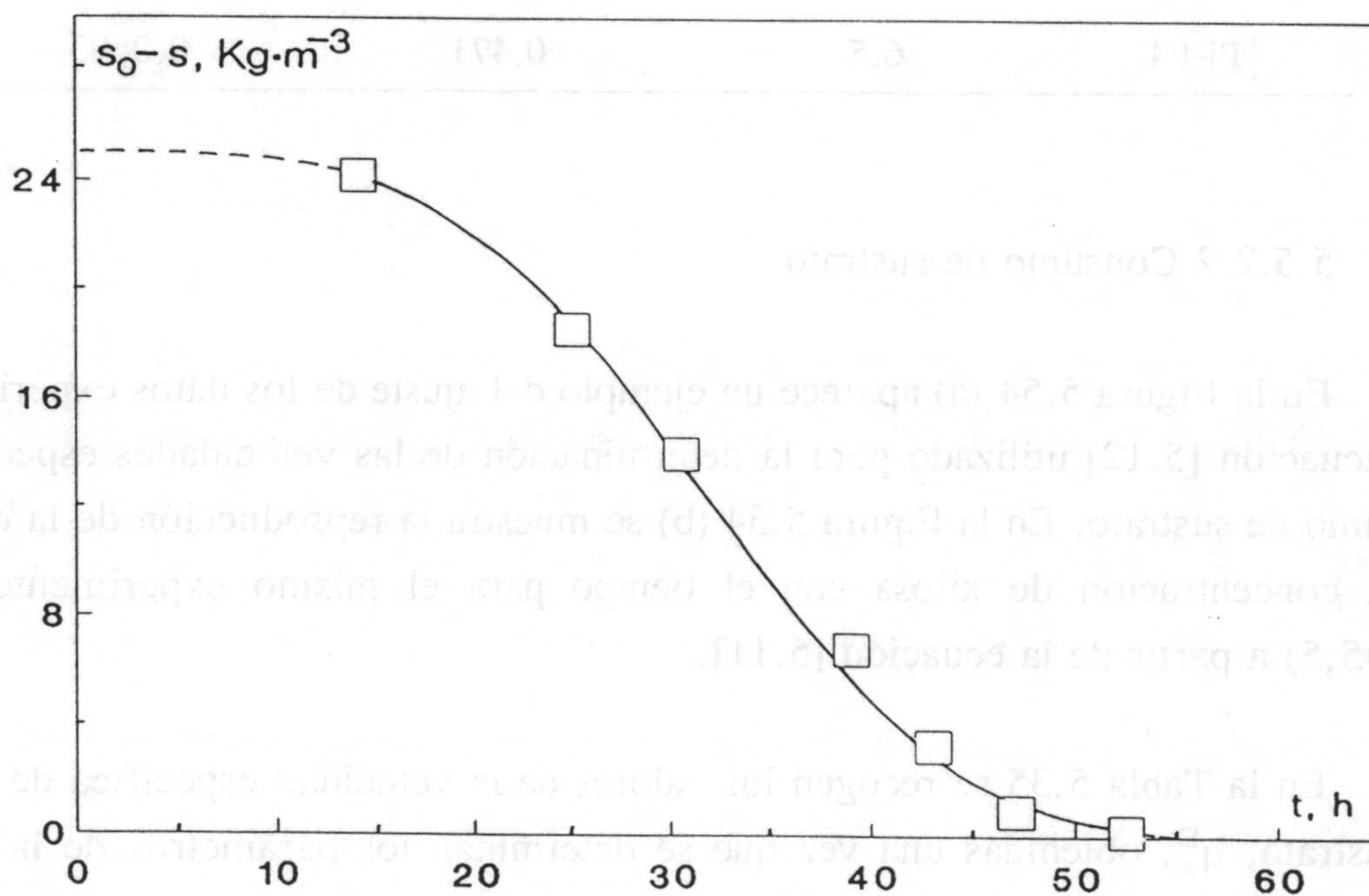
En la Figura 5.54 (a) aparece un ejemplo del ajuste de los datos experimentales a la ecuación [5.12] utilizado para la determinación de las velocidades específicas de consumo de sustrato. En la Figura 5.54 (b) se muestra la reproducción de la evolución de la concentración de xilosa con el tiempo para el mismo experimento (Pi-P3, pH_i=5,5) a partir de la ecuación [5.11].

En la Tabla 5.35 se recogen los valores de la velocidad específica de consumo de sustrato, q_s^D , obtenidas una vez que se determinan los parámetros de la ecuación [5.11].

Se ha determinado que q_s^D adquiere valores progresivamente mayores hasta alcanzar el máximo, que se sitúa en un tiempo de cultivo entre 15 y 25 horas, momento a partir del cual se produce una disminución en los valores de este parámetro con el tiempo. Por otra parte, los cultivos con pH inicial de 3,5 y 4,5 presentan las mayores velocidades específicas de consumo de sustrato, mientras que no hay influencia significativa en los experimentos realizados con pH_i superior.



a)



b)

Fig. 5.54.- a) Ajuste de los datos experimentales de consumo de xilosa a la ecuación [5.12], experimento Pi-P3 ($\text{pH}_i=5,5$)
 b) Reproducción de la ecuación [5.11], experimento Pi-P3

TABLA 5.47
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO
(Pichia stipitis)
INFLUENCIA DEL pH INICIAL

EXPTO.	pH _i	$s_0 = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$		$Q = 0,0 \text{ v/v/min}$	
		$Y_{x/s}^G$ Kg · Kg ⁻¹	t h	q_s^D Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹	q_s Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹
Pi-P1	2,5	0,092	25,0	0,61	0,77
			39,0	0,51	0,38
Pi-P2	3,5	0,078	25,0	0,90	0,80
			39,0	0,39	0,40
Pi-B	4,5	0,077	25,0	0,86	0,92
			39,0	0,36	0,42
Pi-P3	5,5	0,096	25,0	0,71	0,63
			39,0	0,40	0,33
Pi-P4	6,5	0,10	25,0	0,72	0,66
			39,0	0,33	0,32

Los rendimientos globales en biomasa se han determinado a partir de representaciones de biomasa neta formada, $x-x_0$, frente a sustrato neto consumido, s_0-s , similares a la incluida en la Figura 5.55 que corresponde al experimento Pi-P3. Los valores obtenidos por ajuste de mínimos cuadrados se reflejan en la Tabla 5.35, en la que puede apreciarse que el menor valor de este parámetro se alcanza para el experimento base (pH_i=4,5), aumentando a medida que el pH se aleja de este valor central.

Puesto que el rendimiento en biomasa es constante y, admitiendo que no existe mantenimiento celular, a partir de este parámetro puede determinarse la velocidad específica de consumo de sustrato, q_s , a los mismos tiempos en que se hizo para el método diferencial. Estos resultados aparecen conjuntamente en la Tabla 5.35, observándose una concordancia aceptable entre ambos procedimientos.

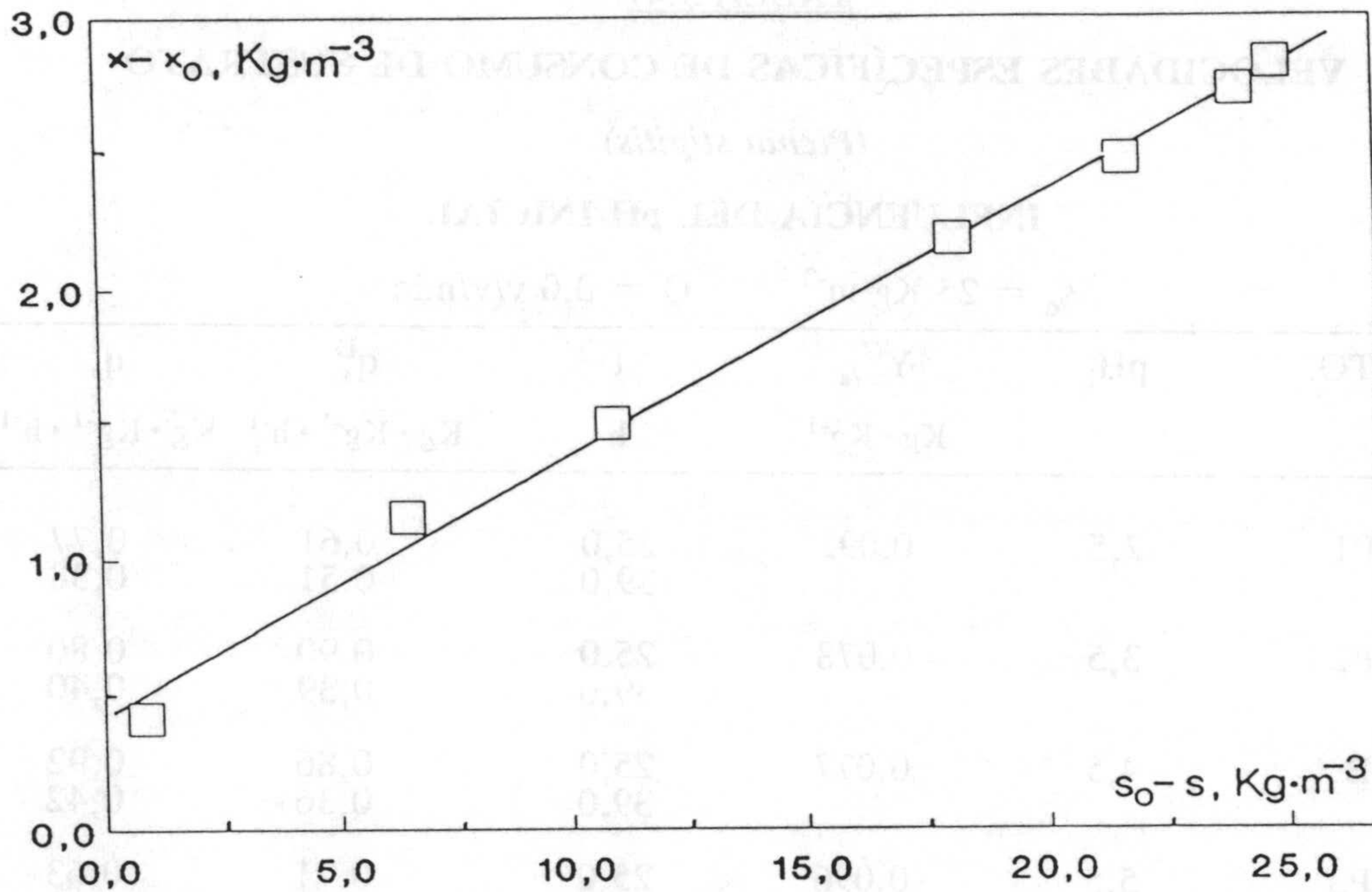


Fig. 5.55.- Rendimiento medio en biomasa, experimento Pi-P3 ($\text{pH}_i=5,5$)

5.5.2.3 Formación de bioproductos

En la Figura 5.56 (a) aparece, a título de ejemplo, la linealización realizada a partir de los resultados experimentales de Etanol-Tiempo a la ecuación [5.25] correspondiente al experimento Pi-P1 ($\text{pH}_i=2,5$). Al igual que en este caso, en los restantes se han obtenido ajustes aceptables a la ecuación empírica propuesta. La reproducción de los valores de la concentración de etanol frente al tiempo aparece, para el mismo cultivo, en la Figura 5.56 (b), en la que la línea continua corresponde a los valores deducidos de la ecuación [5.24], mientras que los puntos representan los resultados experimentales.

Los valores de la velocidad específica de producción de etanol, q_E^D , una vez determinados los parámetros, aparecen en la Tabla 5.36.

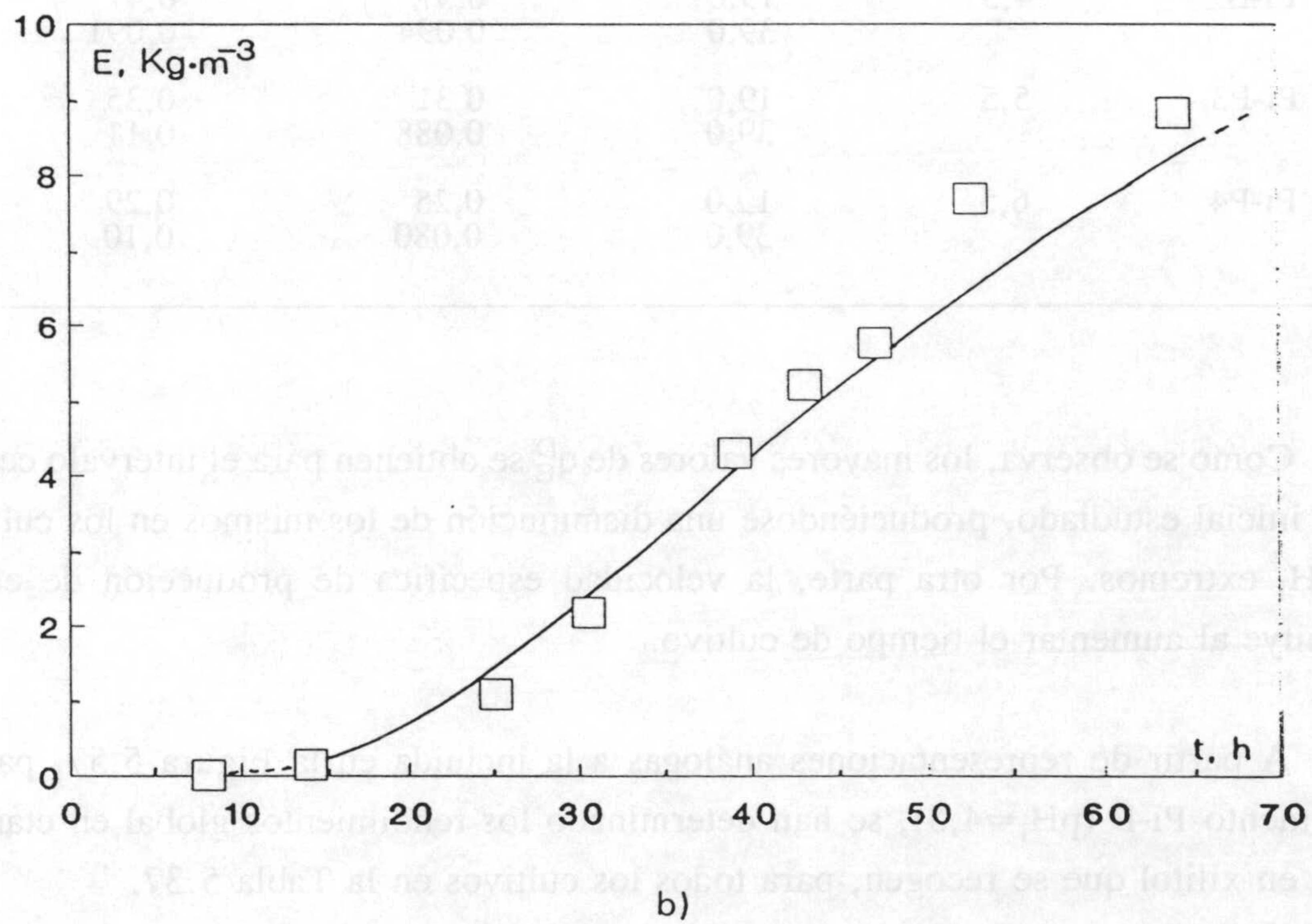
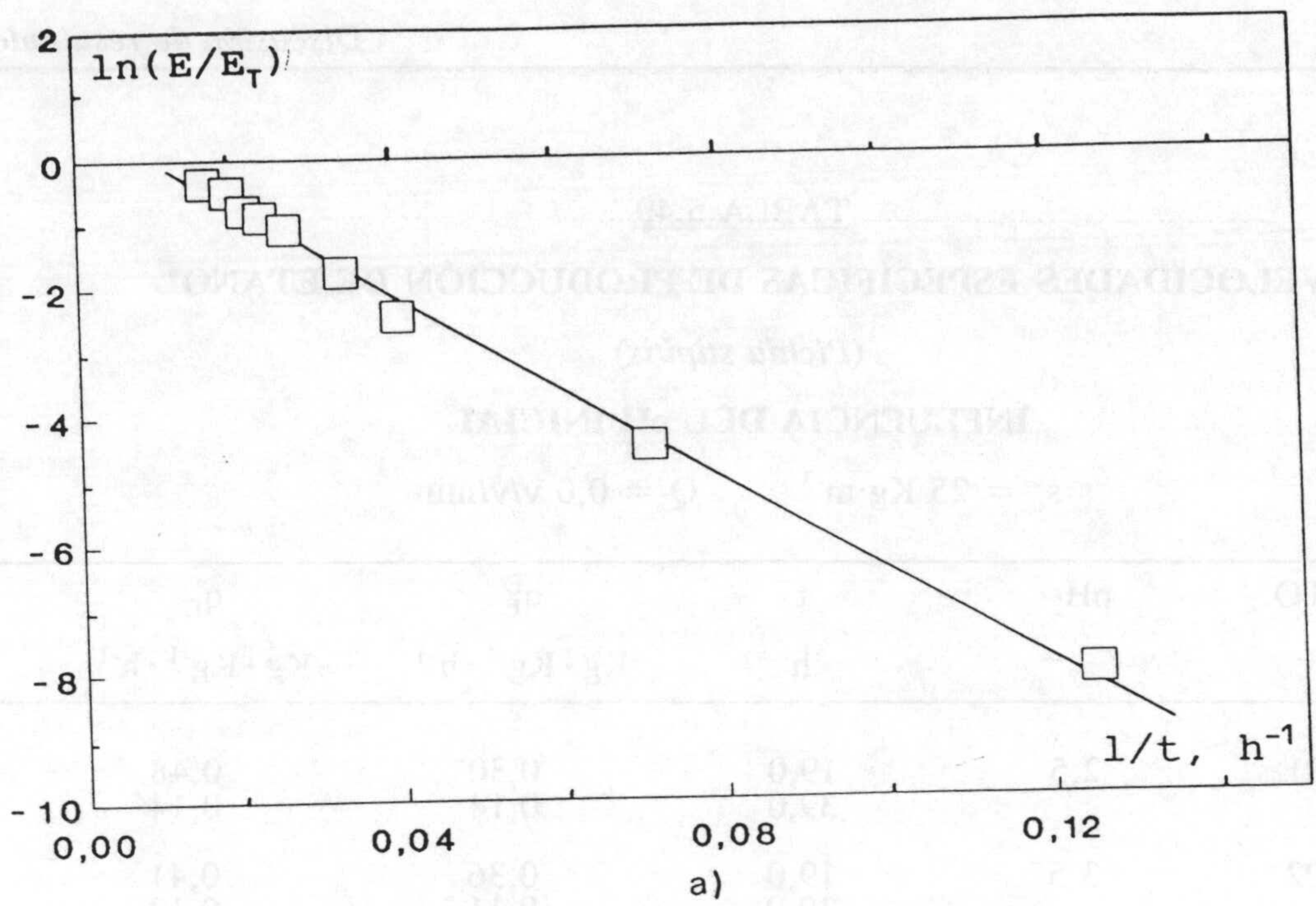


Fig. 5.56.- a) Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol a la ecuación [5.25], experimento Pi-P1 ($pH_i=2,5$)
 b) Reproducción de la ecuación [5.24], experimento Pi-P1

TABLA 5.49
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL
(*Pichia stipitis*)
INFLUENCIA DEL pH INICIAL

$$s_0 = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3} \quad Q = 0,0 \text{ v/v/min}$$

EXPTO.	pH _i	t h	q _E ^D Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹	q _E Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹
Pi-P1	2,5	19,0	0,30	0,48
		39,0	0,14	0,14
Pi-P2	3,5	19,0	0,36	0,41
		39,0	0,11	0,12
Pi-B	4,5	19,0	0,37	0,47
		39,0	0,094	0,091
Pi-P3	5,5	19,0	0,31	0,35
		39,0	0,088	0,11
Pi-P4	6,5	19,0	0,25	0,29
		39,0	0,080	0,10

Como se observa, los mayores valores de q_E^D se obtienen para el intervalo central de pH inicial estudiado, produciéndose una disminución de los mismos en los cultivos con pH_i extremos. Por otra parte, la velocidad específica de producción de etanol disminuye al aumentar el tiempo de cultivo.

