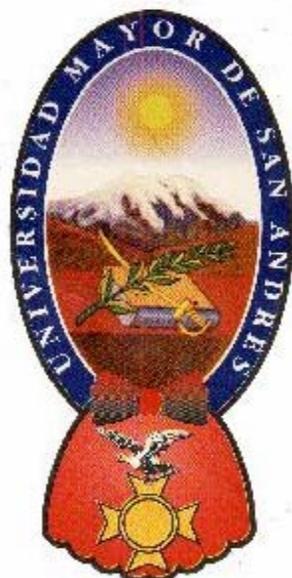


UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUIMICO-IIFB
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE PROCESOS QUIMICOS-IIDEPROQ



**“OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS
CEPAS *Pichia stipitis* CBS 5770, 5773 Y 6054 PARA LA
PRODUCCION DE BIOETANOL A PARTIR DEL HIDROLIZADO
DE ASERRIN DE CURUPAU COMO RESIDUO
LIGNOCELULOSICO”**

**Elaborado por:
Maribel Peña Poma**

**TESINA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE LICENCIATURA
EN BIOQUIMICA**

**LA PAZ – BOLIVIA
2008**

AGRADECIMIENTOS

- *Al ser más maravilloso de esta tierra a Dios quien me ha regalado la vida brindándome fuerza y salud para seguir adelante.*
- *A mis padres Abraham y Trígida por su apoyo y por creer siempre en mi sin perder la confianza.*
- *A la cooperación sueca ASDI/SAREC por su apoyo financiero para el desarrollo de este proyecto.*
- *Al Dr. Cristhian Carrasco por la confianza y el apoyo brindado y por su sincera amistad con palabras de aliento en fin de concluir mi trabajo.*
- *Al Ing. Alfonso Guarachi y al Dr. Rene Álvarez por abrirme las puertas del Instituto de Investigación y Desarrollo de procesos Químicos (IIDEPROQ) y permitirme trabajar en sus instalaciones y así mismo también a todos los que forman parte del IIDEPROQ en especial a Doña Maria por la paciencia brindada.*
- *Al Dr. Enrique Terrazas y a la Dra. Teresa Álvarez por la colaboración y sus consejos tan animados en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímico (IIFB).*
- *A todos mis amigos del IIDEPROQ por brindarme su amistad desinteresada y su apoyo en cada instante: Giovanna, Catalina, Pamela, Rina, Daniel, Ronald, Luís Fernando, Ruddy, Laura y especialmente a Carola y Grover quienes me escucharon y apoyaron en los momentos mas difíciles con fuerzas de aliento.*
- *A una persona muy especial Diego quien me brindo su amistad, su amor y todo su apoyo con palabras de seguridad y fortaleza para seguir adelante.*
- *A Irma mi gran amiga de antes, de ahora y de siempre gracias por aguantar mi carácter y compartir tantos momentos de felicidad y tristezas, brindándome su amistad incondicional conjuntamente con Boris una persona de palabra noble y realista.*
- *Gracias a todas aquellas personas con las que compartí una bonita amistad en la Facultad: Pegi, Pame, Guísela, Claudia, Maria Guísela, Marina, Raquel, Marcos, Ramiro, y Erwin.*

INDICE GENERAL

RESUMEN	ii
I. INTRODUCCION	1
II. DISEÑO TEORICO	2
1 MARCO TEORICO.....	2
1.1 Composición química de la madera.....	2
1.1.1 Celulosa.....	3
1.1.2 Hemicelulosa.....	4
1.1.3 Lignina.....	4
1.1.4 Otros Componentes.....	5
1.2 Sector Forestal en Bolivia.....	5
1.2.1 Importancia Económica.....	7
1.2.2 Materia Prima.....	8
1.2.3.1 Características del Curupau.....	8
1.2.3.2 Caracterización del Curupau.....	10
1.2.3 Aserraderos y Proceso de Madera.....	11
1.2.4.1 Empresas Madereras.....	11
1.2.4 Tipos de Madera.....	12
1.2.5 Procesos de Producción.....	12
1.3 Producción de Etanol a Partir de Material Lignocelulósico.....	13
1.4 Métodos de Pretratamiento.....	15
1.4.1 Conceptos Generales de Pretratamiento.....	15
1.4.1.1 Pretratamiento Mecánico.....	16
1.4.1.2 Pretratamiento Físico.....	16
1.4.1.3 Pretratamiento Químico.....	16
1.4.2 Hidrólisis Ácida a Altas Temperaturas.....	18
1.4.3 Factor de Severidad.....	19
1.5 Levaduras.....	19
1.5.1 Características morfológicas generales.....	20
1.5.2 Características de cultivo.....	21
1.5.3 Reproducción de las levaduras.....	21
1.6 Fermentación.....	22
1.6.1 Características de la Fermentación.....	23
1.6.2 Reacciones Bioquímicas en la Fermentación.....	24
1.6.2.1 Biosíntesis de Etanol.....	24
1.6.2.2 Productos producidos durante la Fermentación.....	25

1.6.3 Fermentación de Pentosas.....	27
1.6.4 Influencia del Oxígeno en la fermentación.....	28
1.6.5 Influencia del oxígeno en la reproducción de la levadura.....	28
1.6.5.1 Respiración aerobia.....	28
1.6.6 Tolerancia al Etanol.....	29
1.6.7 Los Inhibidores.....	30
1.6.8 Crecimiento Microbiano.....	30
1.6.9 Cultivo por Lotes Alimentado (CLA).....	30
1.6.9.1 Aspectos Generales.....	30
1.6.9.2 Tipos de Alimentación.....	31
1.6.9.3 Ecuaciones Generales del CLA.....	32
III. JUSTIFICACION.....	33
IV. OBJETIVOS.....	34
1 OBJETIVO GENERAL.....	34
2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	34
V. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	35
1 METODOLOGÍA DE EXPERIMENTACIÓN.....	35
1.1 Métodos Analíticos.....	35
1.1.1 Cuantificación de la composición del hidrolizado de aserrín de curupáú.....	35
1.1.2 Determinación de Sólidos Totales.....	36
1.2 Metodología experimental.....	36
1.2.1 Diseño experimental para el pretratamiento del aserrín de Curupau.....	38
1.2.1.1 Toma de Muestras.....	38
1.2.1.2 Tamizado del Aserrín.....	38
1.2.1.3 Lavado del Aserrín.....	38
1.2.1.4 Filtrado del Aserrín.....	39
1.2.1.5 Impregnación con Ácido Sulfúrico.....	39
1.2.1.6 Determinación de las Variables en Estudio.....	39
1.2.2 Condiciones de cultivo de las Pichia stipitis.....	40
1.2.2.1 Método directo.....	40
1.2.2.2 Método indirecto.....	40
1.2.2.2.1 Preparado de Soluciones.....	41
1.2.2.2.2 Preparación del inoculo.....	42
1.2.2.3 Cultivo de la Pichia stipitis en sistemas diseñados con aireación y micro aireación.....	43

1.2.2.4 Determinar las condiciones de cultivo.....	44
1.2.3 Producción de bioetanol en Sustratos Sintético e hidrolizado de aserrín de <i>Curupaú</i> en Condiciones Aerobias y no estrictamente Anaerobias (fermentativa).....	45
VI. RESULTADOS	47
1 Pretratamiento del aserrín de <i>Curupaú</i>	47
1.1 Resultados de la Hidrólisis.....	47
1.2 Respuesta al comportamiento de diferencia en concentración de sustrato Mixto (glucosa y xilosa).....	49
1.3 Influencia del Oxígeno.....	57
1.4 Escalamiento del medio de cultivo (CBS 5773) en condiciones optimas en un reactor de capacidad 2,5 L.....	59
1.5 Producción de bioetanol con la <i>Pichia stipitis</i> CBS-5773.....	61
1.6 Producción de bioetanol en sustrato sintético.....	62
1.7 Producción de bioetanol a partir del hidrolizado de aserrín de <i>Curupaú</i>	66
VII. DISCUSIÓN	69
VIII. CONCLUSIONES	74
IX. RECOMENDACIONES	76
X. REFERENCIAS	77
ANEXOS	80

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de la Materia Prima.....	10
Tabla 2. Carbohidratos y Lignina en masa seca del aserrín de <i>Curupaú</i>	10
Tabla 3. Principales productos elaborados por las industrias madereras en Bolivia.....	11
Tabla 4. Impregnación del Aserrín con Ácido Sulfúrico.....	40
Tabla 5. Variables de Estudio y Condiciones.....	40
Tabla 6. Relación de sustrato para un volumen de 100 mL.....	42
Tabla 7. Hidrólisis acida del aserrín de <i>Curupaú</i> en condiciones optimas y resultados del análisis de la fracción líquida *.....	47
Tabla 8. Rendimiento de extracción de azúcares del hidrolizado fracción líquida durante el pretratamiento con relación a la masa seca de aserrín de <i>Curupaú</i>	48
Tabla 9. Rendimiento de extracción de Subproductos del hidrolizado fracción líquido durante el pretratamiento con relación a la masa seca del aserrín de <i>Curupaú</i>	48
Tabla 10. Producción de biomasa de la <i>Pichia stipitis</i> CBS 5770, 5773 y 6054 con el experimento 1 con una concentración de azúcares 20 g/L relación glucosa: xilosa (10:10) durante un periodo de 48 h.....	50
Tabla 11. Producción de biomasa de la <i>Pichia stipitis</i> CBS 5770, 5773 y 6054 con el experimento 2 con una concentración de azúcares 20 g/L relación glucosa: xilosa (5:15) durante un periodo de 48 h.....	52
Tabla 12. Producción de biomasa de la <i>Pichia stipitis</i> CBS 5770, 5773 y 6054 con el experimento 3 con una concentración de azúcares 20 g/L relación glucosa: xilosa (1.19) durante un periodo de 48 h.....	55
Tabla 13. Producción de biomasa con la CBS 5773 en condiciones de aireación y micro aireación durante un periodo de 48 h.....	57
Tabla 14. Producción de biomasa de la <i>Pichia stipitis</i> CBS 5773 en condiciones optimas en un reactor de capacidad 2.5 L durante 48 h.....	60
Tabla 15. Producción de biomasa de la <i>Pichia stipitis</i> CBS 5773 en condiciones aeróbicas y no estrictamente anaeróbico (fermentativo) durante un periodo de 72 h.....	62
Tabla 16. Rendimiento de producción de etanol por la <i>Pichia stipitis</i> CBS 5773 en medio de cultivo Sintético durante la fermentación.....	63
Tabla 17. Producción de biomasa durante la fermentación en condiciones aeróbicas y no estrictamente anaeróbicas con la <i>Pichia stipitis</i> CBS 5773 en medio de cultivo hidrolizado fracción líquida de aserrín de <i>Curupaú</i>	66
Tabla 18. Rendimiento de producción de etanol por la <i>Pichia stipitis</i> de los productos en medio de Cultivo con sustrato hidrolizado fracción líquida durante la fermentación.....	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura simplificada de la pared celular de una porción de madera suave o fibra de madera dura.....	3
Figura 2. Mapa forestal de Bolivia.....	6
Figura 3. Producción nacional de madera por año (expresado en m ³).....	7
Figura 4. Características del sector forestal en Bolivia.....	8
Figura 5. Ubicación geográfica, <i>Curupaú</i>	8
Figura 6. Árbol.....	9
Figura 7. Diagrama de flujo proceso de producción.....	13
Figura 8. Producción Mundial de Alcohol Etilico 2004.....	14
Figura 9. Producción de etanol a partir de material lignocelulósico.....	15
Figura 10. Diagrama de una célula de lavadura <i>S. cerevisiae</i>	20
Figura 11. Gemación de la levadura.....	21
Figura 12. Biosíntesis del etanol.....	24
Figura 13. Metabolitos producidos durante la fermentación.....	25
Figura 14. Ruta metabólica de la xilosa y la glucosa por la levadura fermentadora de xilosa (<i>Pichia stipitis</i>).....	27
Figura 15. Respiración aerobia de la célula “Cadena de transporte de electrones de electrones y generación de fuerza protón–motriz”.....	29
Figura 16. Diagrama de flujo del procedimiento.....	37
Figura 17. Procedimiento del método directo.....	40
Figura 18. Procedimiento método indirecto (preparación del inoculo).....	41
Figura 19. Procedimiento de experimentos y Cultivos aireación y micro aireación.....	42
Figura 20. Diseño de los sistemas aireación y micro aireación.....	43
Figura 21. Procedimiento de fermentación en condiciones de aireación y micro aireación.....	46
Figura 22. Cromatograma representado los azucares y los subproductos extraídos del hidrolizado liquido durante el pretratamiento del aserrín de <i>Curupaú</i>	49
Figura 23. Concentración de Biomasa vs. Tiempo durante un periodo de 48 hrs. Experimento 1 concentración de azucares 20 g/L relación glucosa:xilosa (10:10).....	51
Figura 24. Velocidad de crecimiento durante 48 hrs. en la experimento 1.....	51
Figura 25. Concentración de Biomasa vs. Tiempo durante 48 h. Experimento 2. Concentración de azucares 20 g/L relación de azucares glucosa:xilosa (5:15).....	53
Figura 26. Velocidad de crecimiento durante 48 hrs. en el experimento 2.....	54
Figura 27. Concentración de Biomasa vs. tiempo durante un periodo de 48 h experimento 3 concentración de azucares 20 g/L relación de azucares glucosa: xilosa g/L (1.19).....	56
Figura 28. Velocidad de crecimiento durante 48 hrs. en la experimento 3.....	56
Figura 29. Concentración de biomasa con relación del tiempo de la <i>Pichia stipitis</i> CBS 5773 en condiciones de aireación y micro aireación durante 48 h.....	58

Figura 30. Velocidad de crecimiento vs tiempo de la CBS 5773 en condiciones aeróbicas y micro aerobias.....	59
Figura 31. Concentración de biomasa con relación al tiempo de la <i>Pichia stipitis</i> CBS 5773 en condiciones optimas durante 48 h.....	60
Figura 32. Velocidad de Crecimiento de la <i>Pichia stipitis</i> CBS en condiciones optimas durante un periodo de 48 h.....	61
Figura 33. Fermentación con la <i>Pichia stipitis</i> CBS 5773 en medio de cultivo sintético en condiciones no estrictamente anaerobias (fermentativas) con relación a la concentración de etanol y azucares.....	64
Figura 34. Cromatograma representando la producción de etanol y consumo de azucares por la <i>Pichia stipitis</i> CBS 5773 después de las 72 h.....	64
Figura 35. Fermentación con la <i>Pichia stipitis</i> CBS 5773 en medio de cultivo sintético en condiciones aeróbicas con relación a la concentración de etanol y azucares.....	65
Figura 36. Reproducción de la <i>Pichia stipitis</i> CBS 5773 en condiciones aerobias con medio de cultivo sintético después de las 72 h.....	66
Figura 37. Fermentación con la <i>Pichia stipitis</i> CBS 5773 en medio de cultivo sustrato hidrolizado fracción liquida en condiciones no estrictamente anaeróbicas (fermentativas) con relación a la concentración de etanol y azucares.....	68
Figura 38. Fermentación con la <i>Pichia stipitis</i> CBS 5773 en medio de cultivo sustrato hidrolizado fracción liquida en condiciones aeróbicas con relación a la concentración de etanol y azucares.....	68

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS CEPAS *Pichia stipitis* CBS 5770, 5773 Y 6054 PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DEL HIDROLIZADO DE ASERRIN DE CURUPAÚ COMO RESIDUO LIGNOCELULÓSICO

Resumen

El presente estudio forma parte del proyecto “bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos” del programa ASDI/SAREC-UMSA con la cooperación del departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Lund, Suecia; misma que se involucra con las líneas de investigación en energía renovable como es el caso del alcohol carburante. Esta investigación consiste en un campo de estudio mediante el establecimiento de reactores bajo distintas condiciones físicas (aireación) y químicas (sustrato) de cultivo y sustrato. Donde se tiene como objetivo encontrar altos rendimientos de producción de bioetanol mediante el aprovechamiento de residuos lignocelulósicos (aserrín de *Curupaú*); biomasa que se producen de manera considerable en diferentes zonas geográficas de Bolivia.

El futuro agotamiento del petróleo plantea la necesidad de producir combustibles a partir de materiales renovables. Los hidrolizados de residuos lignocelulosicos proporcionan grandes cantidades de azúcares que pueden ser convertidos en etanol por cepas de *Pichia stipitis*.

Después de la glucosa, la xilosa es el azúcar más abundante en dichos hidrolizados, por tal razón el estudio se realizo en sustrato sintético concentración de azucars 20g/L donde la relación de (xilosa:glucosa) basado en tres experimentos es; 10:10, 5:15 y 1:19 (g/L). Las cepas CBS 5770, 5773 y 6054 de *P. stipitis* han sido empleadas para la fermentación de carbohidratos. La proporción de Xilosa: glucosa (1:19) mostró mayor concentración de biomasa 8,01 g/L con la cepa CBS 5773. La influencia del oxigeno también fue estudiada en dos sistemas (aireación y micro- aireación). En condiciones aeróbicas la biomasa se incremento hasta 8.8 g/L de con una velocidad de crecimiento 0.25 h^{-1} alcanzada a las 10 hrs. Seguidamente se procedió con el escalamiento en condiciones optimas dando como concentración máxima de 9,412g/L de biomasa.

Se realizo cultivos con sustrato sintético y sustrato hidrolizado en condiciones (aeróbicas y fermentativas). En condiciones fermentativas empleando sustrato sintético el rendimiento máximo de producción de etanol fue *Yea* 0,40 (g/g). Mientras la fermentación con sustrato hidrolizado el rendimiento de producción de etanol fue *Yea* 0,26 (g/g) después de las 72h. Sin embargo en condiciones aerobias se produce mas biomasa que etanol el rendimiento de producción de etanol con sustrato sintético fue *Yea* 0.08 (g/g) después de las 24h. que expresa una baja producción de etanol y el rendimiento de biomasa fue *Yxa* 0.30 (g/g) después de las 72 h. En sustrato hidrolizado la producción de etanol fue *Yea* 0.06 (g/g) después de las 24 h. y el rendimiento de biomasa fue *Yxa* 0.27 (g/g) después de las 72 h.