A partir de representaciones análogas a la incluida en la Figura 5.57, para el experimento Pi-B (pH_i=4,5), se han determinado los rendimientos global en etanol y medio en xilitol que se recogen, para todos los cultivos en la Tabla 5.37.

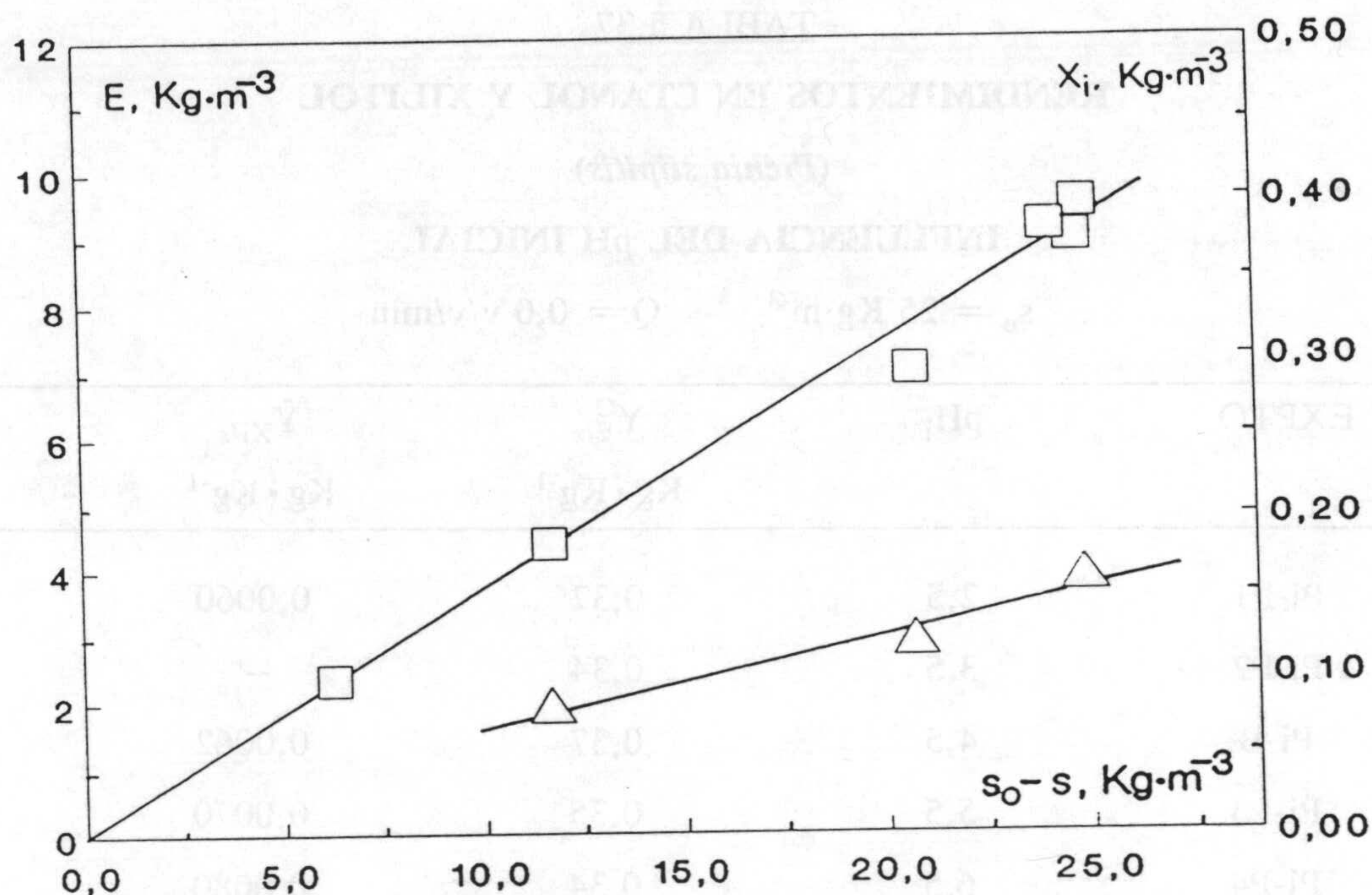


Fig. 5.57.- Rendimientos en etanol (□) y xilitol (Δ), experimento Pi-B (pH_i=4,5)

En cuanto al rendimiento global en etanol, no se detecta influencia significativa del pH inicial del medio de cultivo sobre este parámetro; por su parte, el rendimiento medio en xilitol aumenta a medida que aumenta el pH inicial. Estos rendimientos en etanol comprendidos entre 0,34 y 0,37 (Kg etanol)·(Kg·xilosa)⁻¹ s o n algo superiores y algo inferiores a 0,33 y 0,41 (Kg etanol)·(Kg·xilosa)⁻¹, valores obtenidos por Linko y col. (1986) y Slininger y col. (1985), utilizando *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 y una concentración inicial de xilosa de 30 y 50 Kg·m⁻³ respectivamente.

TABLA 5.37
RENDIMIENTOS EN ETANOL Y XILITOL
(Pichia stipitis)
INFLUENCIA DEL pH INICIAL

$s_0 = 25 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ $Q = 0,0 \text{ v/v/min}$

EXPTO.	pH _i	$Y_{E/s}^G$ Kg · Kg ⁻¹	$\bar{Y}_{Xi/s}$ Kg · Kg ⁻¹
Pi-P1	2,5	0,37	0,0060
Pi-P2	3,5	0,34	--
Pi-B	4,5	0,37	0,0062
Pi-P3	5,5	0,35	0,0070
Pi-P4	6,5	0,34	0,0080

Finalmente se ha determinado la productividad en biomasa, $Y_{E/x}$, mediante representaciones de E frente a $x-x_0$, análogas a la que se presenta en la Figura 5.58 para el experimento Pi-P2. A partir de los valores de la productividad en etanol pueden determinarse nuevamente los valores de la velocidad específica de producción de tanol, q_E , resultados que se muestran en la Tabla 5.36 junto a los encontrados por el método diferencial, a los mismos tiempos de cultivo. En general, se ha obtenido una aceptable concordancia por ambos procedimientos.

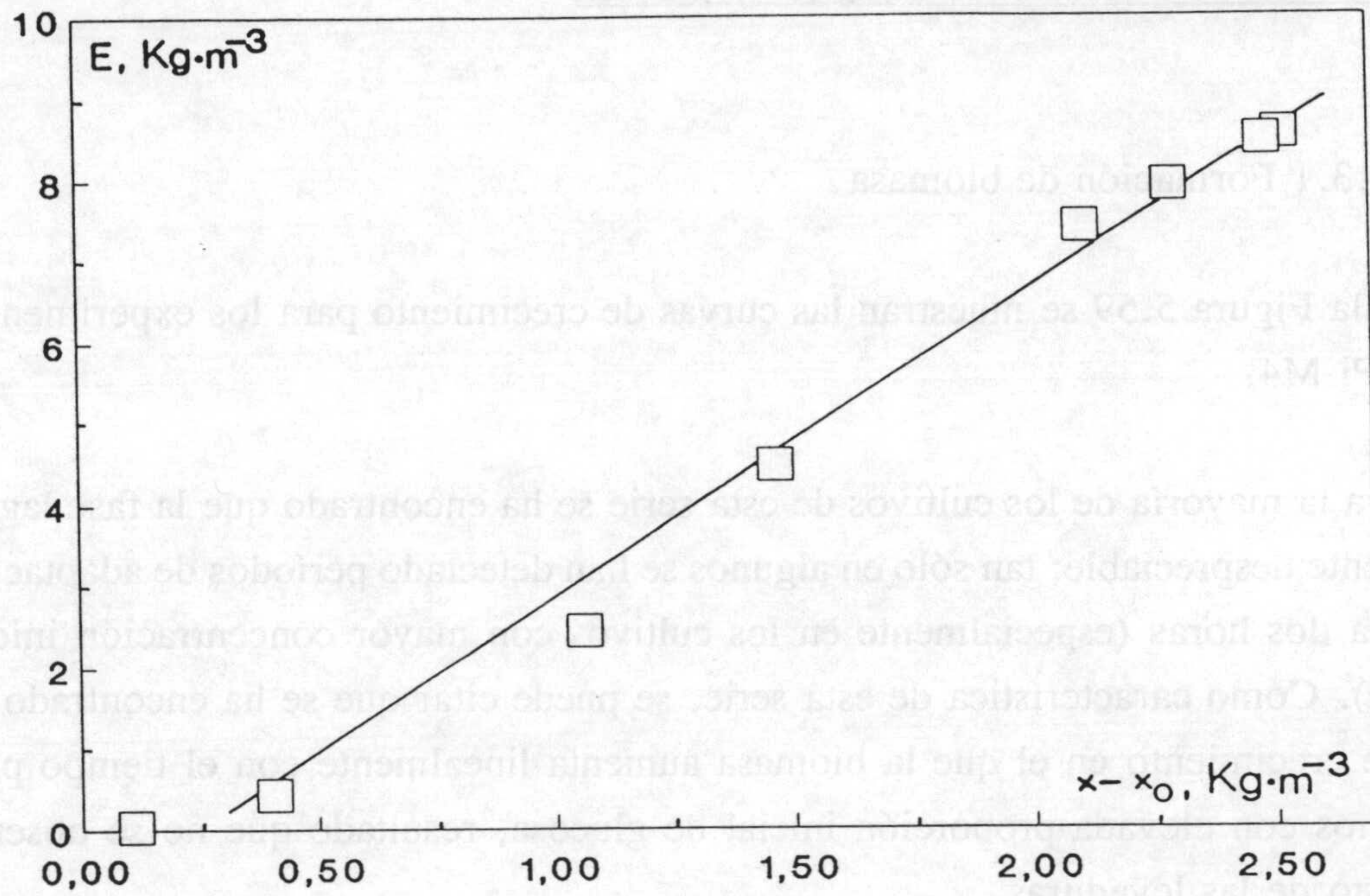


Fig. 5.58.- Etanol producido frente a biomasa neta formada, experimento Pi-P2 ($pH_i=3,5$)

5.5.3 Utilización de disoluciones de xilosa y glucosa

5.5.3.1 Formación de biomasa

En la Figura 5.59 se muestran las curvas de crecimiento para los experimentos Pi-M7 y Pi-M4.

Para la mayoría de los cultivos de esta serie se ha encontrado que la fase lag es prácticamente despreciable; tan sólo en algunos se han detectado períodos de adaptación inferiores a dos horas (especialmente en los cultivos con mayor concentración inicial en glucosa). Como característica de esta serie, se puede citar que se ha encontrado un período de crecimiento en el que la biomasa aumenta linealmente con el tiempo para experimentos con elevada proporción inicial de glucosa, resultado que no se observó para el resto de las levaduras.

En la Tabla 5.35 se recogen los valores de la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , y de la productividad en biomasa, b.

Como se observa, se alcanzan altos valores de μ_m cuando se emplean tanto xilosa como glucosa separadamente, aunque el mayor valor corresponde a xilosa como sustrato; cuando se utiliza una mezcla de ambos sustratos, en general, la velocidad específica máxima de crecimiento es mayor para los experimentos en que xilosa está en mayor proporción inicial. Esto parece indicar que, al contrario de lo que sucede con el resto de los microorganismos estudiados, *Pichia stipitis* parece tener mayor afinidad por dicho sustrato que por glucosa. Por otra parte, los valores de este parámetro alcanzados son superiores a los obtenidos en el resto de levaduras ensayadas y comparables a los encontrados en *Saccharomyces cerevisiae* por Gaden (1959), utilizando como sustrato glucosa.

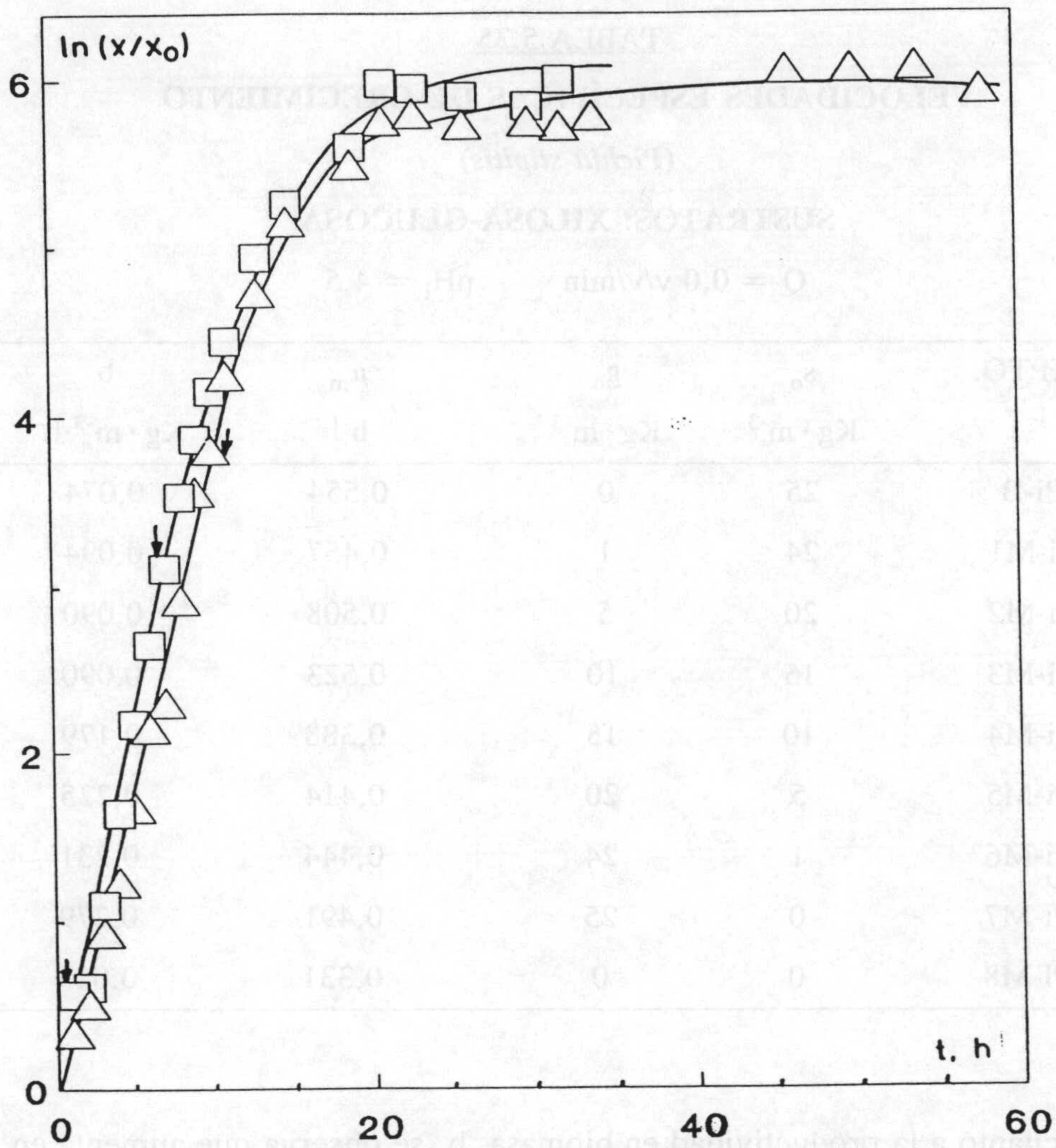


Fig. 5.59.- Curvas de crecimiento para los experimentos:

- Pi-M7 ($s_0=25$, $g_0=0 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$) y
- △ Pi-M4 ($s_0=10$, $g_0=15 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)

TABLA 5.35
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO
(Pichia stipitis)
SUSTRATOS: XILOSA-GLUCOSA

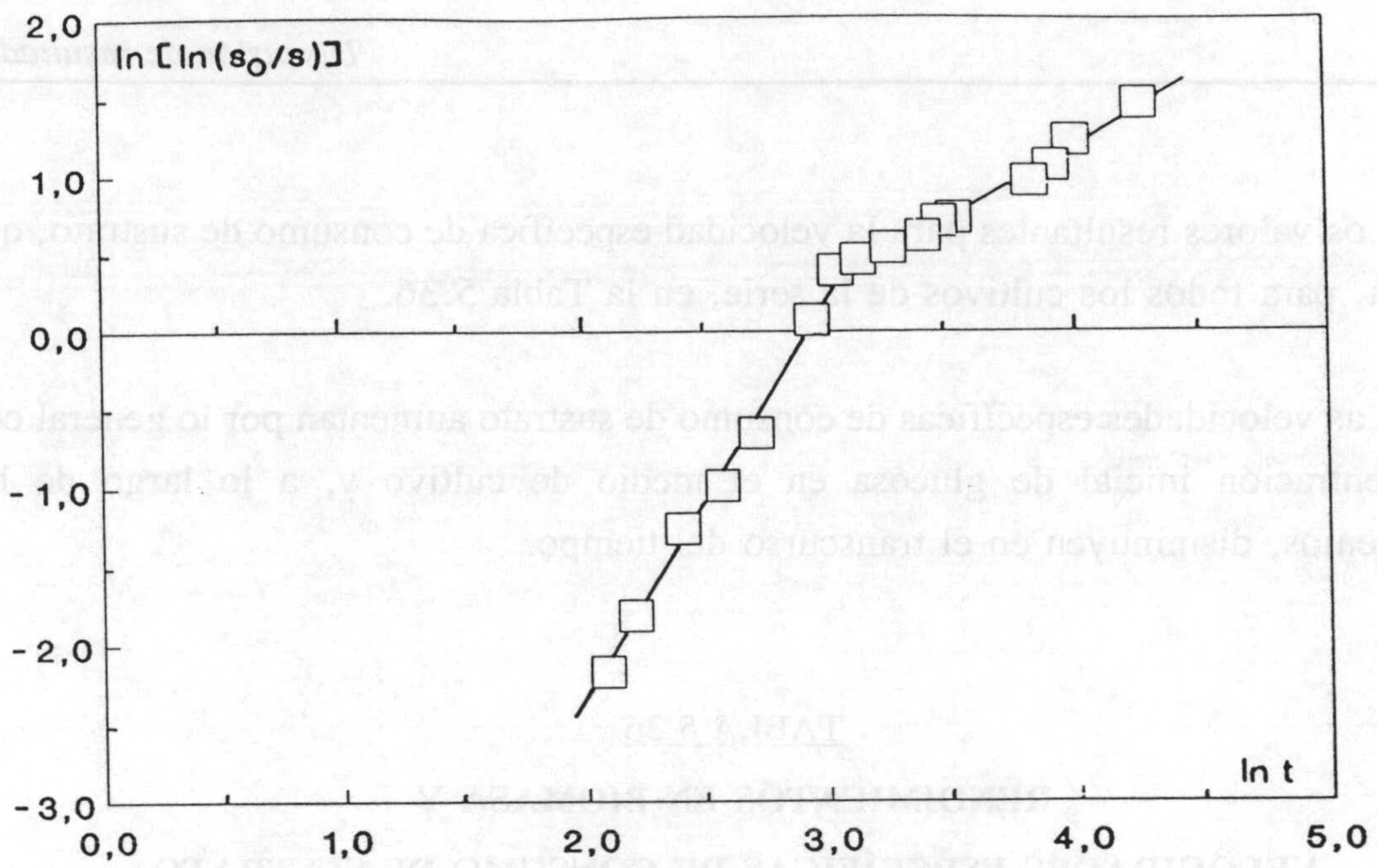
$Q = 0,0 \text{ v/v/min}$ $\text{pH}_i = 4,5$

EXPTO.	s_0 $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$	g_0 $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$	μ_m h^{-1}	b $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$
Pi-B	25	0	0,554	0,074
Pi-M1	24	1	0,457	0,094
Pi-M2	20	5	0,508	0,090
Pi-M3	15	10	0,523	0,090
Pi-M4	10	15	0,388	0,179
Pi-M5	5	20	0,414	0,225
Pi-M6	1	24	0,444	0,231
Pi-M7	0	25	0,491	0,279
Pi-M8	0	0	0,331	0,023

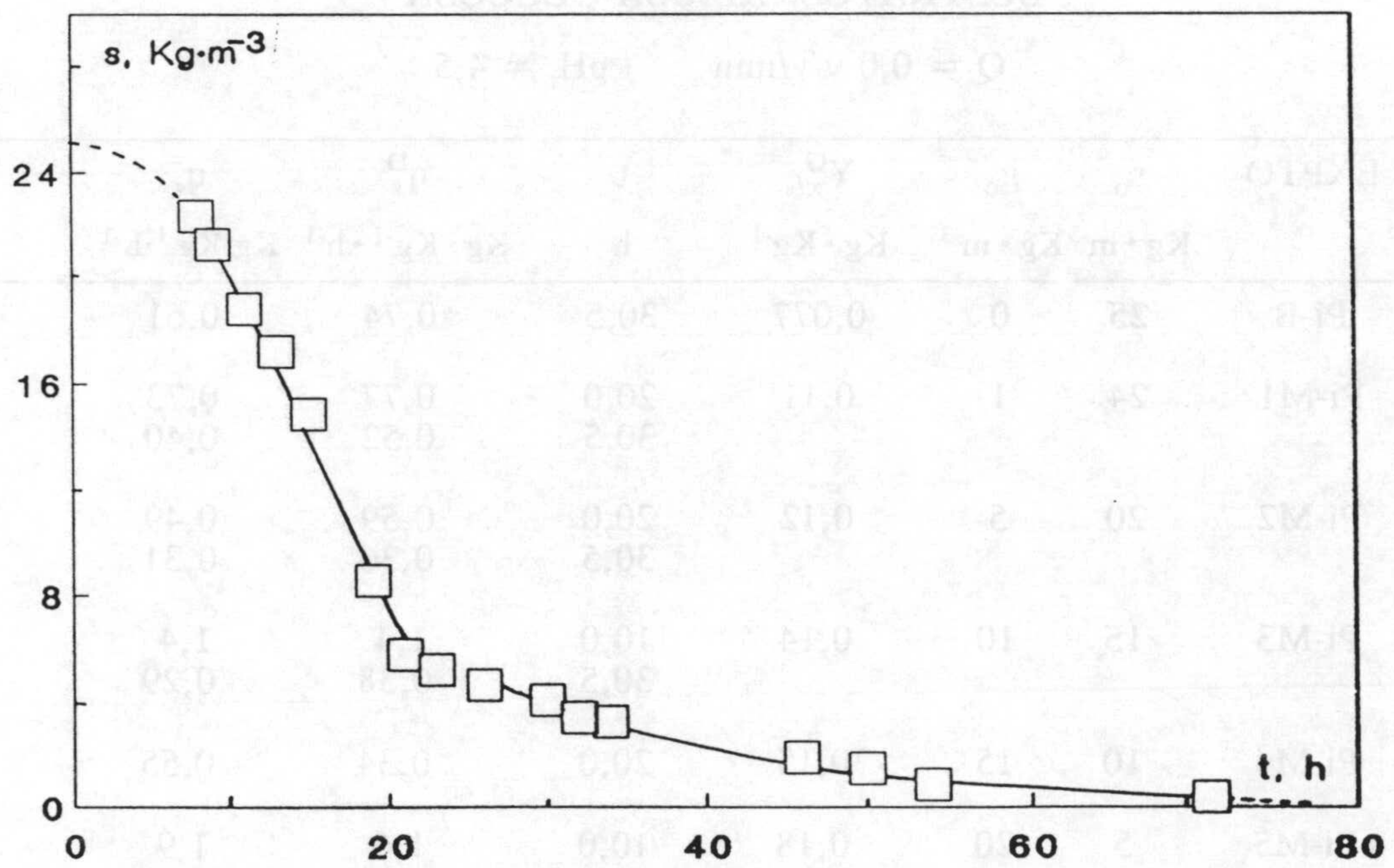
En cuanto a la productividad en biomasa, b , se observa que aumenta en general a medida que lo hace la concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo.

5.5.3.2 Consumo de sustrato

En la Figura 5.60 (a) se muestra un ejemplo del ajuste de los datos experimentales realizado según la ecuación propuesta [5.12]. En general, se han obtenido ajustes aceptables durante el período de validez de la ecuación. En dicha Figura pueden observarse los dos períodos de consumo correspondientes a cada uno de los sustratos, pues, como sucede en el resto de microorganismos estudiados, se realiza un consumo secuencial utilizando glucosa, en primer lugar, y xilosa, en segundo. La reproducción de la concentración total de sustrato en función del tiempo, una vez determinados los parámetros implicados, aparece en la Figura 5.60 (b), correspondiente, igual que la anterior, al experimento Pi-M5.



a)



b)

Fig. 5.60.- a) Aplicación de la ecuación [5.12] al experimento Pi-M5 ($s_0=20$ y $g_0=5 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
 b) Reproducción de los resultados experimentales para el cultivo Pi-M5

Los valores resultantes para la velocidad específica de consumo de sustrato, q_s^D , aparecen, para todos los cultivos de la serie, en la Tabla 5.36.

Las velocidades específicas de consumo de sustrato aumentan por lo general con la concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo y, a lo largo de los experimentos, disminuyen en el transcurso del tiempo.

TABLA 5.36
RENDIMIENTOS EN BIOMASA Y
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO
(Pichia stipitis)
SUSTRATOS: XILOSA-GLUCOSA

$Q = 0,0 \text{ v/v/min}$ $\text{pH}_i = 4,5$

EXPTO	s_0 $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$	g_0 $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$	$Y_{x/s}^G$ $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1}$	t h	q_s^D $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	q_s $\text{Kg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
Pi-B	25	0	0,077	30,5	0,74	0,61
Pi-M1	24	1	0,11	20,0	0,77	0,73
				30,5	0,52	0,40
Pi-M2	20	5	0,12	20,0	0,59	0,49
				30,5	0,36	0,31
Pi-M3	15	10	0,14	10,0	1,4	1,4
				30,5	0,38	0,29
Pi-M4	10	15	0,15	20,0	0,34	0,55
Pi-M5	5	20	0,18	10,0	1,6	1,9
				20,0	0,39	0,43
Pi-M6	1	24	0,18	10,0	2,0	2,1
				20,0	0,36	0,45
Pi-M7	0	25	0,19	10,0	2,2	1,9
				19,0	0,33	0,45

Por otra parte, los rendimientos globales en biomasa se han calculado a partir de representaciones análogas a la que se muestra en la Figura 5.61 para el experimento Pi-M3. Los resultados obtenidos para todos los cultivos de la serie aparecen, junto a los de las velocidades específicas de consumo de sustrato, en la Tabla 5.36.

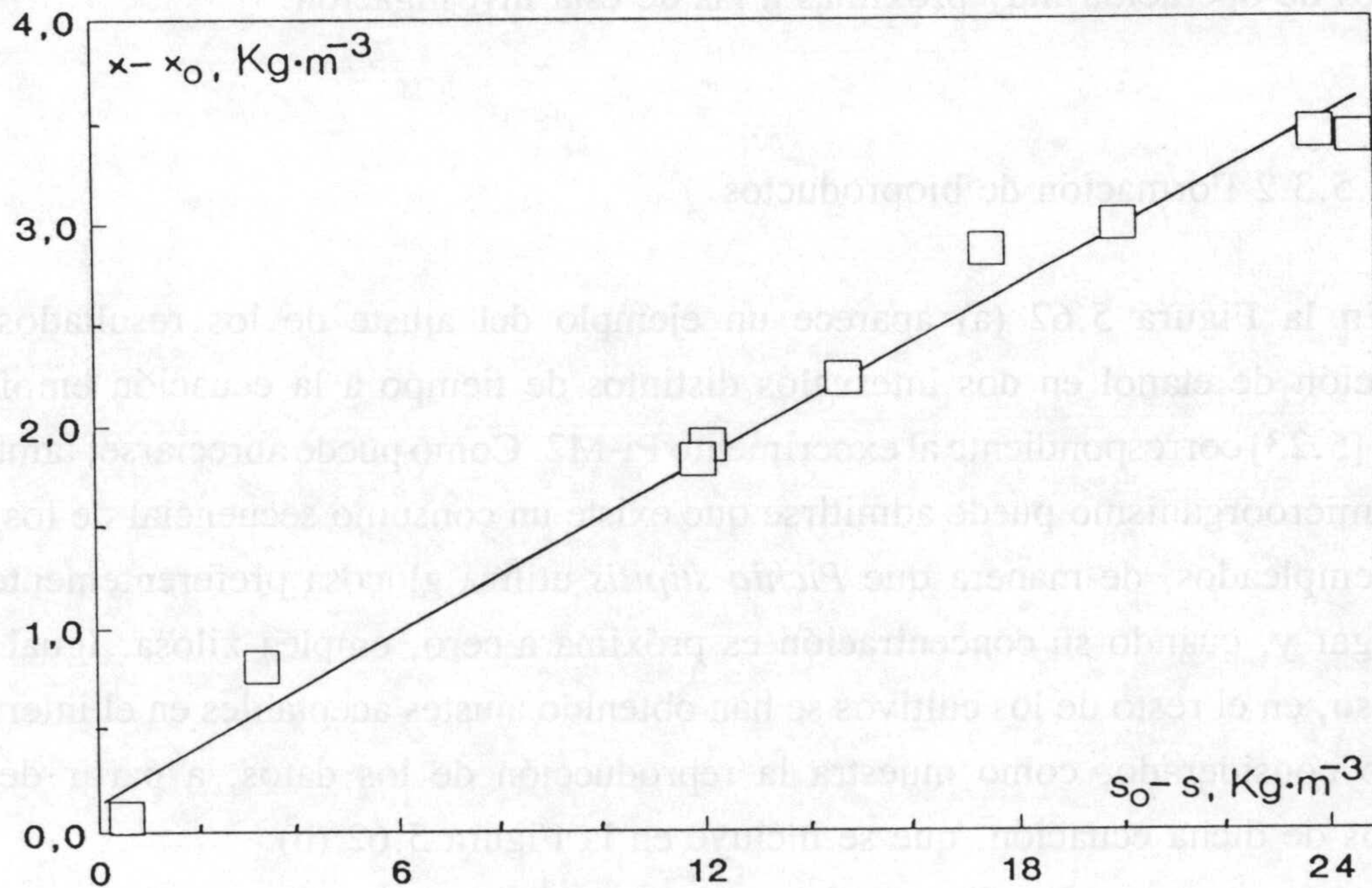


Fig. 5.61.- Rendimiento en biomasa para el experimento Pi-M3 ($s_0 = 15, g_0 = 10 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)

Los rendimientos globales en biomasa aumentan con la concentración inicial de glucosa. Por otra parte, conviene señalar que, en los experimentos realizados con mayor proporción inicial de glucosa (Pi-M5 a Pi-M7), la producción de biomasa tiene lugar mientras es consumido este sustrato; posteriormente, el consumo de xilosa se invierte en la formación de bioproductos pero no se produce un aumento neto de biomasa, por lo que el rendimiento global se ha calculado hasta ese momento.

El rendimiento en biomasa cuando sólo se utiliza glucosa como sustrato es prácticamente coincidente con el obtenido por Grootjen y col. (1990); estos autores indican un valor de $Y_{x/s}$ entre 0,17 y 0,2 (Kg biomasa)·(Kg glucosa)⁻¹ para niveles de aireación pequeños, con velocidades de suministro de oxígeno entre 0 y 0,101 Kmol·m⁻³·h⁻¹ /equivalente a un nivel de aireación entre 0 y 0,018 v/v/min) utilizando condiciones de operación muy próximas a las de esta investigación.

5.5.3.2 Formación de bioproductos

En la Figura 5.62 (a) aparece un ejemplo del ajuste de los resultados de concentración de etanol en dos intervalos distintos de tiempo a la ecuación empírica propuesta [5.23] correspondiente al experimento Pi-M2. Como puede apreciarse, también para este microorganismo puede admitirse que existe un consumo secuencial de los dos sustratos empleados, de manera que *Pichia stipitis* utiliza glucosa preferentemente en primer lugar y, cuando su concentración es próxima a cero, emplea xilosa. Igual que en este caso, en el resto de los cultivos se han obtenido ajustes aceptables en el intervalo de tiempo considerado, como muestra la reproducción de los datos, a partir de los parámetros de dicha ecuación, que se incluye en la Figura 5.62 (b).

Una vez determinados los parámetros A y B, pueden calcularse las velocidades específicas de formación de etanol, q_E^D , que se recogen, para todos los experimentos, en la Tabla 5.37. Como puede observarse, los valores de este parámetro disminuyen a medida que transcurre el experimento; el valor máximo se ha encontrado para tiempos cercanos a 10 h.

Los valores de q_E^D para tiempos reducidos resultan superiores en los casos en que se utilizó glucosa, incluso en pequeña proporción, al correspondiente al cultivo en el que sólo se empleó xilosa como sustrato. Las velocidades específicas de producción de etanol obtenidas al inicio de la fermentación son superiores a las observadas por Delgenes y col. (1989), que muestran valores máximos de 0,1 Kg·Kg⁻¹·h⁻¹ cuando utilizan disoluciones con mezclas de xilosa, glucosa y arabinosa y un nivel de aireación pequeño (velocidades de suministro de oxígeno entre 0 y 0,005 Kmol·m⁻³·h⁻¹).

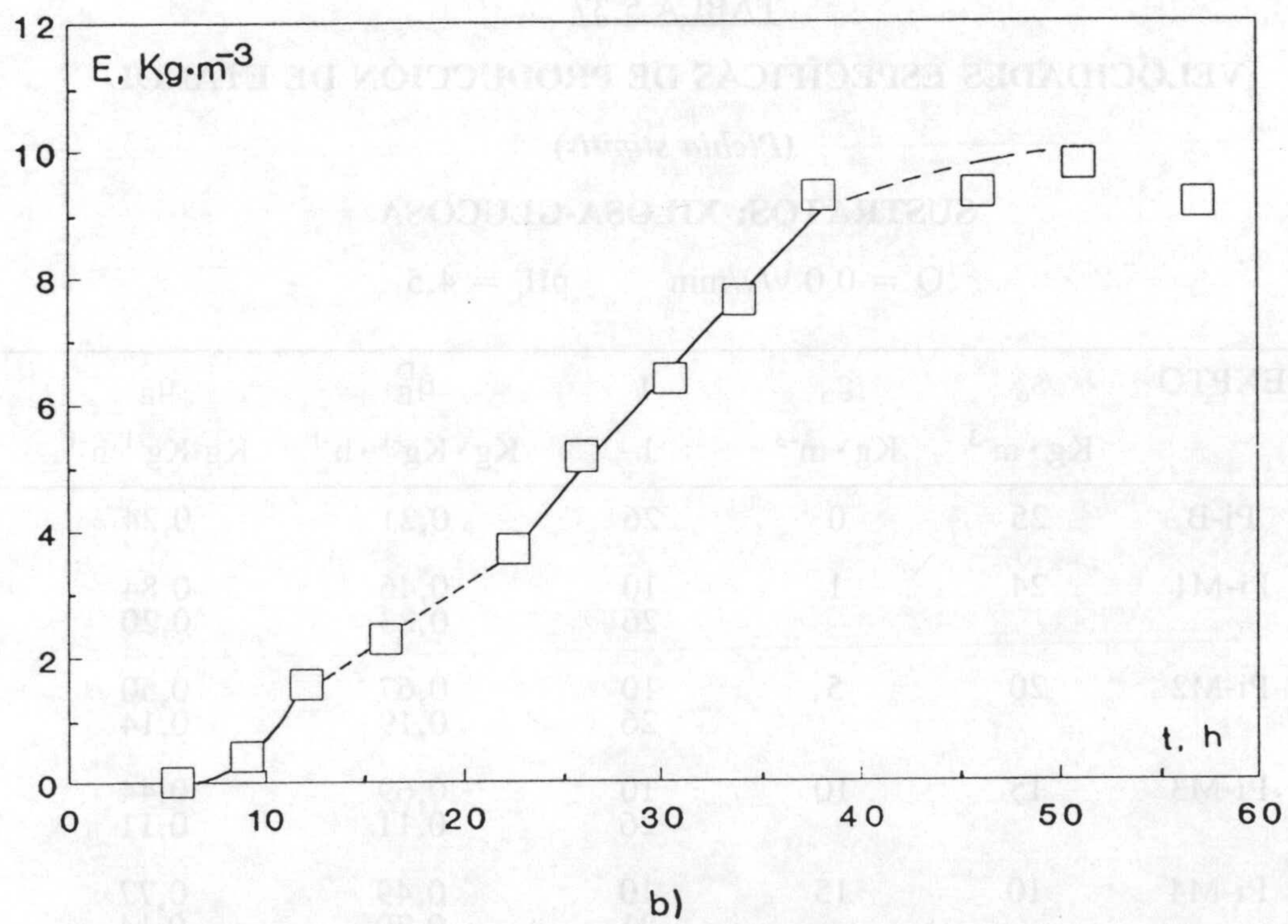
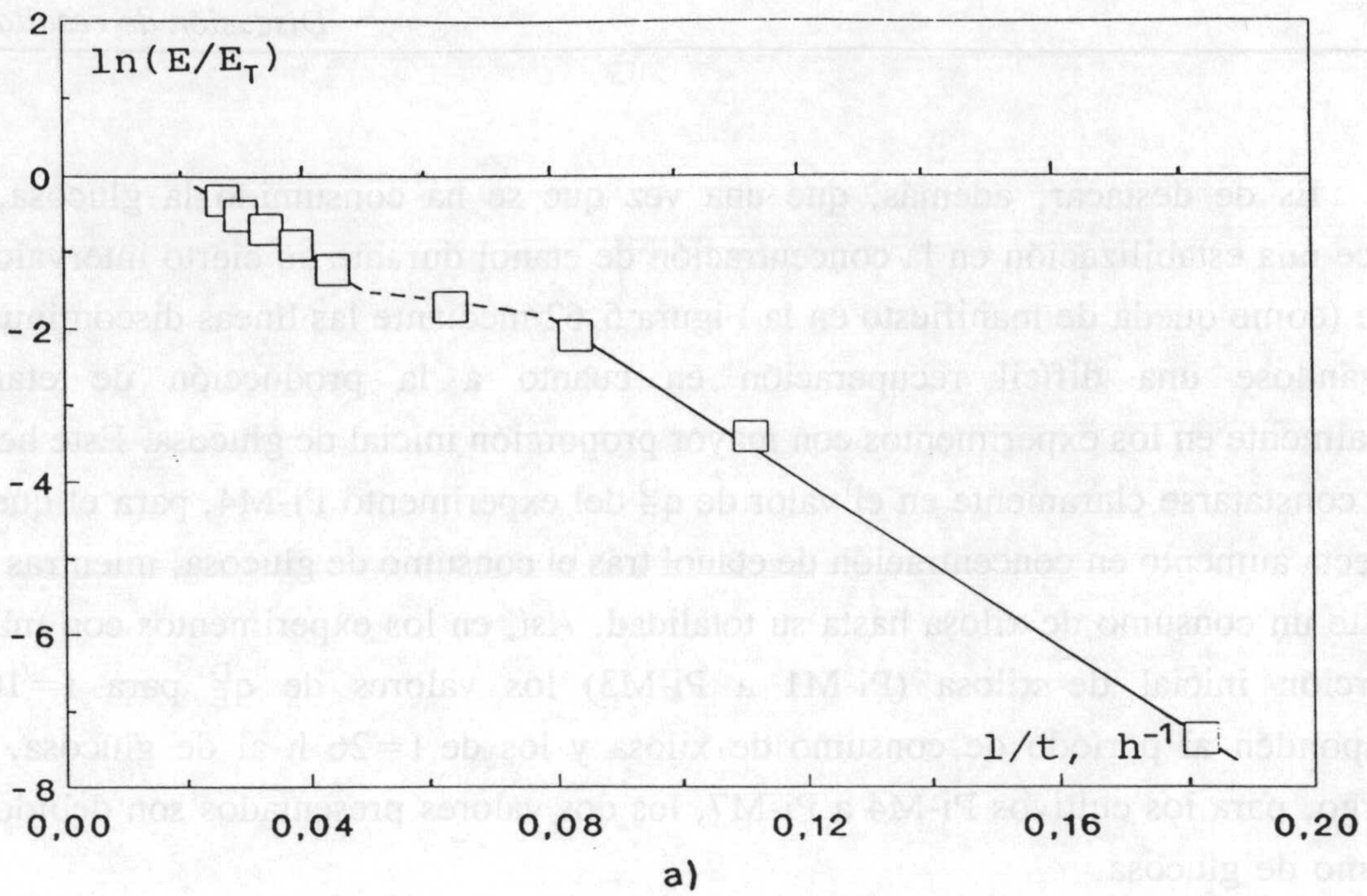