I. INTRODUCCION

En los últimos veinte años, los procesos tradicionales de producción de etanol han experimentado avances significativos tanto en su operación como en las inversiones de capital. Estas mejoras se han logrado gracias a modificaciones en la operación de las plantas existentes y a los cambios tecnológicos. Sin embargo, todavía está lejos de alcanzarse resultados cercanos a los máximos teóricos de conversión a partir del (tratado de Kyoto). Una solución atrayente es el uso de energía renovable, la cual es representada en materiales lignocelulósicos. La emisión de CO₂ generadas por la producción y uso de biocombustibles son compensadas por la absorción de CO₂ durante el crecimiento de las plantas y de otros materiales vegetales a partir de los cuales dichos combustibles se producen (Nguyen y col, 1981). El biocombustible mas importante es el alcohol carburante (etanol), el cual puede ser utilizado como oxigenante de gasolina, elevando su contenido en O₂ lo que permite una mayor combustión de la misma disminuyendo las emisiones contaminantes de hidrocarburos no oxidados completamente (Nguyen y col, 1981).

En el contexto internacional existen biomásas lignocelulósicas producidas en gran cantidad y que son alternativas bioenergéticas atrayentes en la fabricación de este alcohol carburante. En Bolivia, una alternativa atrayente es el sector maderero ya que la superficie de bosques demuestra que con manejo forestal sostenible la obtención de bioetanol puede ser muy rentable. Según la misma referencia, entre las especies más explotadas se encuentran el Cuchi, Almendrillo (Cumarú), Soto, Verdolago, Cuta Bajo Paraguá, Curupaú, representándose un 43.3%. Que se encuentran en los países de Perú y en Bolivia (departamentos de La Paz, Chuquisaca, Santa Cruz, Cochabamba, Beni y Tarija). Estas especies están compuestas principalmente por hemicelulosa además de celulosa y lignina; polímeros naturales característicos en maderas duras, y que representan fuentes energéticas aprovechables, renovables y a su vez alternativas a los combustibles fósiles.

En los recientes años muchas investigaciones se han consagrado a encontrar los micro-organismos que fermenten monosacáridos como son las pentosas o hexosas directamente a etanol. La levadura *Pichia stipitis* parece ser muy eficaz., sin embargo hasta ahora ninguna a alcanzado el rendimiento, productividad y concentración de este producto comparadas con la *Saccharomyces cerevisiae* al fermentar las hexosas (Kolot, 1980). Los procesos para la obtención de alcohol por fermentación

dependen de la naturaleza de la materia prima; materiales con alto contenido de azúcares requieren, poco o ningún tratamiento preliminar. En contraste, las materias primas amiláceas y lignocelulósicas (maderas duras y suaves, residuos forestales y agrícolas, papel de desecho, etc.) deben ser hidrolizadas a azúcares fermentables antes de que actúen sobre ellas las levaduras. Estos pre-tratamientos aumentan significativamente los costos de procesamiento.

Un avance considerable es la utilización de microorganismos que no solo metabolicen hexosas, sino que además puedan aprovechar las pentosas, existentes en residuos lignocelulosicos (xilosa). La mayor parte de las investigaciones para fermentar las pentosas se dirigieron sobre las levaduras naturales *Pichia stipitis*, utilizando y adecuando el sustrato de pentosas dando lugar a una imperiosa línea de investigación para mejorar las condiciones de cultivo y así incrementar el rendimiento de producción de etanol (Watson y col., 1984).

II. DISEÑO TEORICO

1. MARCO TEORICO

1.1 Composición Química de la Madera

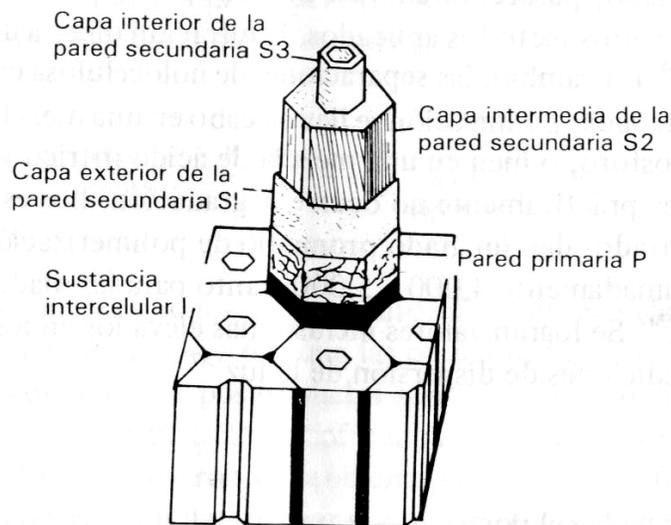
La madera es una mezcla de tres polímeros naturales: celulosa, lignina y hemicelulosas, que guardan una relación aproximada de 50:25:25, según la especie, las variaciones biológicas, tales como las diferencias genéticas que pueda haber dentro de una especie, y las condiciones de crecimiento. La celulosa y la hemicelulosa son polímeros de hidratos de carbono formados a partir de moléculas de monosacáridos, y la lignina es un polímero de unidades fenilpropánicas. (Browning, B.L. 1993)

Estudios realizados con microscopia electrónica en la madera madura muestran que se encuentra en varias capas de paredes de células, rodeadas por una sustancia intercelular amorfa. (Figura 1). Entre las células existe una región, denominada lámina intermedia, que contiene principalmente lignina y sustancias pépticas. La pared primaria (P), contiene una red organizada en forma suelta y aleatoria de microfibrilas de celulosa embebidas en una matriz. Inmediatamente bajo la pared primaria está la pared secundaria, la que constituye, casi la totalidad de la pared celular. La pared secundaria está

dividida en tres capas S_1 de 0.1 a 0.3 μm , S_2 de 1 a 5 μm y S_3 de 0.1 μm , formadas por redes de microfibrillas de celulosa.

La distribución de la lignina, la celulosa, las hemicelulosas, y la pectina en la lamela intermedia y la pared de la célula en las fibras de la madera, ha resultado ser totalmente heterogénea, indicaron que casi 70 % de la lignina en las maderas blandas, y 90 % en las maderas duras está ubicado en la lamela intermedia. El resto de la lignina está distribuido dentro de la pared secundaria, habiéndose encontrado una concentración en general más elevada en la capa S_3 de la pared celular. (Sachs, 1993) La hemicelulosa está distribuida por toda la pared secundaria, y en general las glucomannanas se encuentran en una concentración más elevada en el parte interior de las capas S_2 y S_3 .

Figura 1. Estructura simplificada de la pared celular de una porción de madera suave o fibra de madera dura.



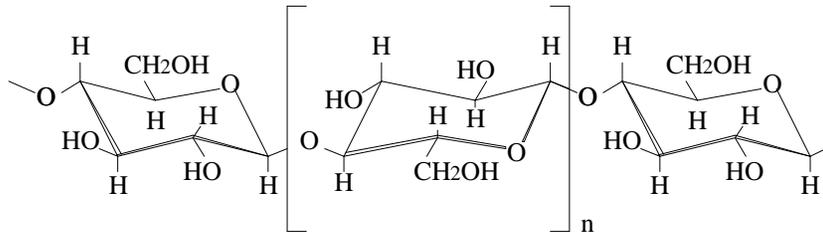
Fuente: Wyman, Handbook on Bioetanol: Production and Utilization

1.1.1 Celulosa

La celulosa se aisló y caracterizó en la década de los 30, por el químico francés Anselme Payen. (Guía Técnica, 2005). Concluyendo que, la celulosa y el almidón eran sustancias isoméricas, ya que ambas, al ser hidrolizadas, generaban D-glucosa. Sin embargo, debieron transcurrir casi tres cuartos

de siglo para que la fórmula empírica de la celulosa quedara establecida como $(C_6H_{10}O_5)_x$. (Irving, 1990)

La celulosa es un polisacárido lineal formado por unidades de anhidro-D-glucopiranososa enlazada entre las posiciones 1 y 4 de las unidades adyacentes de azúcares mediante un enlace β , como se indica a continuación:



Fuente: Wyman, Handbook on Bioetanol: Production and Utilization

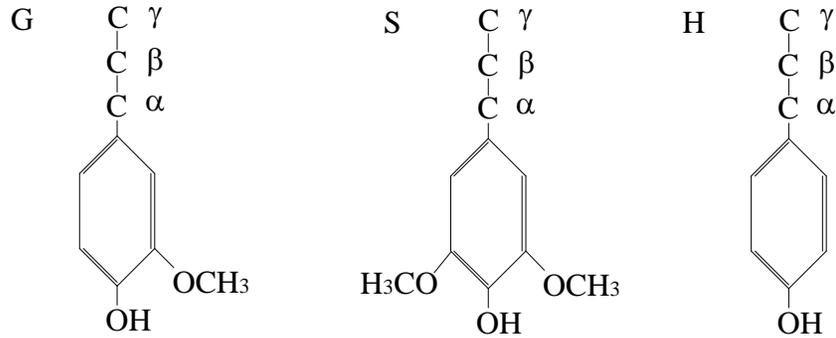
1.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa está principalmente compuesta de pentosas. Las pentosas principales en la hemicelulosa de eucalipto son azúcares y el componente principal es, β -D-xilopiranososa que tiene sólo la posición 2 y 3 carbonos disponibles para la unión o sustitución cuando los β -(1-4) se unieron como en la xilosa. Este polímero es la representación general más simple de un hemicelulosa normal. La otra pentosa común es arabinosa que está en una posición distinta en la formación estructural del anillo de furanososa. La arabinosa normalmente se une a la posición 2 y 3 carbonos de xilosa en arabinoxilano y a la posición 3 y 6 carbonos de galactosa en arabinogalactano. (Clark y Menz, 1987). Se piensa que la estructura compleja de la hemicelulosa confiere una gama amplia de propiedades biofísicas y bioquímicas en los tejidos de la planta, así como en productos hechos de estos tejidos, por ejemplo el papel y sus derivados. (Clark y Menz, 1987).