Fig. 5.62.- (a) Aplicación de la ecuación [5.23] al experimento Pi-M2 ($s_0=20$ y $g_0=5 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$)
 (b) Reproducción de los resultados experimentales para el cultivo Pi-M2

Es de destacar, además, que una vez que se ha consumido la glucosa, se produce una estabilización en la concentración de etanol durante un cierto intervalo de tiempo (como queda de manifiesto en la Figura 5.62 mediante las líneas discontinuas), observándose una difícil recuperación en cuanto a la producción de etanol, especialmente en los experimentos con mayor proporción inicial de glucosa. Este hecho puede constatarse claramente en el valor de q_E^D del experimento Pi-M4, para el que no se detecta aumento en concentración de etanol tras el consumo de glucosa, mientras que sí existe un consumo de xilosa hasta su totalidad. Así, en los experimentos con mayor proporción inicial de xilosa (Pi-M1 a Pi-M3) los valores de q_E^D para $t=10$ h corresponden al período de consumo de xilosa y los de $t=26$ h al de glucosa. Sin embargo, para los cultivos Pi-M4 a Pi-M7, los dos valores presentados son debidos al consumo de glucosa.

TABLA 5.37

VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

(Pichia stipitis)

SISTRATOS: XILOSA-GLUCOSA

Q = 0,0 v/v/min pH_i = 4,5

EXPTO	s _o Kg · m ⁻³	g _o Kg · m ⁻³	t h	q _E ^D Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹	q _E Kg · Kg ⁻¹ · h ⁻¹
Pi-B	25	0	26	0,21	0,24
Pi-M1	24	1	10	0,46	0,84
			26	0,23	0,20
Pi-M2	20	5	10	0,67	0,50
			26	0,19	0,14
Pi-M3	15	10	10	0,69	0,44
			26	0,11	0,11
Pi-M4	10	15	10	0,49	0,77
			21	0,20	0,14
Pi-M5	5	20	10	0,54	0,82
			21	0,13	0,16
Pi-M6	1	24	10	0,60	0,95
			21	0,14	0,18
Pi-M7	0	25	10	0,62	0,75
			21	0,19	0,12

Parece deducirse que el microorganismo sufre una fase de adaptación metabólica al pasar de uno a otro sustrato y que, en determinadas circunstancias, es incapaz de superar esta adaptación, al menos en cuanto a la formación de etanol se refiere. Por otra parte, el efecto inhibitorio que produce el propio etanol formado se pone de manifiesto también en las figuras correspondientes a los resultados experimentales, especialmente en los experimentos con mayor proporción inicial de glucosa (Figuras 4.60 a 4.63), donde puede apreciarse incluso un descenso neto de la población microbiana.

A partir de representaciones de las concentraciones de etanol y xilitol frente al sustrato total neto consumido se han determinado los rendimientos global en etanol y medio en xilitol que se recogen en la Tabla 5.38. La Figura 5.63 muestra esta representación para el experimento Pi-M3.

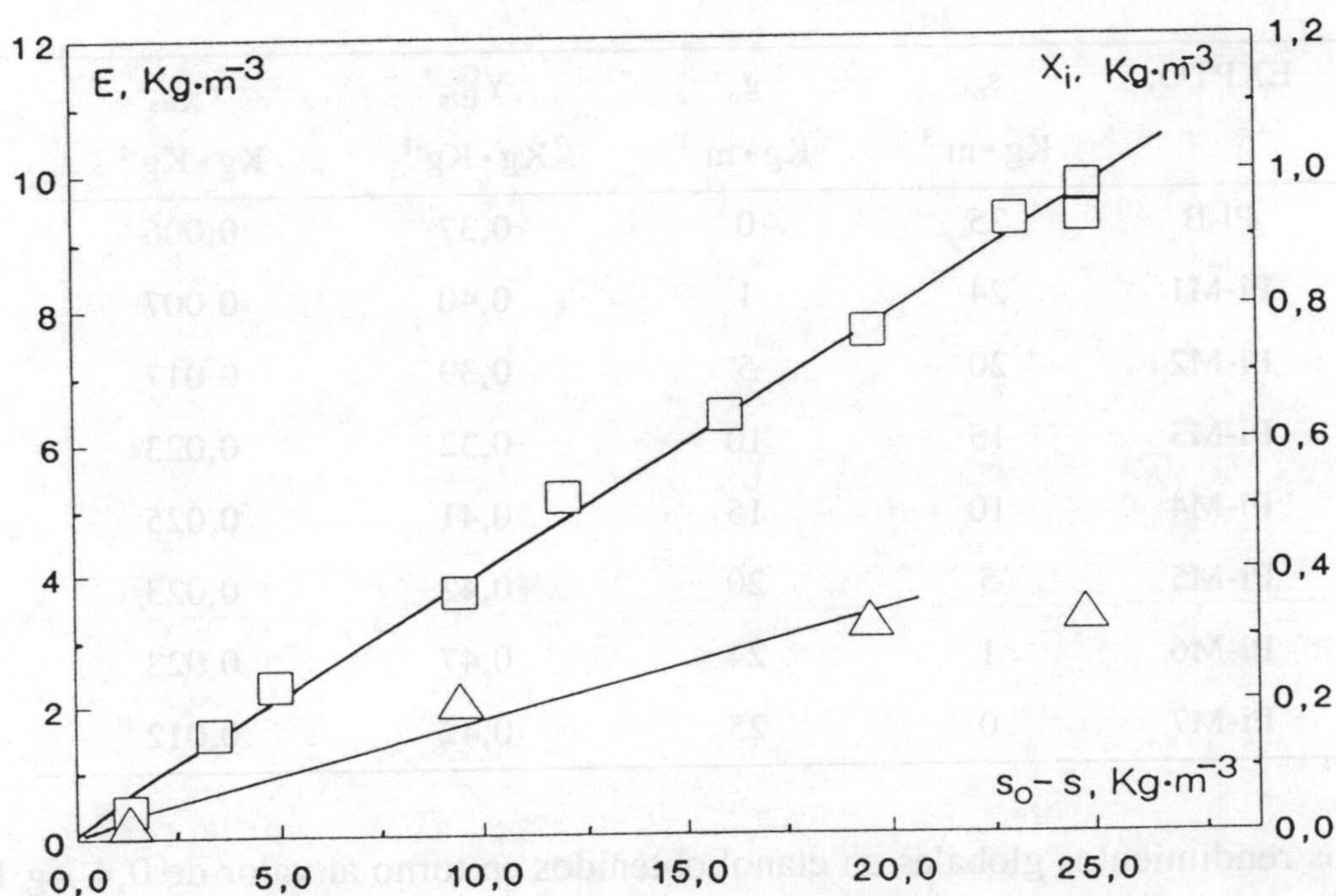


Fig. 5.63.- Rendimientos en etanol (\square) y xilitol (Δ), experimento Pi-M2 ($s_0 = 20$ y $g_0 = 5$ Kg·m⁻³)

Los resultados obtenidos muestran que un pequeño aporte de xilosa o glucosa eleva los rendimientos globales en etanol comparados con los encontrados cuando sólo

se emplea uno de los sustratos, mientras que cuando se aumenta la proporción, es decir, para experimentos con concentraciones semejantes de ambos azúcares, el rendimiento disminuye.

En cuanto al rendimiento medio en xilitol, los valores obtenidos en presencia de glucosa, en cualquier proporción, son superiores al correspondiente al cultivo realizado sólo con xilosa.

TABLA 5.38

RENDIMIENTOS EN ETANOL Y XILITOL

(Pichia stipitis)

SUSTRATOS: XILOSA-GLUCOSA

Q = 0,0 v/v/min pH_i = 4,5

EXPTO.	s _o Kg · m ⁻³	g _o Kg · m ⁻³	Y _{E/s} ^G Kg · Kg ⁻¹	Ȳ _{Xi/s} Kg · Kg ⁻¹
Pi-B	25	0	0,37	0,006
Pi-M1	24	1	0,40	0,007
Pi-M2	20	5	0,39	0,017
Pi-M3	15	10	0,32	0,023
Pi-M4	10	15	0,41	0,025
Pi-M5	5	20	0,42	0,023
Pi-M6	1	24	0,47	0,023
Pi-M7	0	25	0,42	0,012

Los rendimientos globales en etanol obtenidos en torno al valor de 0,4 Kg · Kg⁻¹ son similares a los máximos alcanzados por Delgenes y col. (1987), utilizando una disolución xilosa, glucosa y arabinosa, en condiciones de operación muy parecidas y con la misma levadura, *Pichia stipitis* NRRL Y 7124.

El rendimiento en etanol alcanzado cuando sólo se utiliza glucosa como sustrato es algo más elevado que el obtenido por Lighthelm y col. (1988); empleando esta misma

levadura y una concentración inicial de $40 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ de glucosa, estos autores obtienen un valor de $Y_{E/s}=0,38 \text{ (Kg etanol)}\cdot\text{(Kg glucosa)}^{-1}$.

Finalmente se han determinado los valores de la productividad en biomasa, $Y_{E/x}^G$, a partir de representaciones análogas a la incluida en la Figura 5.64 para el experimento Pi-M3. Mediante este parámetro se ha calculado la velocidad específica de producción de etanol, q_E , a los mismos tiempos en que se determinó por el método diferencial. Los resultados se incluyen también en la Tabla 5.37. En general se obtiene cierta coincidencia por ambos procedimientos, especialmente en los valores calculados a tiempos superiores.

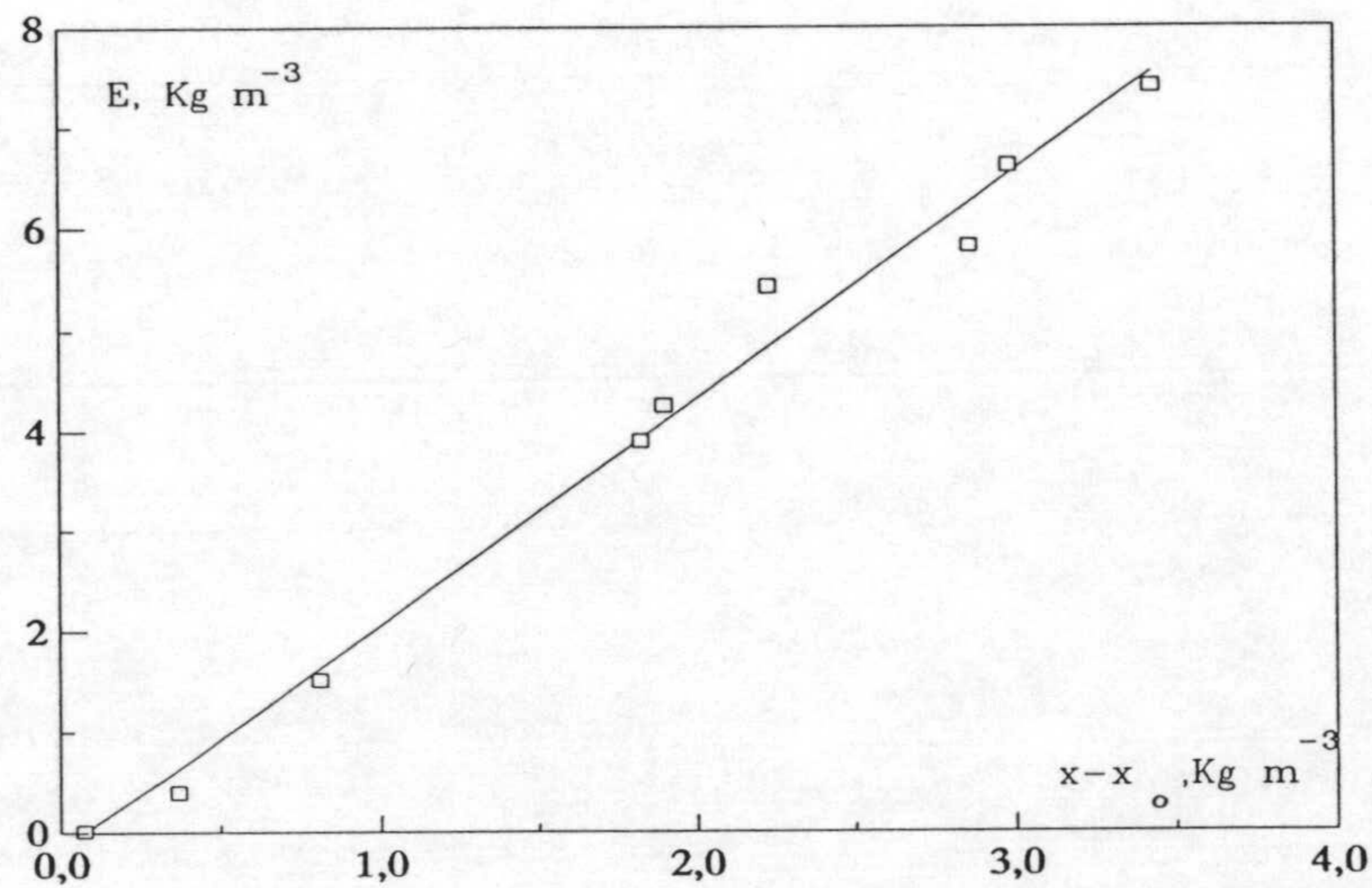


Fig. 5.64.- Etanol producido frente a biomasa neta formada, experimento Pi-M3 ($s_0 = 15$ y $g_0 = 10 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)

levadura y una concentración inicial de 40 g/l de glucosa, esos datos obtenidos en un valor de $Y_{P/S}^0 = 0.38$ (kg etanol / kg glucosa).

Finalmente se han determinado los valores de la productividad en biomasa, $Y_{X/S}^0$ a partir de representaciones análogas a la incluida en la Figura 2.04 para el experimento P1-M3. Mediante este parámetro se ha estimado la velocidad específica de producción de etanol, μ_P , a los mismos tiempos en que se determinó por el método diferencial. Los resultados se incluyen también en la Tabla 2.37. En general, se obtienen ciertos resultados por ambos procedimientos especialmente en los valores calculados a tiempos superiores.

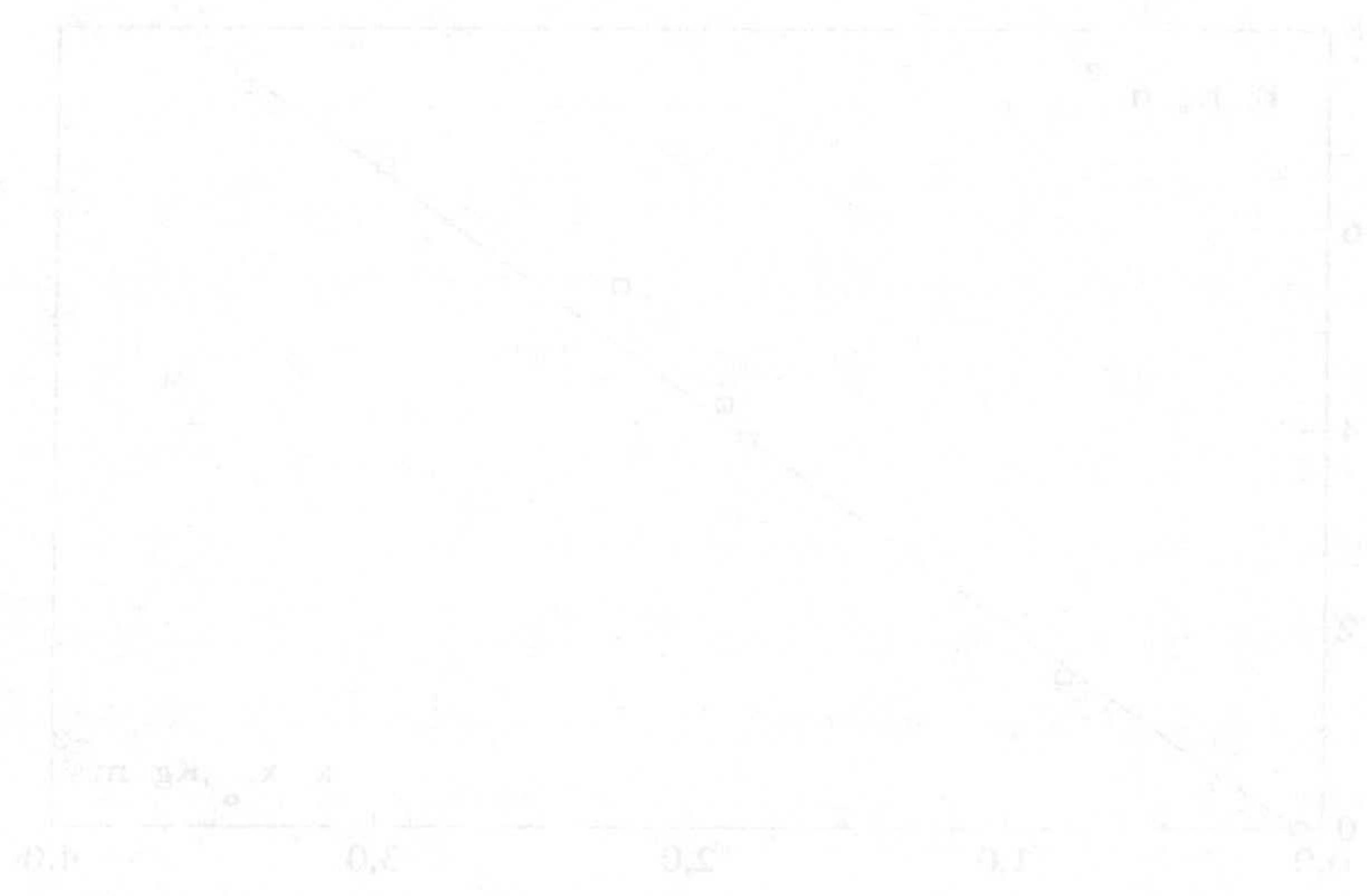


Fig. 2.04. Etanol producido por hora por la levadura formada, experimento P1-M3 ($\mu_P = 1.2$ y $Y_{P/S}^0 = 0.38$).

5.6 COMPARACIÓN DE RESULTADOS

5.6.1 Velocidades específicas máximas de crecimiento

De las cuatro levaduras estudiadas, *Pichia stipitis* presenta las mayores velocidades específicas máximas de crecimiento en las tres series experimentales realizadas. En *Pachysolen tannophilus* se obtienen, en cambio, los menores valores de este parámetro.

Los mayores valores de μ_m han sido obtenidos, para todos los microorganismos, en la serie de aireación. Para *Hansenula polymorpha*, el mayor valor corresponde al experimento base ($Q=0$ v/v/min), mientras que para el resto, los valores máximos se han detectado en distintos niveles de aireación.

En la serie en que se ha estudiado el pH inicial, los valores más elevados de μ_m se encuentran a pH_i 4,5, a excepción de *Pichia stipitis* en que se sitúa en 5,5. Los menores valores de la velocidad específica máxima de crecimiento corresponden a los experimentos de $\text{pH}_i=2,5$.

Finalmente, en cuanto a la influencia de la composición de sustratos en el medio de cultivo, tanto en *Pachysolen tannophilus* como en *Pichia stipitis* se alcanzan los mayores valores de la velocidad específica de crecimiento en los experimentos realizados con proporciones iniciales similares de los dos sustratos empleados. Para *Pichia stipitis* este valor corresponde al cultivo realizado exclusivamente con xilosa.

Cuando en el medio de cultivo la concentración inicial de glucosa y xilosa es cero, el menor valor de μ_m se obtienen en *Candida shehatae* ($0,19 \text{ h}^{-1}$), mientras que en *Pachysolen* y *Pichia* la velocidad específica máxima de crecimiento es de $0,26$ y $0,33 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

5.6.2 Productividades en biomasa

También en este parámetro los valores más elevados se han determinado en *Pichia stipitis* en las tres series realizadas.

Para cada levadura, nuevamente en la serie de aireación se han obtenido las mayores productividades. En general, para los cuatro microorganismos se produce un aumento de los valores de b con el nivel de aireación suministrado, si bien, en *Candida shehatae* el valor más elevado corresponde a $Q=0,075$ v/v/min.

Por otra parte, no existe influencia significativa del pH inicial del medio de cultivo sobre este parámetro tanto para *Hansenula polymorpha* como para *Pachysolen tannophilus*; sin embargo, en *Candida* se detecta un aumento de b con el pH inicial, mientras que para *Pichia* los valores son mayores en el intervalo central considerado.

Finalmente, el aumento de la proporción inicial de glucosa en el medio de cultivo produce incrementos de este parámetro en *Pichia* mientras que para *Pachysolen* y *Candida* el valor máximo encontrado corresponde a $20 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ de xilosa y $5 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ de glucosa.

5.6.3 Velocidades específicas de consumo de sustrato

Se han encontrado notables diferencias entre las levaduras con respecto a la velocidad específica de consumo de sustrato. Los mayores valores, proporcionados en todas las series por *Candida*, son muy superiores a los obtenidos en *Hansenula*, en la que se detectan los menores valores de este parámetro.

En *Pachysolen* q_s^D permanece prácticamente constante en el transcurso del experimento. En *Hansenula* este parámetro disminuye a partir de las primeras horas del experimento, mientras que en *Candida* y en *Pichia* q_s^D suele tener su valor máximo alrededor de las 10 h, disminuyendo posteriormente hasta que el sustrato ha sido consumido en su totalidad.

Para la serie de aireación, q_s^D disminuye por lo general cuando aumenta el caudal de aire para *Hansenula polymorpha* y *Candida shehatae*, mientras que no se observa tendencia definida en las dos levaduras restantes.

En el intervalo central de pH inicial (3,5 a 5,5) se obtienen, en general, las mayores velocidades.

Por último, en las tres levaduras en que se ha estudiado la influencia de la composición del medio de cultivo, se observa que la velocidad específica de consumo de sustrato aumenta a medida que lo hace la proporción de glucosa.

5.6.4 Rendimientos en biomasa

En general, *Hansenula* produce los mayores rendimientos en biomasa, excepto en la serie de aireación, que lo hace *Pachysolen*.

En todos los casos se ha detectado que el aumento del nivel de aireación provoca incrementos de los rendimientos.

En cuanto al pH, los menores valores de $Y_{x/s}^G$ se obtienen a $pH_i=4,5$, excepto para *Hansenula*, en que resulta a 5,5.

Finalmente, el aumento de la proporción inicial de glucosa en el medio de cultivo produce incrementos de este parámetro, obteniéndose con *Pichia* un valor máximo de $Y_{x/s}^G = 0,19 \text{ Kg} \cdot \text{Kg}^{-1}$.

5.6.5 Velocidades específicas de producción de etanol

Los mayores valores de la velocidad específica de producción de etanol se han obtenido, en las tres series experimentales, para *Candida*. En *Hansenula* resultan valores considerablemente inferiores a los de las restantes levaduras. En *Pachysolen*

los valores de q_E son del orden de 10 veces menores que en *Candida* (Tabla 5.55).

En *Pachysolen*, q_E^D permanece prácticamente constante en el transcurso del experimento. En *Hansenula*, este parámetro disminuye desde el inicio de la fermentación, mientras que en *Candida* y en *Pichia*, esta disminución de q_E^D se manifiesta a partir de las 10 h del comienzo del cultivo. Alrededor de este tiempo se alcanzan las máximas velocidades específicas de producción de etanol.

En general, el aumento del caudal de aire provoca disminuciones en la velocidad específica de producción de etanol.

Los valores de pH más favorables coinciden con el experimento base (4,5) excepto para *Hansenula* en que se detecta a $pH_i=5,5$.

Por último, el empleo de glucosa junto a xilosa en el medio de cultivo incrementa apreciablemente los valores de este parámetro. La proporción más conveniente parece encontrarse en concentraciones parecidas de ambos azúcares.

5.6.6 Rendimientos en etanol y xilitol

Los valores más elevados del rendimiento en etanol corresponden a *Candida shehatae* en las series de aireación y pH inicial y a *Pichia stipitis* cuando se utilizan glucosa y xilosa conjuntamente como sustratos.

Por otra parte, *Hansenula polymorpha* proporciona valores sensiblemente inferiores de este parámetro, mientras que los correspondientes del rendimiento medio en xilitol son muy superiores a los de las restantes levaduras. Los valores de $\bar{Y}_{Xi/s}$ más bajos se obtienen con *Pichia* y son del orden de $0,005 \text{ Kg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ en las series de aireación y de pH, y del orden de $0,001-0,003 \text{ Kg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ en la serie de mezclas de sustratos.

Por lo general, un aumento del caudal de aire produce disminuciones en los rendimientos en etanol y xilitol, salvo para *Pichia stipitis* en que un pequeño aporte

parece estimular la conversión del sustrato en etanol y para *Candida shehatae* en que el rendimiento en xilitol aumenta con la aireación, en detrimento del rendimiento en xilitol.

El pH inicial 4,5 proporciona los valores más elevados del rendimiento en etanol, con excepción de *Hansenula* en la que $Y_{E/s}$ es máximo a $pH_i=5,5$.

Finalmente, la proporción de glucosa junto a xilosa en el medio de cultivo no modifica sustancialmente los valores del rendimiento en etanol.

En la Tabla 5.55 se muestran los valores de los parámetros de terminados para las cuatro levaduras correspondientes al experimento base de cada una de ellas.

TABLA 5.55

Resumen de los parámetros cinéticos y de rendimientos

Parámetro	<i>H. polymorpha</i>	<i>P. tannophilus</i>	<i>C. shehatae</i>	<i>P. stipitis</i>
μ_m	0,409	0,260	0,329	0,554
b	0,0083	0,023	0,0388	0,0743
q_s^D	--	0,29	2,0	0,86
$Y_{x/s}^G$	0,12	0,094	0,052	0,077
q_E^D	0,0032	0,067	0,57	0,37
$Y_{E/s}^G$	0,0035	0,42	0,38	0,37
$\bar{Y}_{Xi/s}$	0,58	--	0,076	0,0062

parece existir la conversión del azúcar en etanol y para Cuidado estadístico en que el rendimiento en alcohol aumenta con la elevación, en detrimento del rendimiento en xilitol.

El pH inicial 4,2 proporciona los valores más elevados del rendimiento en etanol, con excepción de Y_{XB} en la que Y_{XB} es máximo a pH=5,7.

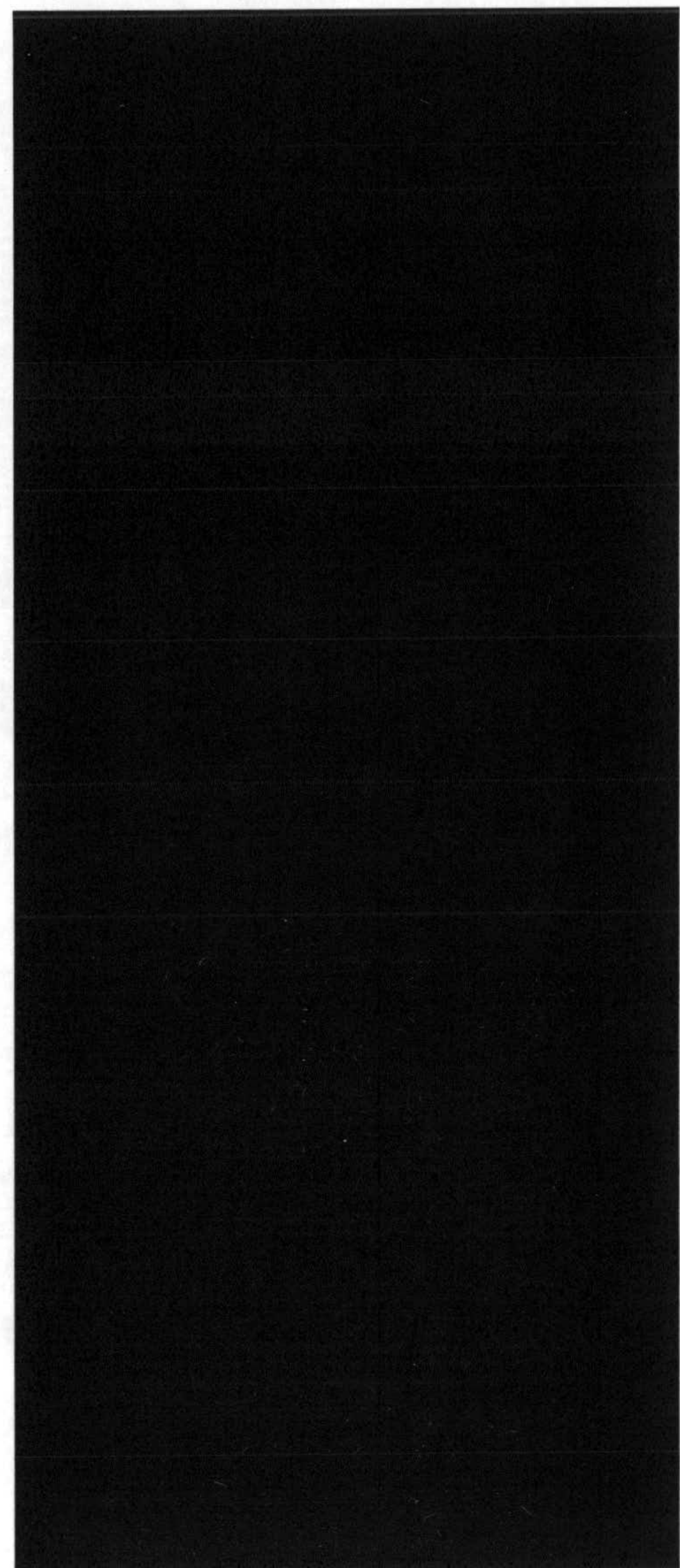
Finalmente, la proporción de glucosa junto a xilosa en el medio de cultivo no modifica sustancialmente los valores del rendimiento en etanol.

En la Tabla 2.22 se muestran los valores de los parámetros de terminados para las cuatro levaduras correspondientes al experimento base de cada una de ellas.

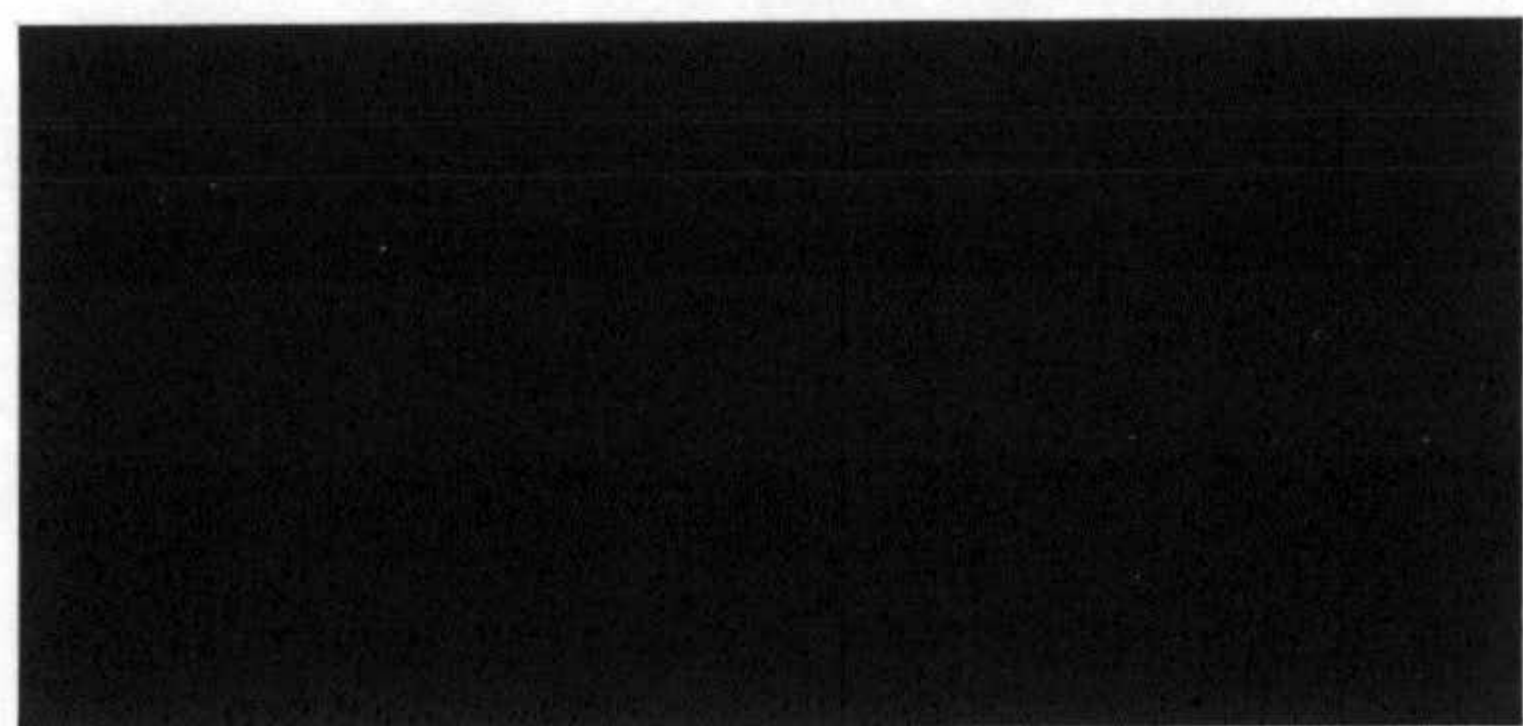
TABLA 2.22

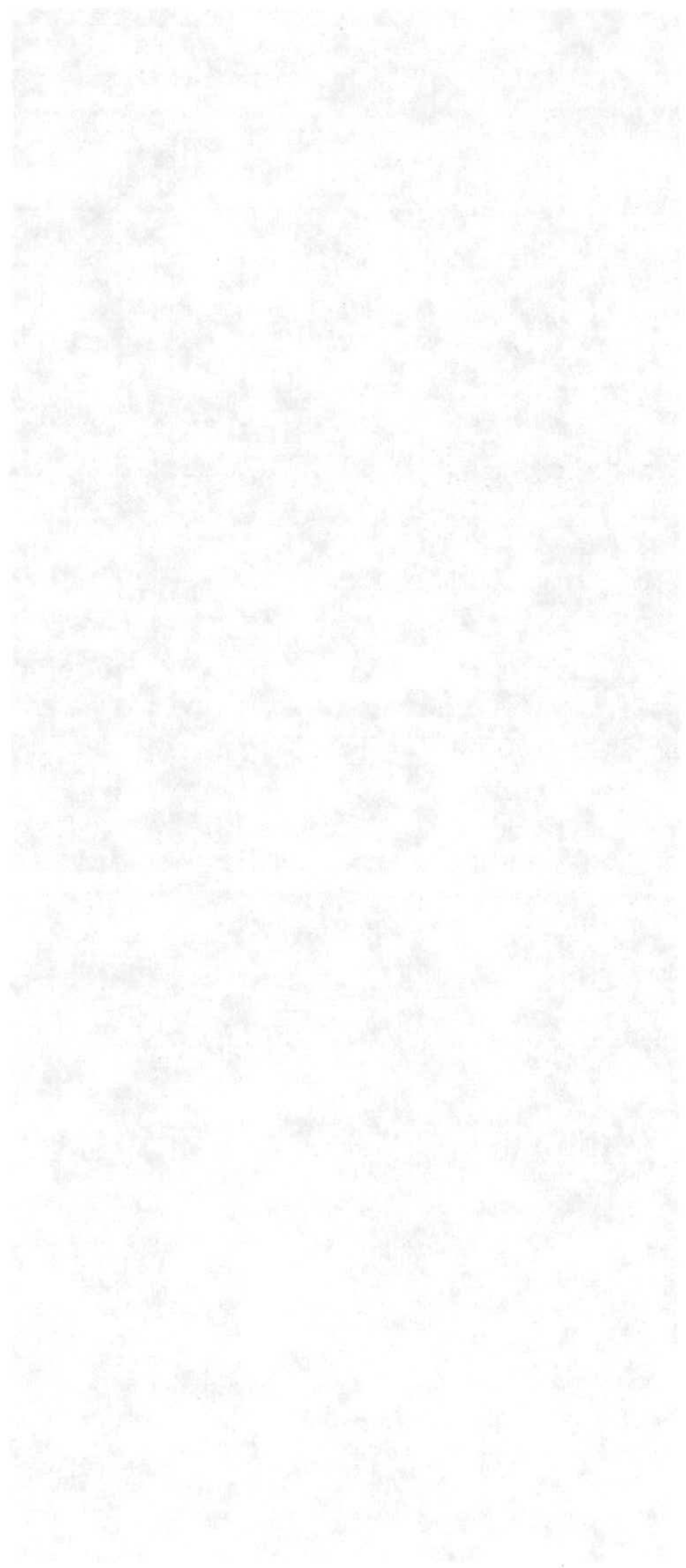
Valores de los parámetros cinéticos y de rendimiento