1.1.3 Lignina

La lignina es un polímero complejo de tres dimensiones, de unidades de fenol propano, diferentes que están juntos limitados por éter y ataduras de carbono-carbono. Las tres unidades principales de fenol propano son: guayacol (G), siringil (S) y p-hidroxifenol propano (H). Unas estructuras de la lignina se han esclarecido pero en general su estructura permanece desconocida la

lignina en maderas blandas son ricas en guayacol con cantidades solo menores de siringil y p-hidroxi fenol propano existen relaciones de G, S y H para el pino 85:2:13 respectivamente. (Clark y Menz, 1987). Cuyas estructuras de los componentes monoméricos de la lignina se indican a continuación:



Donde: G = guayacol, S = siringil, y H = p-hidroxi fenol propano.

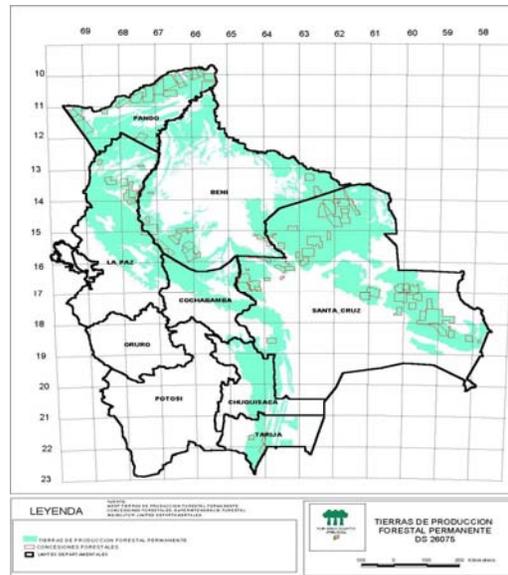
Fuente: Wyman, Handbook on Bioethanol: Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Softwood

1.1.4 Otros Componentes

Además de los tres grupos que conforman principalmente la pared celular, presentes en todas las maderas, existe otro grupo conformado de sustancias de baja masa molar conocidas también como sustancias extraíbles que se encuentran en menor cantidad, y las sustancias minerales. La proporción y composición química de la lignina y las poliosas difieren para los distintos tipos de madera mientras que la celulosa es uniforme en composición en todas las maderas.

1.2 Sector Forestal en Bolivia

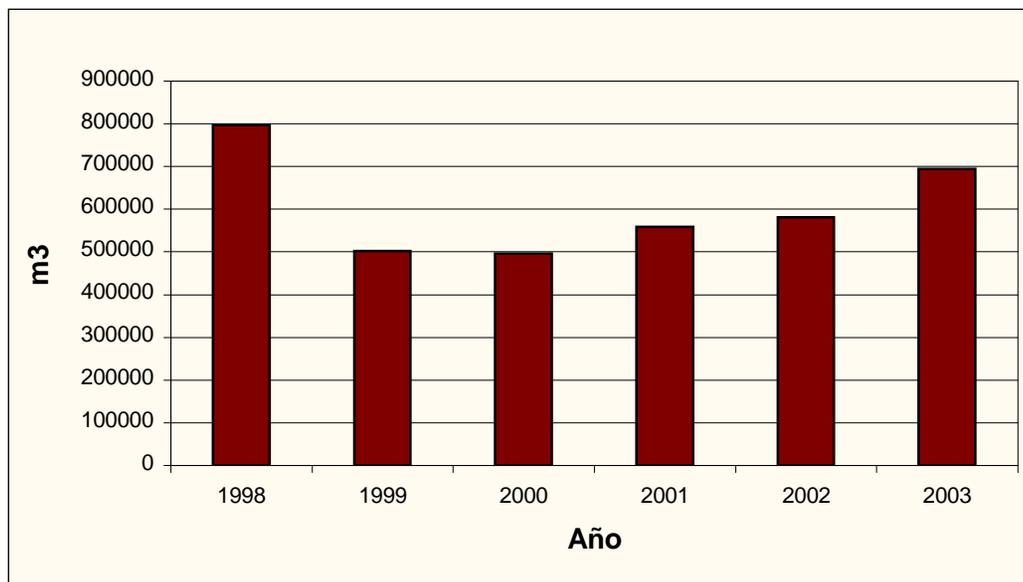
La superficie de bosques en Bolivia según el Manejo Forestal Sostenible asciende a 2.5 millones de hectáreas Figura 2. , con un potencial de 28 millones de Ha. Por otro lado, la producción anual de madera alcanza solo 0.7 millones de m³, teniendo un potencial de 6 millones de m³, lo que representa el 11.5% de la producción potencial. Asimismo, la generación de empleos en la gestión 2003, fue de 50.000 empleos siendo el potencial de 150.000 empleos. (Superintendencia Forestal de Bolivia, 2002)

Figura 2. Mapa forestal de Bolivia

Fuente: Superintendencia Forestal de Bolivia, 2003.

Con referencia al consumo de madera en el ámbito nacional, no existían datos oficiales para los años 2001 y 2002, por lo que un estudio realizado por una empresa consultora privada (HIB Latinoamérica) estimó un volumen de 222 mil m³ y un valor de 35,67 millones de \$US, basándose en la producción oficialmente registrada por la Superintendencia Forestal (SIF), menos la producción destinada a la exportación. Asimismo, se determinó que el consumo interno de madera proveniente de fuentes no legales tiene un valor similar al oficialmente registrado. Es decir otros 222 mil m³ de madera, por lo cual el consumo estimado de madera, en el ámbito nacional, sería de 444 mil m³, para el año 2001. (Superintendencia Forestal (SIF) 2002)

Según la Cámara Forestal de Bolivia, con estos datos, se estimó que el consumo nacional de madera percapita es uno de los más bajos en el ámbito mundial. Si se acepta que el consumo nacional tiene una fuente de madera ilegal similar a la de un aprovechamiento legal (0,0546 m³/año), el nivel de consumo percapita en Bolivia sería similar al de China (0,11 m³/percapita/año), 6 veces menos que Perú (0,6 m³/hab./año) y 15 veces inferior al consumo de Estados Unidos (1,7 m³/hab./año), primer consumidor mundial. El total de la producción forestal en Bolivia el año 2003 ascendió a 693847 de m³, logrando un incremento de 19,26% respecto del año anterior, la Figura 3. , resume la producción forestal en los últimos 5 años.

Figura 3. Producción nacional de madera por año (expresado en m³).

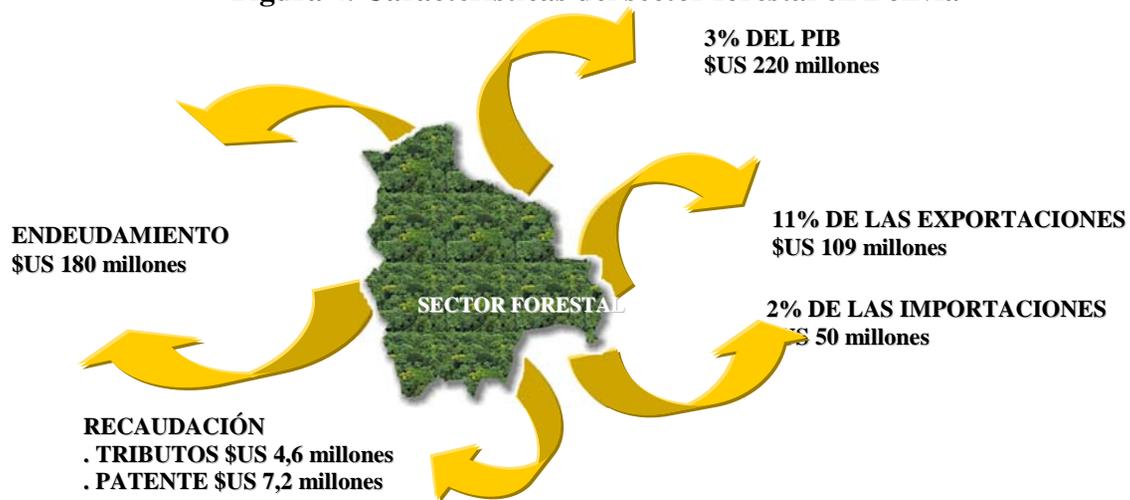
Fuente: Superintendencia Forestal, Informes anuales, 2003.

El año 2010 la proyección estimada, del consumo interno de productos forestales, sería de 855.500 m³ en términos de madera, así como 108.000 toneladas de papel, según la Superintendencia Forestal de Bolivia. Como la producción forestal se realiza de bosques naturales, existe una gran cantidad de especies forestales de aprovechamiento maderable. Según la SIF, se aprovechan cerca de 69 especies identificadas y otras 279 no clasificadas. A pesar de la gran cantidad y diversidad de especies de maderas, existe una fuerte presión de extracción sobre unas pocas especies.

1.2.1 Importancia Económica

Existen 6 grandes regiones productoras forestales en Bolivia (Bajo Paraguá, Chiquitanía, Choré, Guarayos, Preandino-amazónico y Amazonía), totalizando una superficie de aproximadamente 29 millones de Ha. (Superintendencia Forestal 2003) (11). La actividad forestal tiene un importante poder de movilización de muchos sectores de la economía: empleo, transportes, industria, construcción, etc., según la Figura 4.