Parámetro	Levadura S_{10}	Levadura S_{11}	Levadura S_{12}	Levadura S_{13}
Y_{XB}	0,58	0,58	0,58	0,58
Y_{BE}	0,032	0,42	0,38	0,37
D_p	0,092	0,03	0,37	0,37
Y_{XA}	0,12	0,04	0,022	0,077
D_p	—	0,29	0,0	0,88
h	0,0083	0,021	0,0788	0,0743
A	0,403	0,210	0,329	0,224



6. CONCLUSIONES





Como resultado de la investigación de que se da cuenta en esta Memoria se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1^a El crecimiento exponencial en las cuatro levaduras con D-xilosa como sustrato es de escasa duración, siendo algo más amplio en *Pichia stipitis*. Las velocidades específicas máximas de crecimiento, μ_m , son superiores en *Pichia* si se comparan con las restantes levaduras; el valor de μ_m más elevado igual a $0,67 \text{ h}^{-1}$ se obtiene con los mayores caudales de aire ensayados. Los valores más reducidos de μ_m corresponden a *Pachysolen tannophilus*.
 - Cuando se eleva el nivel de aireación, la velocidad específica máxima de crecimiento aumenta en *Pichia* y *Pachysolen*; en *Hansenula polymorpha* no se observa ninguna influencia, mientras que en *Candida shehatae*, con la máxima aireación ensayada, $0,3 \text{ v/v/min}$, el valor de μ_m es el mínimo de la serie.
 - En cuanto al pH inicial, se observa, en las cuatro levaduras, que μ_m es máximo en los valores centrales del intervalo estudiado (1,5 a 6,5), resultando que en *Hansenula*, *Pachysolen* y *Candida* el pH_i que da lugar a un valor más elevado de μ_m es 4,5, mientras que en *Pichia* es 6,5.
 - Al modificar la proporción inicial de D-xilosa y D-glucosa, manteniendo la concentración total en $25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$, se detecta que los valores de μ_m en *Pachysolen* son superiores al que resulta si el sustrato es exclusivamente D-glucosa, aunque la concentración de D-glucosa en mezclas de sustrato parece ejercer un efecto favorable sobre la velocidad de crecimiento de esta levadura. Sin embargo, en *Pichia* y *Candida*, los valores de μ_m obtenidos si el sustrato es una mezcla de azúcares son inferiores a cuando sólo se utiliza D-glucosa.

2^a Con las cuatro levaduras se ha observado la existencia de un período de crecimiento lineal, atribuible en parte a que el crecimiento celular llega a estar limitado por la transferencia de oxígeno en la suspensión de células. Se detecta que esta limitación es de mayor duración en *Hansenula* y menor en *Pichia*, siendo los valores de la productividad en biomasa, b , parámetro característico de este período lineal, menores en la primera levadura que en la segunda.

- En *Pichia* y *Hansenula* los valores de b aumentan con el caudal de aire suministrado, mientras que en *Pachysolen* y en *Candida*, aunque b es mínimo cuando sólo se aporta el aire que se incorpora por el vórtice de agitación, se observa que a partir de $Q=0,075$ v/v/min permanece prácticamente constante.

- El pH inicial no presenta influencia significativa sobre el parámetro b de las cuatro levaduras ensayadas, al menos en el intervalo de 2,5 a 5,5. No obstante, a $pH_i=6,5$ en *Candida* se alcanza el valor más alto, $b=0,044$ Kg·Kg⁻¹·h⁻¹, para esta levadura, mientras que en *Pachysolen* se obtiene el mínimo, $b=0,014$ Kg·Kg⁻¹·h⁻¹.

- Cuando el sustrato es una disolución mezcla de xilosa y glucosa no se observa este período de crecimiento lineal en *Pachysolen* ni en *Candida* si la concentración de glucosa en la disolución es elevada. Sin embargo, en *Pichia* los valores más elevados de b en esta serie, igual a $0,279$ Kg·Kg⁻¹·h⁻¹, se obtienen a altas concentraciones de glucosa en la mezcla.

3^a Las velocidades específicas de consumo de sustrato, q_s , más elevadas se han encontrado en *Candida* y en *Pichia*. En estas dos levaduras y en *Pachysolen*, q_s disminuye con el tiempo a partir de un valor máximo que, en general, se puede encontrar en el intervalo 10-20 h del experimento; en *Hansenula* la disminución de q_s tiene lugar desde prácticamente el inicio del cultivo.

- En las cuatro levaduras se observa que con niveles de aireación elevados, q_s es más reducido fundamentalmente a tiempos altos.

- En el intervalo de pH_i 3,5-5,5 se encuentran los mayores valores de q_s para las levaduras *Candida*, *Pichia* y *Hansenula*; en *Pachysolen* los valores más elevados se alcanzan a $\text{pH}_i=2,5$, obteniéndose en este experimento, para $t=50$ h, un valor de $q_s=0,44$ (Kg xilosa)·(Kg biomasa)⁻¹·h⁻¹.
 - Con las tres levaduras en las que se han utilizado mezclas de D-glucosa y D-xilosa como sustrato, se ha puesto de manifiesto que hay un consumo sucesivo de ambos azúcares, asimilándose en primer lugar D-glucosa y posteriormente D-xilosa. Los valores más altos determinados de q_s se encuentran en los experimentos de mayor concentración inicial de D-glucosa; la disminución con el aumento de la concentración inicial de D-xilosa es más acusada en *Pachysolen*.
- 4^a En las cuatro levaduras el rendimiento global en biomasa, $Y_{x/s}^G$, aumenta con el caudal de aire suministrado, alcanzándose los valores más elevados en *Hansenula* y *Pachysolen*, donde se obtienen valores próximos a $0,3$ (Kg biomasa)·(Kg xilosa)⁻¹ en el cultivo de $Q=0,3$ v/v/min.
- Cuando se modifica el pH inicial del experimento, los rendimientos más bajos se obtienen a $\text{pH}_i=5,5$ en *Hansenula* ($Y_{x/s}^G=0,12$ Kg·Kg⁻¹) y a $\text{pH}_i=4,5$ en *Pachysolen* ($0,094$ Kg·Kg⁻¹), *Pichia* ($0,077$ Kg·Kg⁻¹) y *Candida* ($0,036$ Kg·Kg⁻¹), mientras que es a $\text{pH}_i=6,5$ cuando las cuatro levaduras presentan el máximo rendimiento.
 - Al utilizar como sustrato una mezcla de D-xilosa y D-glucosa, el valor de $Y_{x/s}^G$ en *Candida* y *Pichia* aumenta conforme la concentración de D-glucosa inicial es más alta, alcanzándose el máximo valor del rendimiento en el experimento donde el sustrato es exclusivamente D-glucosa. En *Pachysolen* no se observa influencia de la proporción xilosa/glucosa en el rendimiento global en biomasa, sólo se detecta una leve disminución al usar exclusivamente D-xilosa.

5^a En *Hansenula*, *Candida* y *Pichia*, la velocidad específica de formación de etanol, q_E , disminuye en el transcurso del experimento, observándose que en *Candida* y *Pichia* esta disminución tiene lugar a partir de tiempos próximos a las 20 h. La disminución en ambas levaduras, tanto en q_E como en q_s , está causada, en parte, por la acumulación de etanol en el medio de cultivo, el cual parece ejercer un efecto inhibitorio sobre ambas velocidades. En *Hansenula*, los valores de q_E son muy inferiores a las tres restantes levaduras y su disminución se inicia al comienzo del experimento. Sin embargo, en *Pachysolen* q_E permanece prácticamente constante durante el período de crecimiento lineal.

- En *Pachysolen*, *Candida* y *Pichia* el valor de q_E más elevado se obtiene al mínimo nivel de aireación ($Q=0,0$ v/v/min); en *Hansenula* no se observa tendencia definida, detectándose un leve aumento para $Q=0,3$ v/v/min.

- Cuando se modifica el pH inicial, las velocidades específicas máximas de producción de etanol para *Pachysolen*, *Candida* y *Pichia* se obtienen en el intervalo 3,5-4,5; en *Hansenula* el valor más alto se alcanza a $pH_i=5,5$.

- Con mezclas de D-xilosa y D-glucosa como sustrato se detecta que el valor de q_E en *Pachysolen* aumenta considerablemente si en el medio de cultivo hay D-glucosa, observándose que cuando la levadura consume este sustrato se alcanzan valores de $q_E=0,7$ Kg·Kg⁻¹·h⁻¹, mientras que en D-xilosa q_E se reduce a 0,06 Kg·Kg⁻¹·h⁻¹. También en *Candida* y *Pichia* las mayores velocidades específicas de formación de etanol se alcanzan, en general, si sólo se emplea D-glucosa como sustrato, sin embargo existe bastante menos diferencia que la observada en *Pachysolen*.

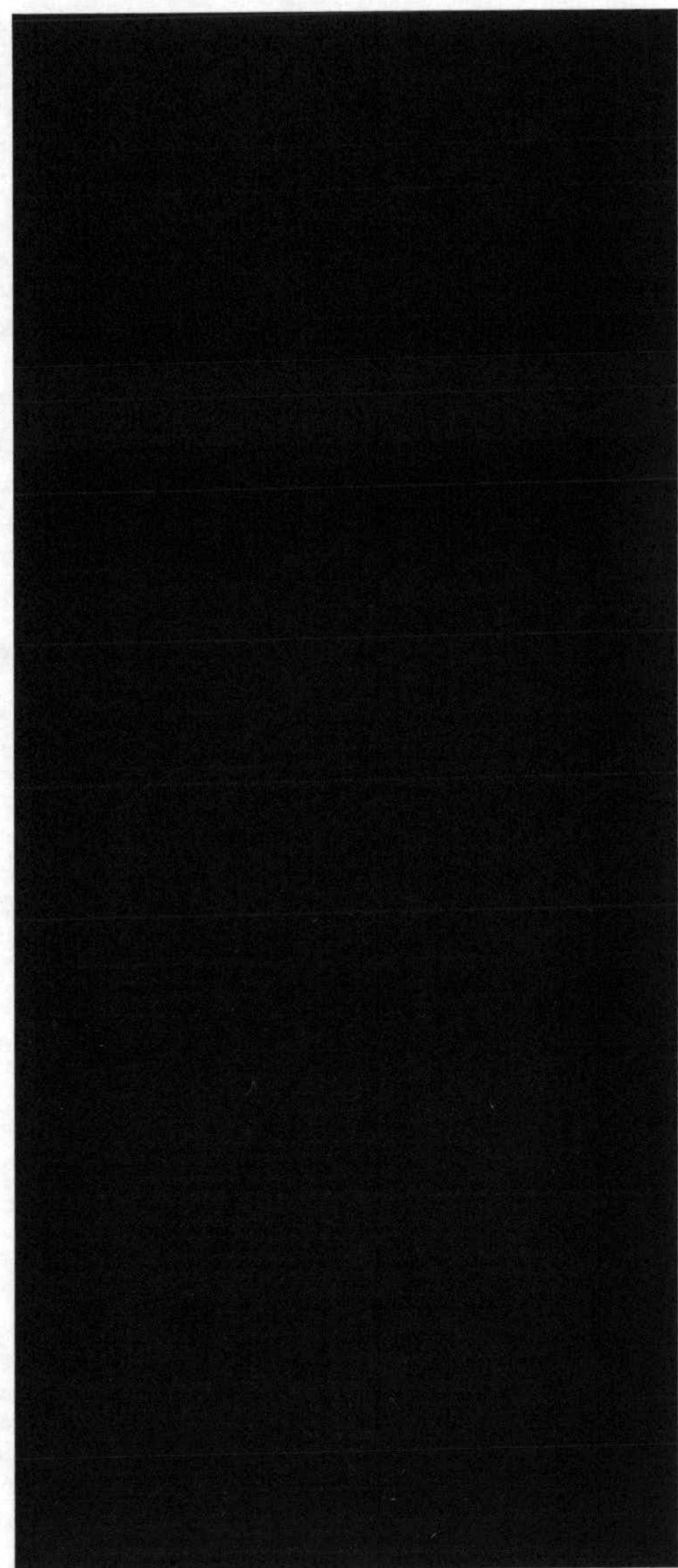
6^a Con respecto a las restantes levaduras, *Hansenula* se caracteriza por una producción alta en xilitol y baja en etanol. En esta levadura se alcanza un rendimiento medio en xilitol, $\bar{Y}_{Xi/s}$, de 0,64 (Kg xilitol)·(Kg xilosa)⁻¹ cuando $pH_i=5,5$ y $Q=0,0$ v/v/min. Los valores de $\bar{Y}_{Xi/s}$ más reducidos se obtienen en *Pichia* y son inferiores en todos los casos a 0,03 Kg·Kg⁻¹.

- Se ha observado que el rendimiento en xilitol disminuye con el valor de Q en *Hansenula* y *Pichia* y aumenta levemente en *Candida*.
 - En *Candida* los valores de $\bar{Y}_{Xi/s}$ disminuyen con el pH_i , mientras que en *Pichia* se detecta un aumento; en *Hansenula* los valores más elevados se observan a pH_i 4,5 y 5,5.
 - Cuando el sustrato utilizado es una mezcla de D-xilosa y D-glucosa, el rendimiento en xilitol en *Candida* disminuye conforme aumenta la concentración de D-glucosa, no detectándose xilitol en los experimentos de alta concentración inicial de este sustrato ($g_o=24$ y $25 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$). Sin embargo, en *Pichia* los mayores valores se alcanzan a concentraciones iniciales medias de ambos azúcares y en *Pachysolen* para una alta concentración inicial de D-glucosa ($g_o=24$ y $s_o=1 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$) se obtiene un rendimiento elevado $\bar{Y}_{Xi/s} = 0,22 \text{ Kg}\cdot\text{Kg}^{-1}$.
- 7^a El rendimiento global en etanol, $Y_{E/s}^G$, en *Pachysolen*, *Candida* y *Pichia*, en las condiciones más favorables para estas levaduras, alcanza valores algo superiores a $0,4 (\text{Kg etanol})\cdot(\text{Kg sustrato})^{-1}$. Sin embargo, en *Hansenula* este rendimiento es muy reducido y el máximo valor encontrado ha sido inferior a $0,02 \text{ Kg}\cdot\text{Kg}^{-1}$.
- En *Pachysolen*, *Candida* y *Hansenula* los valores de $Y_{E/s}^G$ disminuyen con el caudal de aire suministrado, mientras que *Pichia* parece requerir un cierto caudal de aire para alcanzar la máxima producción de etanol, ya que el rendimiento más alto se obtiene para $Q=0,075 \text{ v/v/min}$.
 - Cuando se modifica el pH_i , manteniendo el mínimo nivel de aireación, se observa que el rendimiento más alto se determina en los experimentos de $pH_i=4,5$ en las levaduras *Pachysolen*, *Candida* y *Pichia*, mientras que en *Hansenula* tiene lugar a $pH_i=5,5$.

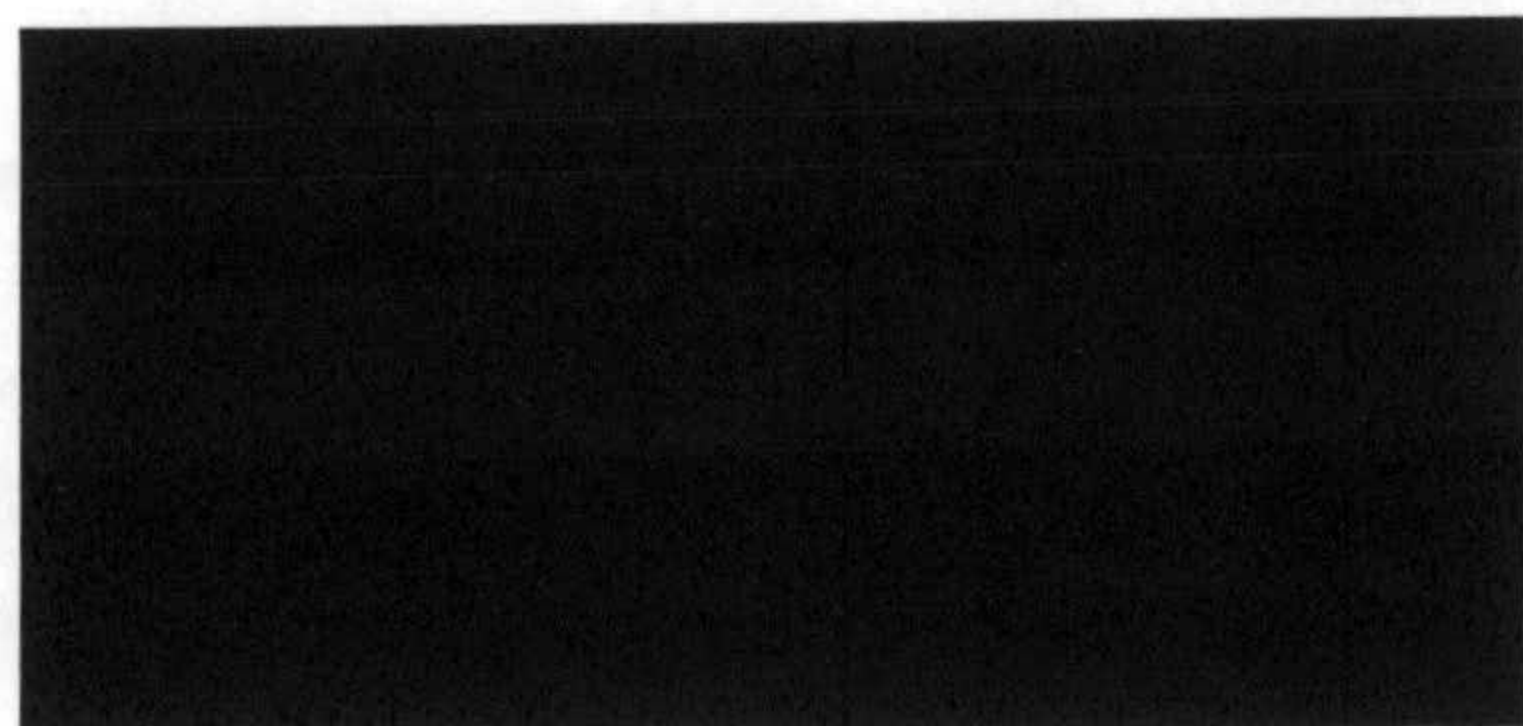
- En *Pachysolen* y *Candida* y en los experimentos con mezclas de sustratos, los valores de $Y_{E/s}^G$ son inferiores a cuando se utiliza exclusivamente D-xilosa o D-glucosa, siendo más acusada en la primera de las levaduras. En *Pichia* los máximos rendimientos se alcanzan con concentraciones elevadas de D-glucosa.

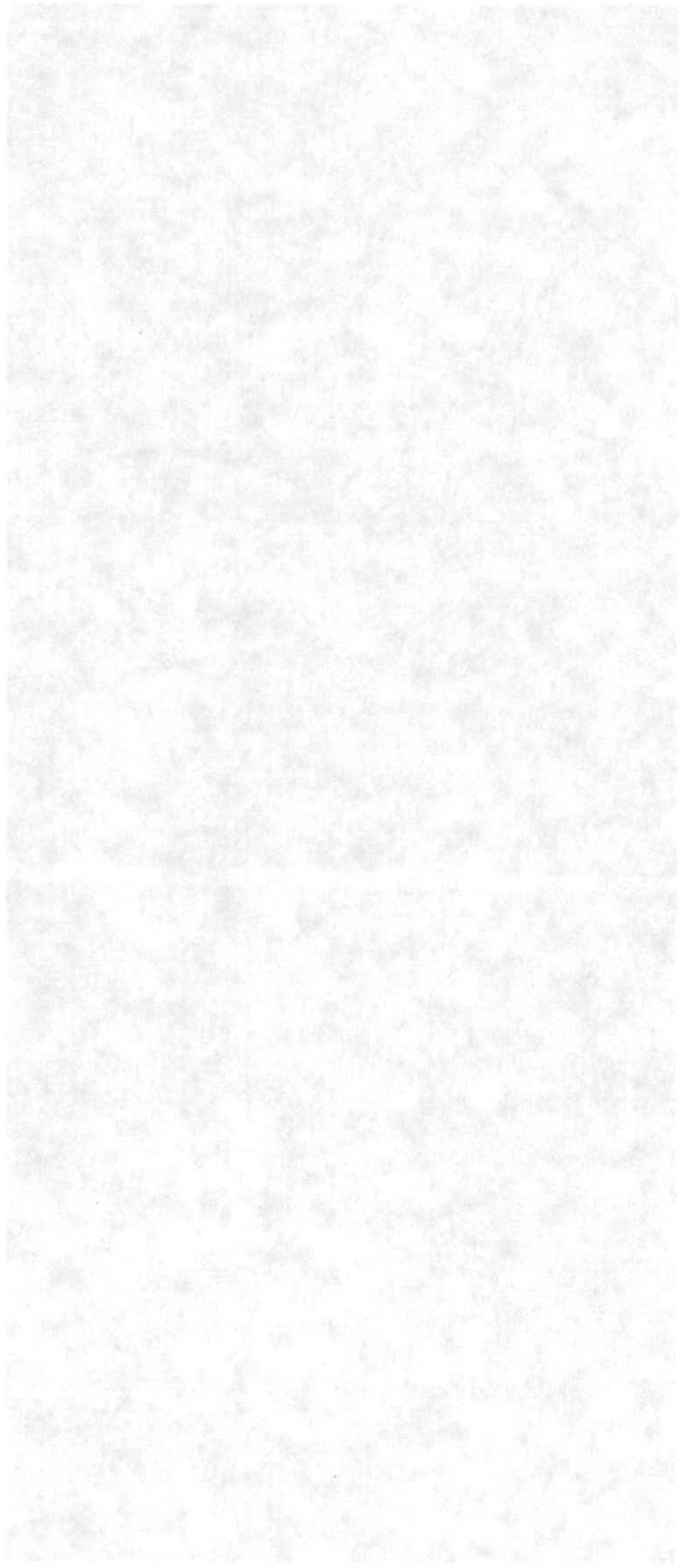
8^a De los valores de los parámetros obtenidos se deduce que *Hansenula polymorpha* puede ser muy apropiada en la fermentación de disoluciones de D-xilosa con vistas a la producción de xilitol. Para este objetivo, las condiciones de operación más favorables serían un pH inicial entre 4,5 y 5,5 y un caudal de aire equivalente al incorporado por el propio vórtice de agitación.

- En la fermentación de D-xilosa o mezclas D-xilosa/D-glucosa con el fin de producir bioetanol, *Candida shehatae* y *Pichia stipitis* son levaduras que presentan valores elevados de q_E e $Y_{E/s}^G$, resultando que las condiciones más favorables corresponderían a un $pH_i=4,5$ para ambas levaduras, siendo suficiente en *Candida* la aireación provocada por el vórtice de agitación, mientras que en *Pichia* sería más adecuado un valor del nivel de aireación entre 0 y 0,075 v/v/min.



7. NOMENCLATURA





a	Parámetro de la ecuación [4.3].
A ₁	Absorbancia de la disolución referencia en la determinación del etanol, medida a 340 nm.
A ₁ '	Absorbancia inicial, antes de comenzar la reacción, en la determinación del xilitol, medida a 492 nm.
A ₂	Absorbancia de la muestra problema en la determinación del etanol, medida a 340 nm.
A ₂ '	Absorbancia final, una vez transcurrida la reacción, en la determinación del xilitol, medida a 492 nm.
A ₃₄₀	Absorbancia a 340 nm.
A ₄₉₂	Absorbancia a 492 nm.
A ₆₂₀	Absorbancia a 620 nm.
A ₆₄₀	Absorbancia a 640 nm.
ADH	Enzima alcohol deshidrogenasa.
AI-DH	Enzima aldehído deshidrogenasa.
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville (Estados Unidos).
ATP	Adenosin trifosfato.
b	Parámetro de la ecuación [4.4].
c	Parámetro de la ecuación [4.4].

CBS	Central Bureau voor Schimmelculture, Bearn (Holanda).
CSIR	Council for Scientific and Industrial Research, Pretoria (Sudáfrica).
d	Paso de luz de la cubeta del espectrofotómetro, cm.
dE/dt	Velocidad de producción de etanol por unidad de volumen, (Kg etanol) · m ⁻³ · h ⁻¹ .
DNS	Reactivo dinitrosalicílico.
d(s ₀ -s)/dt	Tasa volumétrica de consumo de xilosa, (Kg etanol) · m ⁻³ · h ⁻¹ .
e	Parámetro de la ecuación [4.15].
E	Concentración de etanol, Kg · m ⁻³ .
E _T	Concentración teórica máxima alcanzable de etanol, Kg · m ⁻³ .
f	Parámetro de la ecuación [4.15].
F	Factor de dilución.
HMF	Hidroximetilfurfural.
INT	Cloruro de iodotetrazolio.
M _w	Peso molecular del etanol.
M' _w	Peso molecular del xilitol.
NAD	Dinucleótido nicotinamida-adenina, forma oxidada.
NADH	Dinucleótido nicotinamida-adenina, forma reducida.

NADP	Dinucleótido nicotinamida-adenina fosfato, forma oxidada.
NADPH	Dinucleótido nicotinamida-adenina fosfato, forma reducida.
NPK	Nitrógeno, fósforo, potasio.
pH _i	pH al comienzo del experimento.
q _E	Velocidad específica de producción de etanol, (Kg etanol) · (Kg biomasa) ⁻¹ · h ⁻¹ .
q _E ^D	Velocidad específica de producción de etanol, determinada usando el método diferencial, (Kg etanol) · (Kg biomasa) ⁻¹ · h ⁻¹ .
\bar{q}_E	Velocidad específica media de producción de etanol, (Kg etanol) · (Kg biomasa) ⁻¹ · h ⁻¹ .
\bar{q}_E^D	Velocidad específica media de producción de etanol, determinada usando el método diferencial, (Kg etanol) · (Kg biomasa) ⁻¹ · h ⁻¹ .
q _s	Velocidad específica de consumo de xilosa, (Kg xilosa) · (Kg biomasa) ⁻¹ · h ⁻¹ .
q _s ^D	Velocidad específica de consumo de xilosa, determinada usando el método diferencial, (Kg xilosa) · (Kg biomasa) ⁻¹ · h ⁻¹ .
Q	Caudal de aire, v/v/min.
r ²	Coeficiente de regresión lineal.
s	Concentración de xilosa, Kg · m ⁻³ .
s _o	Concentración inicial de xilosa, Kg · m ⁻³ .
s _T	Concentración de sustrato total, Kg · m ⁻³ .

s_{oT}	Concentración inicial de sustrato total, $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$.
SDH	Enzima polioliol deshidrogenasa.
t	Tiempo, h.
t^a	Temperatura, $^{\circ}\text{C}$.
tep	Toneladas equivalentes de petróleo.
TPP	Tiaminapirofosfato
V	Volumen final en la determinación del etanol, cm^3 .
V'	Volumen final en la determinación del xilitol, cm^3 .
v	Volumen de muestra de la disolución de etanol, cm^3 .
v'	Volumen de muestra de la disolución de xilitol, cm^3 .
x	Concentración de biomasa, $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$.
x_0	Concentración inicial de biomasa, $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$.
x_1	Concentración de biomasa al comienzo de la fase de crecimiento exponencial, $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$.
X_i	Concentración de xilitol, $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$.
$Y_{E/s}$	Rendimiento instantáneo en etanol, $(\text{Kg etanol}) \cdot (\text{Kg xilosa})^{-1}$.
$Y_{E/s}^G$	Rendimiento global en etanol, $(\text{Kg etanol}) \cdot (\text{Kg xilosa})^{-1}$.
$Y_{E/x}$	Productividad instantánea en etanol, $(\text{Kg etanol}) \cdot (\text{Kg biomasa})^{-1}$.

$Y_{x/s}$	Rendimiento instantáneo en biomasa (Kg biomasa) \cdot (Kg xilosa) ⁻¹ .
$Y_{x/s}^G$	Rendimiento global en biomasa, (Kg biomasa) \cdot (Kg xilosa) ⁻¹ .
$Y_{Xi/s}$	Rendimiento instantáneo en xilitol, (Kg xilitol) \cdot (Kg xilosa) ⁻¹ .
$\bar{Y}_{Xi/s}$	Rendimiento macroscópico en xilitol, (Kg xilitol) \cdot (Kg xilosa) ⁻¹ .

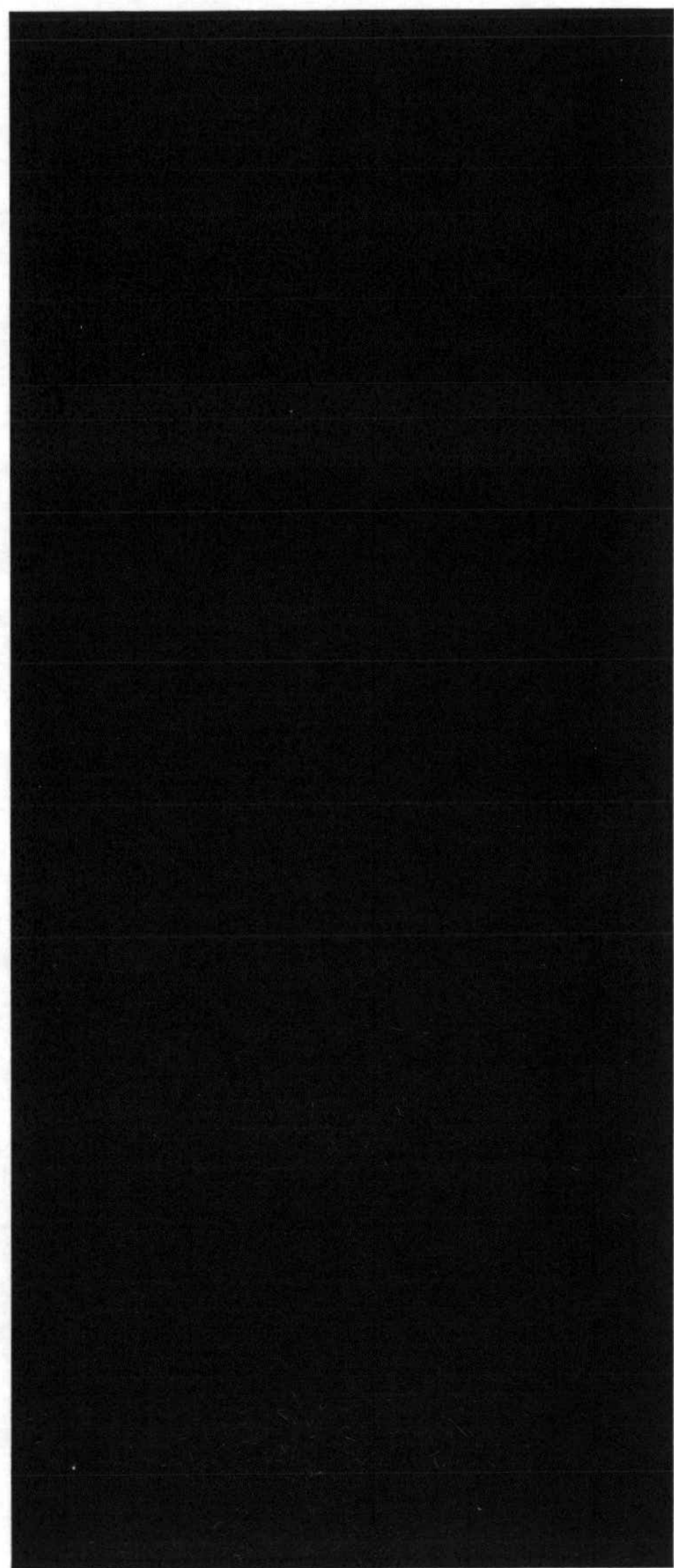
LETRAS GRIEGAS

α	Parámetro de la ecuación [4.10].
β	Parámetro de la ecuación [4.10].
ΔA	Diferencia entre las absorbancias de la muestra problema y la referencia en el método de determinación del etanol.
$\Delta A'$	Diferencia entre las absorbancias iniciales y finales en el método de determinación del xilitol.
Δh	Diferencia de altura manométrica, cm.
ϵ	Coeficiente de absorción del NADH a 340 nm, L \cdot mMol ⁻¹ \cdot cm ⁻¹ .
ϵ'	Coeficiente de absorción del INT-Formazan a 492 nm, L \cdot mMol ⁻¹ \cdot cm ⁻¹ .
μ	Velocidad específica de crecimiento, h ⁻¹ .
μ_m	Velocidad específica máxima de crecimiento, h ⁻¹ .

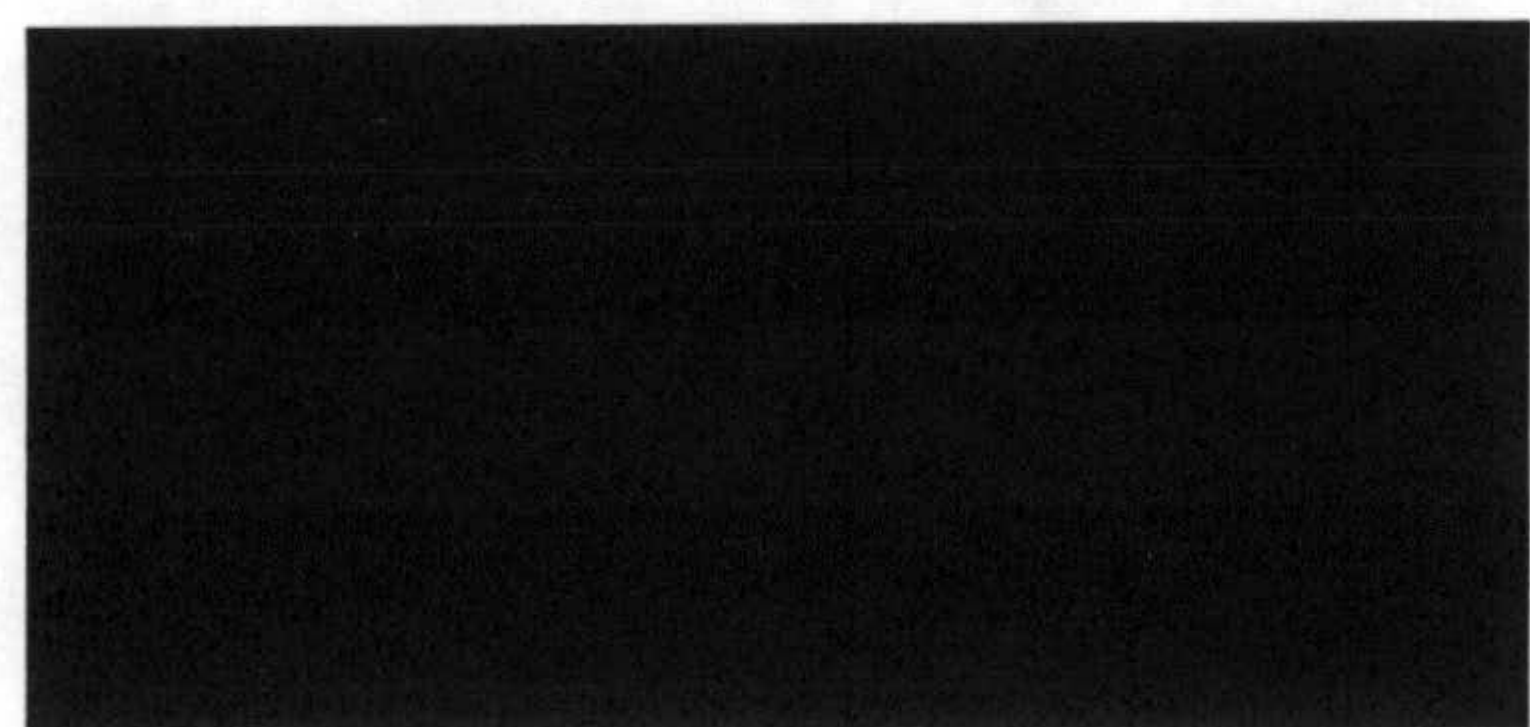
Y ₁₂	Rendimiento instantáneo en biomasa (Kg biomasa) · (Kg xilosa) ⁻¹
Y ₁₃	Rendimiento global en biomasa (Kg biomasa) · (Kg xilosa) ⁻¹
Y ₂₂	Rendimiento instantáneo en xilosa (Kg xilosa) · (Kg xilosa) ⁻¹
Y ₂₃	Rendimiento macroscópico en xilosa (Kg xilosa) · (Kg xilosa) ⁻¹