Figura 4. Características del sector forestal en Bolivia



Fuente: Plan estratégico para el desarrollo forestal de Bolivia, 1999.

1.2.2 Materia Prima

En el momento de la explotación de bosques la materia prima se divide en dos flujos principales destinados a abastecer por un lado a la industria de la pulpa y el papel y por otro a la industria de aserrado de madera, la industria de aserrado trabaja con tres tipos de maderas, las maderas blandas, maderas semiduras y las maderas duras, con relación a mayores volúmenes de producción tomaremos a una madera dura denominada comúnmente *Curupaú*.

1.2.2.1 Características del Curupau.

Taxonomía

El *Curupaú* pertenece a la especie *Anademanthera Columbrin* (Vell. Conc.) Benth y Fabaceae – Mimosoideae sus nombres comunes y distribución geográfica Figura 5 son:

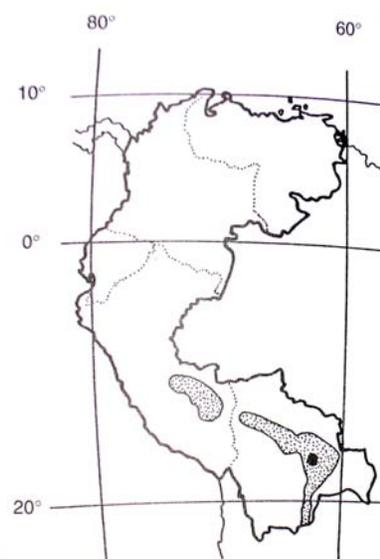
Bolivia: Bilca, cebil, curupaú, curuparí, vilco.

Perú: Acacia.

Argentina: Cebil colorado, curupay.

Fuente: C. Y. Liang, K. H. Bassett, E. A. McGinnes, y R. H. Tappi, 43, 1017 (1960)

Figura 5. Ubicación geográfica, Curupaú

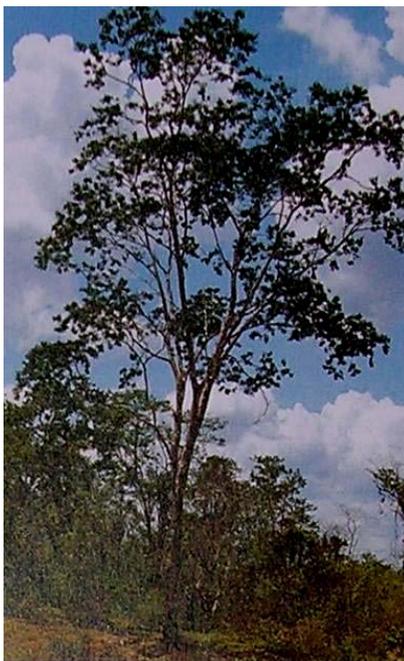


a la familia

Marchessault,

Nombre comercial internacional Curupay, el árbol Figura 5 llega a 250 cm. de altura total y hasta 110 cm. de diámetro; tronco derecho, sin alerones. Presenta su copa un poco torcida, abierta y poco densa, proporcionalmente mayor que el tronco.

Figura 6. Árbol



Fuente: I. B. Sachs, I. T. Clark, y J. C. Pew, J. Polym. Sci., Part C, 2, 203 (1993)

La corteza de esta especie Figura 6 tiene una superficie del tronco de color grisáceo, de apariencia áspera, entre fisurada y agrietada, con grietas horizontales y verticales; la corteza muerta se desprende en pedazos rígidos. Corteza viva rojiza, dura, de estructura fibrosa y laminar, con exudación roja, escasa que fluye lentamente; el grosor total de la corteza puede llegar a 4,5 cm.

Sus hojas son bipinnadas, alternas, de 12 a 15 cm. de longitud. Sus flores ordenadas en grupos globosos (cabezuelas) de 1.5 a 2 cm. de diámetro, de color blanco amarillento. El fruto legumbre larga y angosta achatada, marrón, de 10 a 25 cm. de longitud, con borde ondulado; semillas 8 a 15 redondeadas, planas, marrones, lustrosas de 1.5 a 2 cm. de diámetro.

La ecología y distribución del *Curupaú* se encuentra en Perú y en Bolivia en los departamentos de La Paz, Chuquisaca, Santa Cruz, Cochabamba, Beni y Tarija. Crece de 400 a 1600 metros de altitud, en diferentes clases de suelos, en topografía plana y no inundable. Floración (Bolivia): septiembre y octubre, frutificación: diciembre y enero.

Usos del *Curupaú*

El tanino presente en su corteza, apto para curtiembre; producto que se conoce localmente como “zumaqui”. Las semillas semitostadas y molidas son narcóticas y con propiedades alucinógenas. La madera se utiliza en postes, toneles, durmientes, estructuras pesadas, vigas, columnas, pilotes para malecones, construcción naval, pisos, parquet, escalones y cercos para viñedos, etc.

1.2.2.2 Caracterización del *Curupaú*

La siguiente tabla hace referencia sobre la caracterización del *Curupaú*, fue realizada el 2007 por el investigador Luís Quispe Rivera como una parte de su proyecto de grado “Aprovechamiento de Residuos Lignocelulósicos de Industrias Madereras para la producción de Bioetanol” los resultados obtenidos servirán de gran manera para predecir si se realizó una buena extracción de xilosa durante el pretratamiento, pero también se debe saber el contenido de xilosa, glucosa y arabinosa al tanto por ciento en materia seca para sacar el rendimiento de extracción del hidrolizado relacionando con el sólido rescatado el método NREL, permitió determinar la composición del aserrín reportado en la Tabla 2.

Tabla 1. Caracterización de la Materia Prima

Análisis	<i>Curupaú</i>
Humedad %	5.86
Cenizas %	0.99
Extracto Etéreo %	1.11
Fibra Cruda %	96.04
Lignina %	18.95
Celulosa %	50.35
Hemicelulosa %	26.75

Fuente: Quispe, 2007

Tabla 2. Carbohidratos y Lignina en masa seca del aserrín de *Curupaú*

Xylano (g/100 g MS)	12,58	Xilosa (g/100 g MS)	14,29
Arabinano (g/100 g MS)	2,211	Arabinosa (g/100 g MS)	2,51
Glucano (g/100 g MS)	43,16	Glucosa (g/100 g MS)	47,93
Ligninano (g/100 g MS)	19		

Fuente: Quispe, 2007

1.2.3 Aserraderos y Proceso de Madera

1.2.3.1 Empresas Madereras

Variedad de empresas existentes, dedicadas a la industria forestal hasta el año 2003 eran 952, de las cuales 546 (57%) se encuentran trabajando en Santa Cruz. (Guía técnica 2005 FUNDES). Las empresas forestales de aserrado están dedicadas, casi exclusivamente, a producir madera sólida. Son en general empresas pequeñas y medianas, con tecnología, desfasada y reducido capital. Las empresas industriales son muy pocas, dedicadas a laminados, contrachapados, tableros reconstituidos y mueblería, este segmento es el que genera mayor valor agregado por unidad de materia prima.

La industria forestal y de procesamiento de la madera en Bolivia produce poca diversidad de productos elaborados y con una reducida tasa de innovación Tabla 3 La gran mayoría de los productos que hoy se producen son los mismos que hace diez o veinte años atrás.

La siguiente tabla muestra los principales productos producidos por las empresas madereras del país.

Tabla 3. Principales productos elaborados por las industrias madereras en Bolivia

Grupos	Principales Productos
Aserrados	Madera escuadrada, tablón, tabla, listón, vigueta, viga, puntal, durmiente, tapajuntas y otros
Láminas	Lámina debobinada y lámina faqueada
Contrachapados	Contrachapado estructural y contrachapado decorativo
Tableros Reconstituidos	Aglomerado crudo, aglomerado revestido con lámina de madera, aglomerado con revestimiento melamínico, aglomerado revestido con chapa dura, chapa dura cruda, chapa dura pintada, chapa dura revestida con lámina de madera
Productos de Mayor Valor Agregado (PMVA)	Puertas, ventanas, aberturas, molduras, pisos (parquet), (panel, molduras y otros), productos machihembrados, urnas funerarias, artesanías, escaleras, partes y componentes de muebles, muebles (mesas, sillas, cómodas, bancos y sofás), sillas talladas.

Fuente Elaboración FUNDES, 2005

La capacidad instalada de las industrias forestales en Bolivia es muy reducida con relación a la capacidad de los bosques, sin embargo, aún esta pequeña capacidad de procesamiento está ampliamente subutilizada, existen muchos aserraderos paralizados y otros que trabajan a menos del 10 % de su capacidad instalada.

1.2.4 Tipos de Madera

La materia prima principal en la industria del aserrío es la madera en troncos. Las principales maderas explotadas y procesadas en Bolivia son. (Superintendencia Forestal 2003)

- ✓ Ochoó
- ✓ Cuta
- ✓ Cambará
- ✓ Cuchi
- ✓ Mara Macho

Todas ellas son llamadas maderas alternativas.