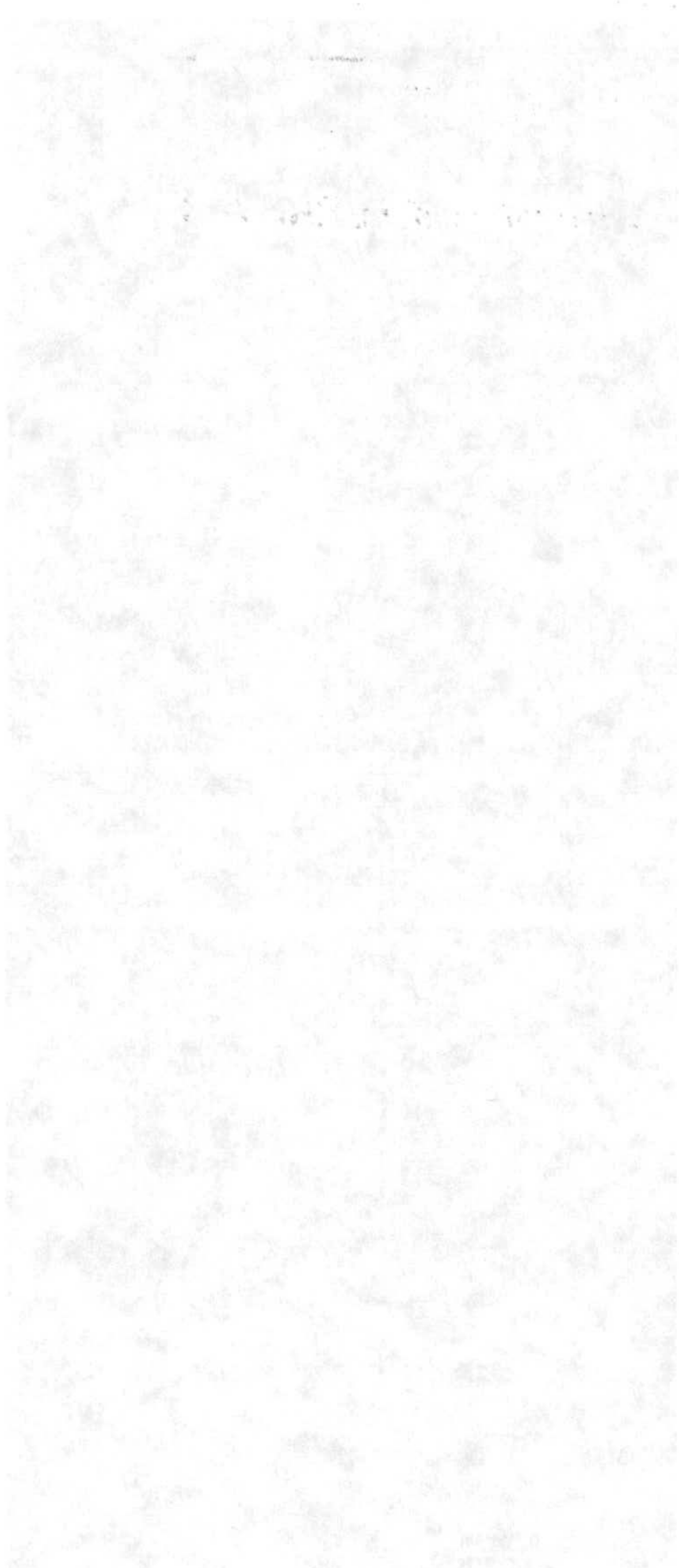
LETAS GELIAS

α	Parámetro de la ecuación (4.10)
β	Parámetro de la ecuación (4.10)
ΔA	Diferencia entre las absorbancias de la muestra problema y la referencia en el método de determinación del etanol
ΔA'	Diferencia entre las absorbancias iniciales y finales en el método de determinación del etanol
ΔH	Diferencia de altura manométrica en
ε	Coefficiente de absorción del NADH a 340 nm L · mol ⁻¹ · cm ⁻¹
ε'	Coefficiente de absorción del NAD ⁺ a 492 nm L · mol ⁻¹ · cm ⁻¹
h	Velocidad específica de crecimiento, h ⁻¹
h _m	Velocidad específica máxima de crecimiento, h ⁻¹



8. BIBLIOGRAFÍA





26 MAR. 1993

- Alexander, M.A.; Chapman, T.W. y Jeffries, T.W.; *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 685 (1987).
- Alexander, M.A.; Young, V.W. y Jeffries, T.W.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 282 (1988).
- Alexander, M.A.; Chapman, T.W. y Jeffries, T.W.; *Appl. Environ. Microbiol.* **55** (9), 2152 (1989).
- Alexopoulos, C.J. y Mims, C.W.; *Introductory Mycology*, Wiley, Nueva York (1979).
- Amin, G.; Van den Eyde, E. y Verachter, H.; *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1 (1983).
- Anuario de Energía, *Ing. Quím.* Alción, Madrid (1990).
- Atkinson, B.; *Reactores Bioquímicos* Reverté, Barcelona (1986).
- Beck, M.J.; "Ethanol Fermentations". En: *Biomass Energy Development*, Smith, W.H. (Eds), p. 553. Plenum Press, Nueva York (1986).
- Beutler, H.O. y Michal, G.; *Z. Anal. Chem.* **284**, 113 (1977).
- Beutler, H.O. y Becker, J.; *Deutsche Lebensmittel- Rundschau* **6**, 182 (1977).
- Bolen, P.L. y Detroy, R.W.; *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 302 (1985).
- Brandt, D.; "Ethanol Production by Fermentation". En: *Progress in Biomass Conversion*, Sarkanen, K.V. y Tillman, D.A., (Eds), p. 357, Academic Press, Nueva York (1975).
- Bravo Rodríguez, V.; Camacho Rubio, F.; Sánchez Villasclaras, S. y Castro Galiano, E.; "Ethanol Fermentation of Xylose Solutions with *Pachysolen tannophilus*: Importance of the Addition of Yeast Extract." En: *Biomass for Energy and Industry* Vol. 2, G. Grassi, G. Gossi, G. dos Santos (Eds), p. 2293, Elsevier Applied Science, Londres (1990).
- Bridgewater, A.V.; "Biomass Pyrolysis Technologies." En: *Biomass for Energy and Industry (5TH European Conference)*. Vol. 2, Conversion and Utilisation of Biomass; G. Grassi, G. Gossi, G. dos Santos (Eds) p. 2489-2496, Elsevier Applied Science, Londres (1990).

- Bruinenberg, P.M.; de Bot P.H.M.; Van Dyken, J.P. y Scheffers, W.A.; *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 287 (1983).
- Bruinenberg, P.M.; de Bot P.H.M.; Van Dyken, J.P. y Scheffers, W.A.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 256 (1984).
- Camacho Rubio, F.; González Tello, P.; Jurado Alameda, E. y Páez Dueñas, M. P.; *Ing. Quím.* **200**, 297 (1985).
- Camacho Rubio, F.; González Tello, P.; Jurado Alameda, E. y Páez Dueñas, M. P.; *Ing. Quím.* **203**, 117 (1986).
- Camacho Rubio, F.; Bravo Rodríguez, V.; Sánchez Villasclaras, S. y Castro Vico, M.; *Collect. Czech. Chem. Commun.* **54**, 1244 (1989).
- Carrasco, G.J.E.; Martínez, G.J.M.; Fernández, G.J.; VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias (ACTAS) IV, p. 241, Murcia (1985).
- Carrasco, G.J.E. y Sáez, A.F.; VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias (Actas), IV, p. 271, Murcia (1985).
- Castro Galiano, E.; "Fermentación etanólica discontinua de disoluciones de xilosa con *Pachysolen tannophilus*". Tesina de licenciatura. Universidad de Granada (1989).
- Castro Vico, M.; "Fermentación etanólica discontinua de de glucosa con *Pachysolen tannophilus*". Tesina de licenciatura. Universidad de Granada (1987).
- Collins, C.H.; "Clasificación de las Bacterias". En *Métodos Microbiológicos*, p. 23-30, Acribia, Zaragoza (1969).
- Corella, J.; Aznar, M.P.; Martínez, J.M. e Iglesias, J.I.; "Steam Gasification of Biomass in Fluidized Bed with a Secondary Catalytic Bed: III Use of Methanation Catalystics." En: *Biomass for Energy and Industry (5TH European Conference)*. Vol. 2, Conversion and Utilisation of Biomass; G. Grassi, G. Gossi, G. dos Santos (Eds) p. 2749-2754, Elsevier Applied Science, Londres (1990).
- Coulson, J.M.; Richardson, J.F.; Backhurst, J.R. y Harker, J.M.; *Ingeniería Química, Tomo II, Operaciones Básicas*, p. 264, Reverté, Barcelona (1981).

- Champagnat, A.; Vernet, C.; Laine, B. y Filosa, J.; *Nature*, **197**, 13 (1963).
- Chaparro Beltrán, M.; *Ing. Quím.* **148**, 115 (1981).
- Chaparro Beltrán, M.; Jiménez , M.T. y Vázquez , A.; *Ing. Quím.* **243**, 215 (1989).
- Chapman, V.J.; "Chemraw 1", St. Pierre, L.E. y Brown, G.R. (eds.), p.551, Pergamon Press (1978).
- Chiang, C. y Knight, S.G.; *Nature* 1960, **188**, 79 (1960).
- Chung, I.S. y Lee, Y.Y.; *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 503 (1986).
- Church, J.A. y Wooldridge, D.; *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **20**, 371 (1981).
- De Filippi, R.P. y Moses, J.M.; *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **12**, 205 (1982).
- Delgenes, J.P.; Moletta, R. y Navarro, J.M.; *Biotechnol. Lett.* **8**, 897 (1986).
- Delgenes, J.P.; Moletta, R. y Navarro, J.M.; *Journée Fermentation, INRA*, Narbonne (1987).
- Delgenes, J.P.; Moletta, R. y Navarro, J.M.; *Biotechnol. Bioeng.* **34**, 398-402 (1989).
- Dellweg, H., Rizzi, M. y Klein, C.; *J. Biotechnol.* **12**, 111-122 (1989).
- Denena, E.D. y Demain, A.L.; *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1088 (1981).
- Detroy, R.W.; Cunningham, R.L. y Herman, A.I.; *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **12**, 81 (1982).
- Du Preez, J.C. y Prior, B.A.; *Biotechnol. Lett.* **7**, 241 (1981).
- Du Preez, J.C.; Prior, B.A. y Monteiro, A.T.M.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 261 (1984).
- Du Preez, J.C.; Bosch, M. y Prior, B.A.; *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 360 (1986).

- Du Preez, J.C.; Van Driessel, B. y Prior, B.A.; *Seventh International Symposium on Yeasts*, S129 (1989a).
- Du Preez, J.C.; Van Driessel, B. y Prior, B.A.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 53 (1989b).
- Elortegui Escartín, N.; Jarabo Friedrich, F.; Pérez Domínguez, C. y Díaz Rodríguez, F.; VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias. Vol. IV. Bioenergía. (Actas del Congreso), p. 501-507, Murcia (1985).
- Fanta, G.F.; Abbott, T.P.; Herman, A.I.; Burr, R.C. y Doane, W.M.; *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1122 (1984).
- Favela Torres, E. y Baratti, J.; *J. Ferment. Technol.* **66** (2), 167 (1988).
- Fernández, G. J.; VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias (Actas), IV, p. 93, Murcia (1985).
- Fernández González, J.; *Ing. Quím.* **140**, 23 (1980).
- Gaden, E.L.; *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* **1**, 413 (1959).
- Gfeller, R.P. y Gibbs, M.; *Plant. Physiol.* **75**, 212 (1984).
- Gibbs, M.; "Fermentation". En: *Physiology and Biochemistry of Algae*, p. 91, Lewin, R.A. (Eds) Academic Press, Londres (1962).
- Girio, F.M.; Amalia, M.; Perto, P. y Amaral-Collação, M.T.; 5TH European Conference "Biomass for Energy and Industry", G. Grassi, G. Gossi, G. dos Santos (Eds) p. 15, Lisboa (1989).
- Girio, F.M.; Amalia, M.; Perto, P. y Amaral-Collação, M.T.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 199 (1989).
- Gong, C.S.; McCracken, L.D. y Tsao, T.; *Biotechnol. Lett.* **3**, 245 (1981).
- Grootjen, D.R.J., van der Lans, R.G.J.M. y Luyben, Ch.A.M.; *Enzyme Microbiol. Technol.* **12**, 20-23 (1990).

- Helt, J.E. y Agrawal, R.K.; "Liquids from Municipal Solid Waste". En *Pyrolysis Oils from Biomass*, Soltes, J. y Milne, T.A. (eds.), p.79. American Chemical Society, Washington (1988).
- Hewstock, M.E.; "Chemraw 1", St. Pierre, L.E. y Brown, G.R. (eds.), p.63, Pergamon Press (1978).
- Jagnow, G. y Dawid, W.; "Procesos Clásicos en la Industria de los Alimentos e Industrias Afines." En: *Bioteología. Introducción con experimentos modelos*, p. 6-11, Acribia, Zaragoza (1991).
- Jeffries, T.W.; *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **12**, 103 (1982).
- Jiménez Alcaide, L.; Ferrer Herranz, J.L. y González Valverde, F.; II Jornadas de Biomasa, Soria (1987).
- Jones, A.; "World Protein Resources", En: *Med. Tech. Publ.*, p. 23 (1974).
- Jones, R.P. y Greenfield, P.F.; *Enzyme Microbiol. Technol.* **4**, 210 (1982).
- Kapla, M.R.; Duby, G.A. y Pavee, P.L.; *Am. Diet. Ass.* **34**, 1317 (1958).
- Karkare, S.B.; Dean Jr. R.C. y Venkatasubramanian, K.; *Biotechnology* **3**, 247 (1985).
- Kilian, S.G. y van Uden, N.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 545 (1988).
- Kosaric, N.; Wieczorek, A.; Consentino, G.P.; Magee, R.J.; Prenesil, J.E. En: *Biotechnology* Vol. 3, Rehm, A.J.; Reed, G. y Dellweg H. (Eds), Verlag Chemie, Weinheim (1983).
- Lago Lucio, J.M. y Saldaña Rodríguez, J.A.; II Jornadas de Biomasa, Soria (1987).
- Levine, D.W. y Cooney, C.L.; *Appl. Microbiol.* **26**, 982 (1973).
- Levy-Lambert, A.; Dario, J.P.; Tricaud, P.M. y Gosset, F.; "Biomass et énergie", Inst,Nat. Agro., Paris-Grignon (1980).
- Ligthelm, M.E.; Prior, B.A. y Du Preez, J.C.; *Biotechnol. Lett.* **10** (3), 207 (1988a).

- Ligthelm, M.E.; Prior, B.A. y Du Preez, J.C.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 63 (1988b).
- Lindegren, C.C.; Nagai, S. y Nagai, H.; *Nature* **182**, 446 (1958).
- Linko, Y.Y. y col.; *Biotechnol. Lett.* **8**, 47-52 (1986).
- Lynd, L.R. y Grethlein, H.E.; *Chem. Eng. Prog.* **80/11**, 59 (1984).
- Matsumura, M. y Markl, H.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 371 (1984).
- Mc. Ginnis, G.D.; Wilson, W.W. y Mullen, C.E.; *Ind. Eng. Chem. Pro. Res. Dev.* **22**, 352 (1983).
- Miller, G. L.; *Anal. Chem.* **31** (3), 426 (1959).
- Minier, M. y Goma, G.; *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 1565 (1982).
- Montes Ramírez, M.; *Ing. Quím.* **196**, 113 (1985).
- Nelson, D.A.; Hallen, R.T. y Theander, O.; "Formation of Aromatic Compounds from Carbohydrates". En *Pyrolysis Oils from Biomass*, Soltes, J. y Milne, T.A. (eds.), p.113. American Chemical Society, Washington (1988).
- Núñez, M^a.J. y Lema, R.J.; *Ing. Quím.* **223**, 397 (1987).
- Paris, J.M.; Cairo, J. y Bardulet, M.; "Utilisation of Methanogenic Sediments as Inocula for Low Temperature Anaerobic Sedimenters." En: *Biomass for Energy and Industry (5TH European Conference)*. Vol. 2, Conversion and Utilisation of Biomass; G. Grassi, G. Gossi, G. dos Santos (Eds) p. 2146-2152, Elsevier Applied Science, Londres (1990).
- Prescott, S.C. y Dunn, C.G.; *Microbiología Industrial*, Aguilar, Madrid (1959).
- Prior, B.A.; Alexander, M.A.; Yang, V. y Jeffries, T.W.; *Biotechnol. Lett.* **10** (1), 37 (1988).
- Puerta Romero, J. M.; *Jornadas sobre Energías Renovables. Biomasa e Hidráulica*, p. 85 Soria (1986).

- Quintero, R.R. *Ingeniería Bioquímica*, Alhambra, México (1981).
- Rizzi, M.; Harwart, K.; Bui-thanh, N.A. y Dellweg, H.; *J. Ferment. Bioeng.* **67** (1), 25 (1989).
- Rodríguez Jiménez, J.J.; García Herruzo, F. y Cordero Alcántara, T.; *Ing. Quím.* **249**, 141 (1989).
- Schneider, H.; Wang, P.Y.; Chan, Y.K. y Maleszka, R.; *Biotechnol. Lett.* **3** (2), 89 (1981).
- Serra, A.; Poch, M.; Solá, C.; *Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*, **27** (3) 361 (1987).
- Shacklady, C.A.; *Food. Man.* **44**, 36 (1969).
- Shelef, G.; Azov, Y.; Moraine, R. y Oron, G; "Algae Mass Production as an Integral Part of Wastewater Treatment and Reclamation System". En: *Algal Biomass*, Shelef, G. y Soeder, C.J. (eds). p. 163. Elsevier North-Holland, Biomedical Press, Amsterdam (1980).
- Simon, P. y Meunier, R.; *Microbiologie Industrielle et Génie Biochimique*, Masson, Paris (1970).
- Skoog, K. y Hahn-Hägerdal, B.; *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 66 (1988).
- Slininger, P.J.; Bothast, R.J.; Black, L.T. y McGhee, J.E.; *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 2241 (1982).
- Slininger, P.J., Bothast, R.J., Okos, M.R. y Landisch, M.R.; *Biotechnol. Lett.* **7**, 431-436 (1985).
- Slininger, P.J.; Bolen, P.L. y Kurtzman, C.P.; *Enzyme Microb. Technol.*, **9** (1), 5 (1987).
- Soler Andrés, A.; Gámez Pérez, P.; Rubio Torres, M.; *Ing. Quím.* **152**, 73 (1981).
- Sreenath, H.K. y Jeffries, T.W.; *Biotechnol. Lett.* **9** (4), 293 (1987).
- Stewart, G. C.; *Can. J. Microbiol.* **27**, 973 (1981).

- Toivola, A.; Yarrow, D.; van der Bosch, E; van Dijken, J.P. y Scheffers, W.A.; *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 1221 (1984).
- Vega, J.M.; Castillo, F. y Cárdenas, J.; *La Bioconversión de la Energía*, Pirámide, Madrid (1983).
- Waehrer, W. y Roehr, M.; *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 567 (1981).
- Wayman, M. y Parekh, S.; *Biotechnol. Lett.* **7**, 909 (1985a).
- Wayman, M. y Tsuyuki, S.T.; *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **15**, 168 (1985b).
- Wayman, M.; Seagrave, C. y Parekh, S.R.; *Process Biochem.* **5**, 55 (1987).
- Webb, F.C.; *Ingeniería Bioquímica*, p. 654-656. Acribia, Zaragoza (1966).
- Wiseman, A.; "Características de la Biotecnología y sus bases científicas". En: *Principios de Biotecnología*, p. 1-3, Acribia, Zaragoza (1986).