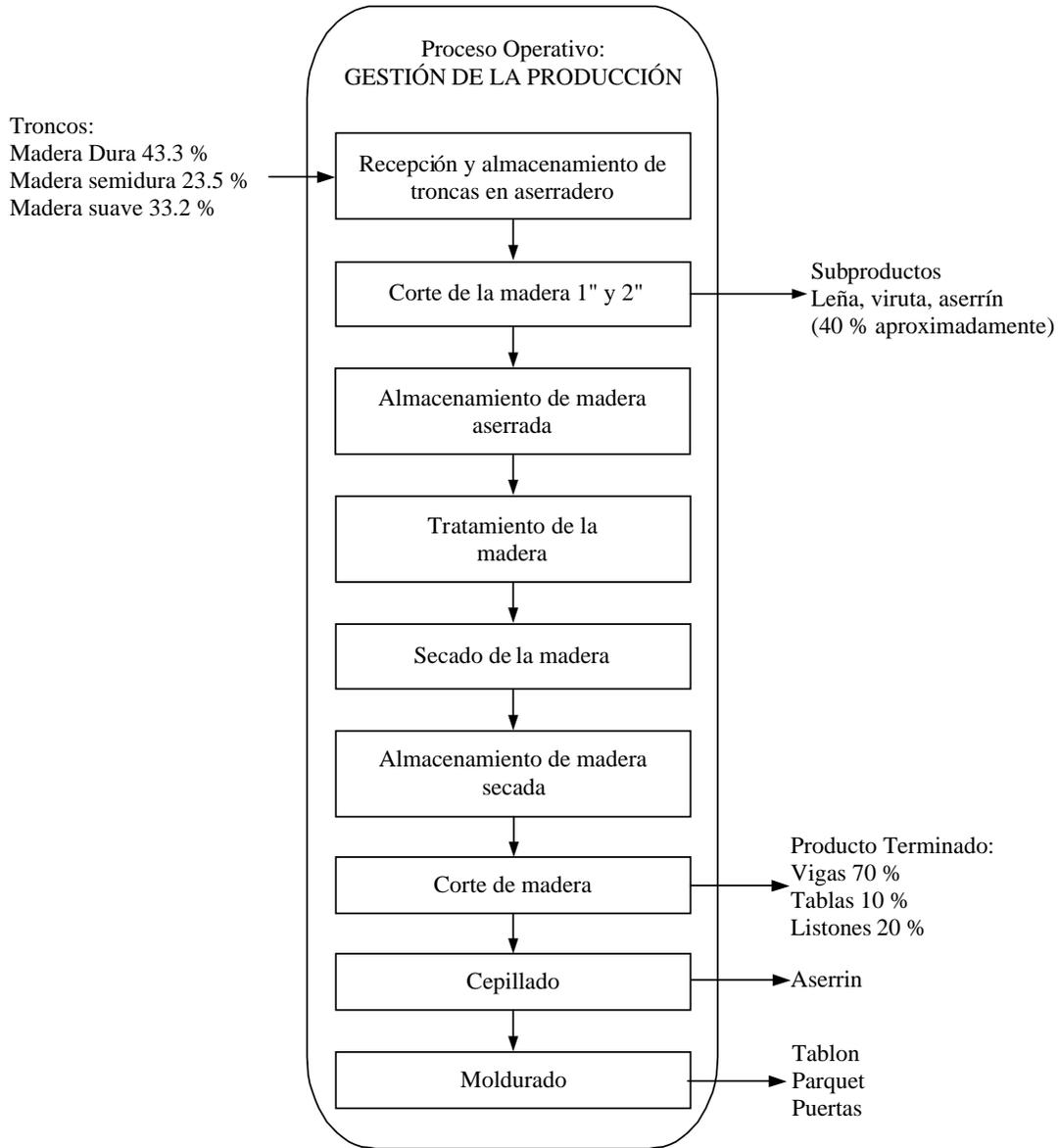
Las maderas se clasifican según su dureza en: duras, semiduras y blandas. De las 11 especies más explotadas. (Guía Técnica 2005)

- 43,3 % corresponde a maderas duras: Cuchi, Almendrillo (Cumarú), Soto, Verdolago, Cuta Bajo Paraguá, Curupaú.
- 33,2 % a maderas blandas Ochoó, Bibosi.
- 23,5 % a maderas semiduras: Mara macho, Yesquero, Cambará.

1.2.5 Procesos de Producción

En la Figura 7 se describe todas las etapas que permiten transformar la materia prima en madera aserrada o elaborada.

Figura 7. Diagrama de flujo proceso de producción



Fuente BOLFOR, Proyecto de Manejo Forestal Sostenible, 2004

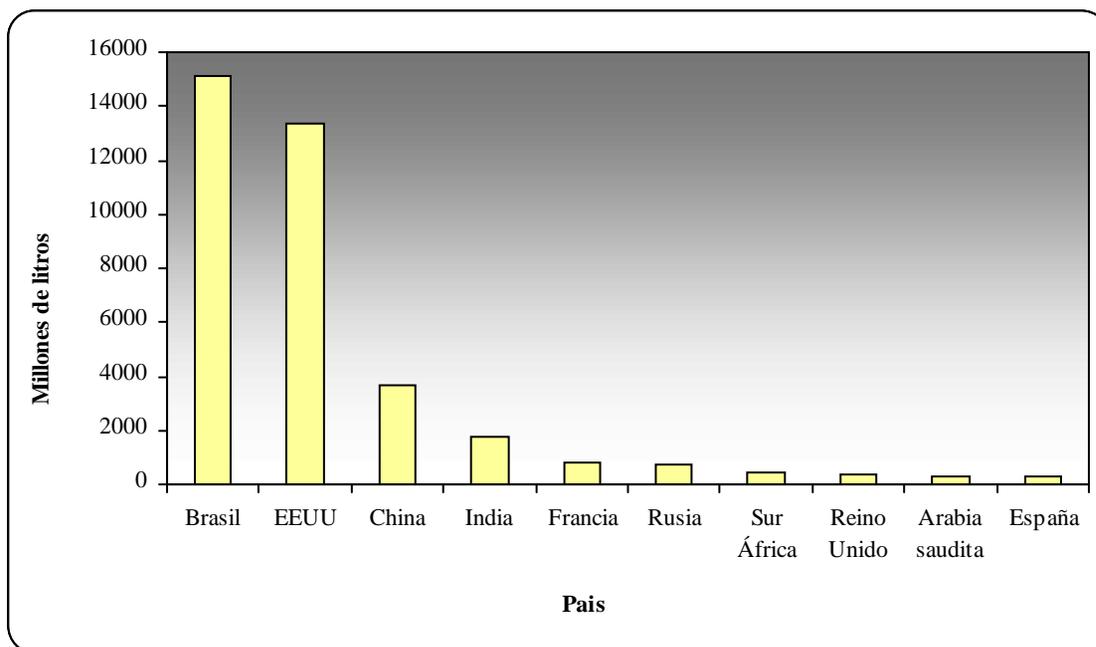
1.3 Producción de Etanol a Partir de Material Lignocelulósico

Según datos de la RFA. (Renewable Fuels Association, 2005) La producción mundial de etanol en 2004 fue de 41000 millones de litros (RFA, 2005 Figura 8) en promedio, el 73 % del etanol producido fue de alcohol carburante, el 17 % a alcohol para bebidas y el 10 % es alcohol industrial, los datos para el alcohol carburante tomados de diversas fuentes indican que Brasil y EEUU

contabilizan el 73 % de la producción mundial (12600 y 10666 millones litros el 2003, respectivamente) aunque este porcentaje esta cambiando constantemente debido a la dinámica del mercado mundial de este Biocombustible.

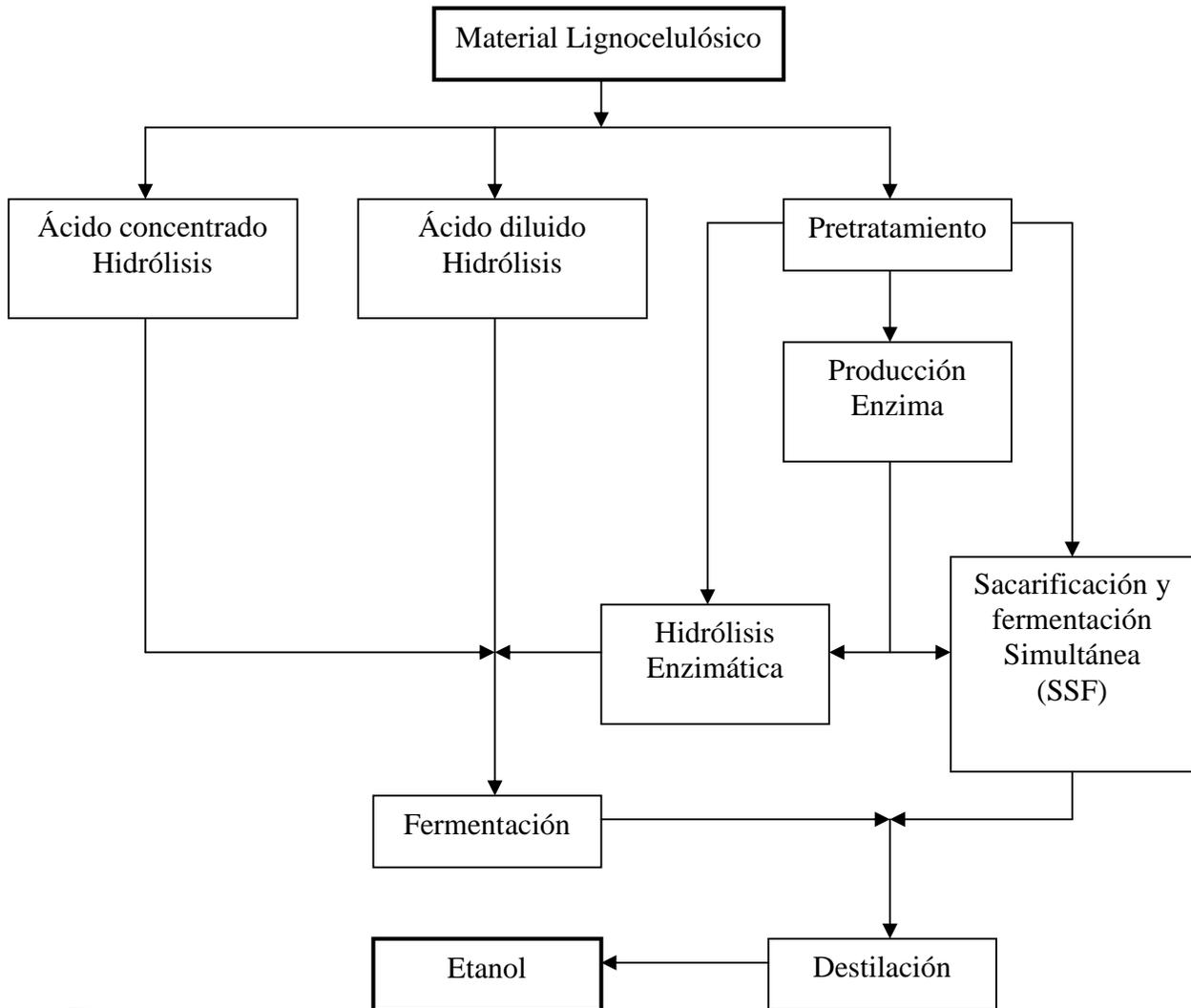
Brasil es el principal productor mundial de Etanol a través del programa pro alcohol (Rosillo-Calle y Hall, 1998) en Brasil se ha utilizado el alcohol hidratado como combustible y el alcohol anhidro como oxigenante (24% v/v). Sin embargo, los ritmos de aumento en la producción y consumo de alcohol carburante en Brasil están disminuyendo, aunque se espera una reactivación de la producción en el mediano plazo. (Wheals et al, 1999). En los EEUU hay también un programa de adición de etanol a la gasolina que se vio impulsado especialmente por el Clean Air Act Amendments de 1990.

Figura 8. Producción Mundial de Alcohol Etílico 2004



Fuente: RFA, 2005.

La mayor parte del etanol es producido mediante fermentación por lotes. La concentración de sustrato al inicio de la fermentación es de 15 a 25 % (p/v) y el pH se ajusta a un valor de 4 - 5 para disminuir los riesgos de infección. El proceso se lleva a cabo a 30 – 35 °C. Generalmente el rendimiento es del 90 % del máximo teórico. El resto del sustrato es convertido en biomasa y otros metabolitos.

Figura 9. Producción de etanol a partir de material lignocelulósico.

Fuente: Elaboración propia

1.4 Métodos de Pretratamiento

1.4.1 Conceptos Generales de Pretratamiento

El propósito del pretratamiento consiste en realizar el acondicionamiento de la materia prima, mediante operaciones mecánicas, físicas y químicas, para aumentar el rendimiento de conversión en la hidrólisis del aserrín de *Curupaú*. El principio del pretratamiento es quitar lignina, separándola de la hemicelulosa, reducir la región cristalina de la celulosa y aumentar la porosidad de los materiales.

El pretratamiento debe cumplir los siguientes requisitos:

- ✓ Mejorar los rendimientos de extracción de azúcares durante la hidrólisis.
- ✓ Evitar la degradación o pérdida de hidratos de carbono.
- ✓ Evitar la liberación de subproductos inhibidores del proceso fermentativo durante la hidrólisis, buscar métodos de tratamiento para inhibidores
- ✓ Los métodos puestos en marcha deben ser de bajo costo y efectivos.

1.4.1.1 Pretratamiento Mecánico

Los residuos pueden ser homogéneamente tratados por una combinación de cortado y molido esto se realiza para reducir celulosa cristalina. El tamaño de los materiales después de cortar normalmente es 10-30 mm, y después de molerlo es 0.2-2 mm. El molino de bolas es más efectivo para romper los cristales de celulosa y mejorar la digestibilidad de la biomasa, que la molienda ordinaria. El requisito para poder realizar conversión mecánica de material agrícola depende del tamaño de la partícula y las características de la biomasa desechada. (Millet, M. A., Baker).

1.4.1.2 Pretratamiento Físico

La pirólisis también es usada para el pretratamiento del material lignocelulósico a temperaturas mayores a 300 °C, donde la celulosa descompone para producir productos gaseosos y residuos, es un trabajo que se realiza por muchas horas El proceso puede reforzarse con presencia de oxígeno. Cuando se agrega cloruro de zinc o carbonato de sodio un catalizador. (Millet, M. A., Baker).

1.4.1.3 Pretratamiento Químico

Pretratamiento con amoníaco, es otro tipo de compuesto químico que se utiliza donde se expone a amoníaco líquido a temperatura y presión altos, por un periodo de tiempo, después del cual es rápidamente reducida a la atmósfera.

Pretratamiento SO_2 , similar al pretratado con ácido sulfúrico no causa la formación de compuestos inhibidores como ocurre con el pretratamiento con ácido sulfúrico.

Pretratamiento alcalino, algunas bases también pueden usarse para el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos y los efectos del pretratamiento alcalino dependen del volumen de lignina de los materiales. Se cree que el mecanismo aumenta la porosidad del material. (Millet, M. A., Baker).

Pretratamiento con ácido sulfúrico, aumenta la efectividad de la hidrólisis disminuyendo la producción de compuestos inhibidores, y elevando la transformación de hemicelulosa. El pretratamiento con ácido sulfúrico diluido es ampliamente utilizado para tratar biomasa; el uso de este catalizador es considerado como un paso principal para la hidrólisis de biomasa y la producción de bioetanol u otros combustibles y químicos.

La tecnología mencionada es enfocada utilizando reactores relativamente de configuraciones simples como ser en lotes o sistemas de tapón-flujo. Obteniéndose rendimientos relativamente altos de azúcares recuperables provenientes de las fracciones hemicelulósicas formados por monómeros y/o olí gomeros, mejorando de esta manera la digestibilidad enzimática del residuo de celulosa insoluble. (McMillan, J. D.; Newman, M. M. 1999).

Por lo que se refiere a los rendimientos de carbohidratos de las fracciones hemicelulósicas utilizando ácido sulfúrico diluido propone desafíos técnicos y económicos. Estas consideraciones han producido un proceso de reconfiguración donde el proceso del pretratamiento real se dirige a ser simple, por lote o de tapón-flujo, seguidas por una separación del residuo del pretratamiento en el líquido y los fragmentos sólidos sobre la temperatura, opcionalmente seguidas por un lavado de los sólidos del pretratamiento a una temperatura elevada (sobre $135\text{ }^\circ\text{C}$) para posterior utilización enzimática. (Torget, R. W. U.S. 2001).

El uso de ácido sulfúrico diluido en el pretratamiento puede lograr mejoras significativas en la hidrólisis. A temperaturas moderadas los rendimientos son bajos mientras que temperaturas altas y pretratamiento con ácido diluido el tratamiento es favorable para la hidrólisis de la celulosa. (McMillan, J.D., 1994.).

1.4.2 Hidrólisis Ácida a Altas Temperaturas

Denominada explosión de vapor, este método normalmente es usado con materiales lignocelulósicos. (McMillan, J.D., 1994.). Según este método, la biomasa cortada se trata con alta presión de vapor saturado y entonces hace que el material sufra una descompresión explosiva. La explosión de vapor se realiza a temperaturas entre 160 – 260 °C (corresponde a presiones 6.9 – 48.3 bar) durante varios tiempos en minutos o segundos antes que se exponga el material a la presión atmosférica. El proceso causa degradación de la hemicelulosa y transformación de lignina debido a las altas temperaturas aumentando así el potencial de hidrólisis de la celulosa.

Los factores que afectan la hidrólisis son tiempos de residencia, temperatura, tamaño de la astilla y volumen húmedo. La óptima solubilidad de la hemicelulosa y la hidrólisis puede ser lograda por cualquier temperatura alta y tiempo de residencia corto (270 °C, 1 min) o temperaturas más bajas y el tiempo de residencia más largo (190 °C, 10 min). (Duff, S. J. B., Murray, W. D., 1996). Los recientes estudios indican que la temperatura más baja y el tiempo de residencia mas largo son más favorables. El proceso es más efectivo para maderas duras y residuos agrícolas, pero es menos efectivo para maderas blandas, las limitaciones de explosión de vapor incluyen una destrucción de una porción del fragmento xilano, ruptura incompleta de lignina-carbohidratos, y generación de compuestos que pueden ser inhibidores para los microorganismos durante la fermentación.

Recientemente se desarrollan procesos usando condiciones menos severas y logrando alto rendimiento de conversión del xilano a xilosa. Lograr altos rendimiento de xilosa en la conversión es necesario económicamente favorable para el proceso global porque el xilano es en porcentaje el tercer hidrato de carbono de muchos materiales lignocelulósicos. Hay dos tipos principales de hidrólisis con ácido diluido:

- ✓ Temperaturas altas mayores que 160 °C proceso continuo, para sólidos que tiene 5-10 % en peso de sustrato/peso total.
- ✓ Temperaturas bajas menores de 160 °C, proceso batch para sólidos de alta carga 10-40 %. (Cahela, D. R., Lee, Y. Y., Chambers, R. P., 1983).

Se necesita una neutralización del pH para utilizar el sólido en un proceso enzimático, el líquido también se debe neutralizar si es necesario para un proceso fermentativo.

1.4.3 Factor de Severidad

El uso de un factor de severidad Log (FS) ecuación 1, facilita la comparación de los resultados del tratamiento térmico a diferentes condiciones de una manera normalizada, donde se combinan la variable temperatura y variable tiempo de residencia en una sola ordenada de la reacción. (Kerstin Stenberg y Charlotte Tengborg, 1997).

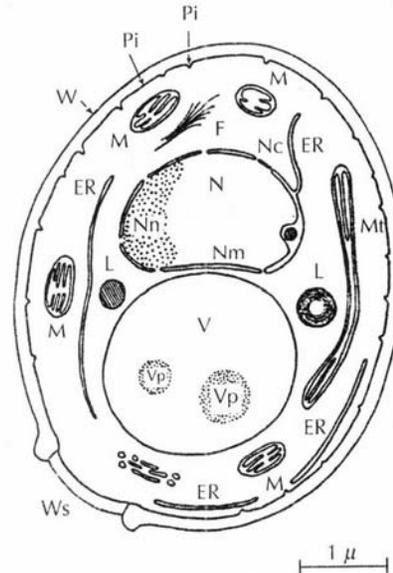
$$\text{Log (FS)} = \text{Log} \left(t \cdot \exp \left(\frac{T - T_{\text{ref}}}{14.75} \right) \right) \quad \text{Ec. 1}$$

Donde (t) tiempo de residencia (min), la temperatura (T) del pretratamiento (°C) y la T_{ref} temperatura de referencia que esta fija en 87°C. (Overend, R. P. y Chorent, 1987). Si se mantiene el factor de severidad de tiempo y temperatura se obtienen efectos finales equivalentes. Aunque la degradación de hemicelulosa y celulosa en la fase del pretratamiento involucra una serie compleja de reacciones, la asunción de un pseudo-primer orden de la reacción da resultados razonables. (Chum y Johnson, 1990).

1.5 Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares que producen colonias opacas, cremosas o pastosas. La reproducción vegetal tiene lugar habitualmente por gemación. En comparación con los otros grandes grupos de microorganismos, las levaduras presentan escasa diversidad (39 géneros, 350 especies). No constituyen una unidad taxonómica propiamente dicha. Este grupo está formado por especies relacionadas con distintos grupos de hongos está formado por especies relacionadas con distintos grupos de hongos filamentosos. Muchos hongos pueden presentar dos fases: micelias y unicelular.

Las levaduras sólo se presentan en forma de células aisladas o, como mucho, pseudomicelios. En la Figura 10 se representa un diagrama de una célula de levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*). Las levaduras se siguen considerando separadamente de los hongos en función de su mayor actividad metabólica (moles $\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), de su crecimiento más rápido y de su mayor efectividad como biocatalizadores. Su manipulación en el laboratorio es similar a la de las bacterias y pueden aplicarse a ellas el principio del cultivo puro. Su distribución en la naturaleza es parecida a la de las bacterias.

Figura 10. Diagrama de una célula de levadura *S. cerevisiae*

ER indica retículo endoplasmático; F, filamentos; G, aparato de Golgi; L, gránulo de lípidos (esferosoma); M, mitocondrias; Mt, mitocondrias filiformes; N, núcleo; Nc, placa centriolar; Nm, membrana nuclear; Nn, nucleolo; Pi, invaginación; Pl, plasmalema; V, vacuola; Vp, gránulo de polimetáfosfato (volutina); W, pared celular; y Ws, cicatriz de gemación.

Fuente: Ramon Pares y Farras y Antonio Juárez Jiménez "Bioquímica de los microorganismos" (Editorial Reverte, S.A., 1997)

1.5.1 Características morfológicas generales

Las características generales de las levaduras por las que se las diferencian entre sí son más bien fisiológicas que morfológicas. La reproducción vegetal tiene lugar habitualmente por gemación como se observa en la Figura 11, también se reproducen de manera sexuada formando ascosporas o sólo asexualmente por gemación o división binaria. El tipo de sexualidad puede ser homoláctica o heteroláctica y da por resultado la formación ya sea de cuatro o de ocho esporas en saco que recibe el nombre de asco, de ahí el nombre de ascosporas (Julian, 2001). Las levaduras tienen forma elíptica, aunque algunas veces son alargadas o esféricas, una de las especies tiene forma característica, pero aun en los cultivos puros, las células ofrecen notable variedad en el tamaño y la forma, según la edad del cultivo y el medio en que se desarrolla su tamaño es mayor que el de las bacterias, pueden medir entre 1 y 5 micras de ancho por 5 a 30 micras o más de longitud.

Figura 11. Gemación de la levadura



Fuente: www.microbiologia.com

1.5.2 Características de cultivo

Las colonias de levaduras tienen diversas formas, textura y tipos de bordes, algunas son lisas otras rugosas, unas planas u otras elevadas, con el borde liso o irregular. La consistencia de las colonias es ligeramente pastosa que al envejecer el cultivo se hace más espesa y compacta.

Las levaduras son comunes en medios ricos en azúcares y húmedos como la superficie de las plantas y frutas pero también en suelos y hábitats acuáticos. (Julian, 2001)

La morfología de las levaduras puede observarse microscópicamente en frotis coloreados mediante tinciones simples de manera indirecta o directamente tomando el inóculo del medio de cultivo líquido hacia el portaobjetos luego cubrir con un cubreobjetos.

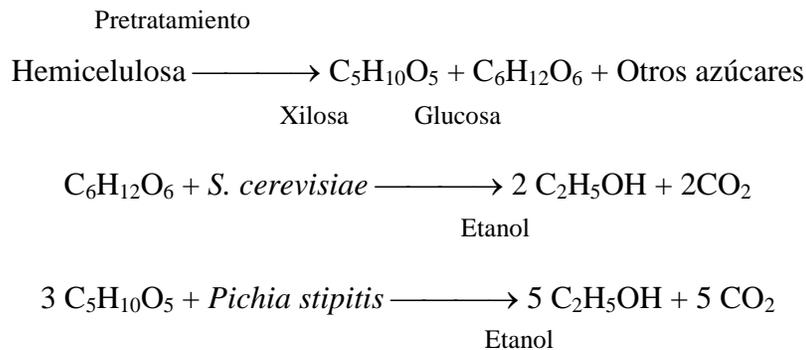
1.5.3 Reproducción de las levaduras

Se reproducen por ascosporas o sólo asexualmente por gemación o división binaria. En observación microscópica se las distinguen a primera vista de las algas por no poseer pigmentación verde, de los protozoos por presentar pared rígida y ser inmóviles, y de las bacterias por presentar un tamaño mucho mayor ya que las levaduras son organismos eucariotas. La mayoría de las levaduras se reproducen principalmente mediante gemación, la célula madre forma una zona de crecimiento hacia el exterior, la que finalmente se separa como célula hija como se observa en la Figura 20 (Julian, 2001)

1.6 Fermentación

Como principio de la fermentación de líquidos neutralizados de azúcar de madera la cual como primera etapa se tiene es ciertamente difícil, salvo en condiciones especiales. La dificultad proviene de dos causas principales: una es, por el intenso tratamiento químico a que ha sido sometida la madera, las sustancias orgánicas que pudieran actuar como factores de crecimiento o como nutrientes de la levadura han sido destruidas; la otra causa consiste en que en el mosto se encuentran presentes, como productos de descomposición de la hidrólisis, cuerpos tóxicos o compuestos fenólicos para la levadura; entre éstos podemos citar el furfural y el hidroximetilfurfural (HMF).

En una etapa posterior, del pretratamiento se obtiene una solución de azúcares fermentables que contienen principalmente glucosa, así como pentosas resultantes de la hidrólisis inicial de la hemicelulosa. Estos azúcares son posteriormente convertidos en etanol mediante microorganismos que pueden utilizar uno o varios azúcares presentes en el material lignocelulósico pretratado e hidrolizado. Este complejo proceso puede ser representado por las siguientes reacciones en el caso de la fermentación alcohólica:



El microorganismo mas utilizado para este proceso es *Saccharomyces cerevisiae* que al fermentar las hexosas presentes en el hidrolizado mas no las pentosas genera calor representado en la siguiente reacción. Los rendimientos de azúcar y productos se calculan basados en la cantidad de material crudo seco usado en la fase del pretratamiento (g/100). El rendimiento del etanol se calcula basado en la cantidad de azúcares fermentable por *S. cerevisiae*, manosa y glucosa, presente al principio de fermentación (g/g). La fermentabilidad también es evaluada calculando la media proporción de producción de etanol ($\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) durante las dos primeras horas de fermentación, excluyendo la fase de latencia.

1.6.1 Características de la Fermentación

El tipo de fermentación específica que se lleva a cabo es fermentación alcohólica y los episodios efectuados durante la fermentación son los siguientes:

- Proceso redox anaerobio.
- ATP: fosforilación a nivel del sustrato, acoplado a la oxidación del sustrato.
- El transporte de electrones al aceptor no se acompaña de producción de energía
- Compuestos altamente reducidos ej. (Hidrocarburos) u oxidados: no adecuados a fermentaciones (usados por Jiménez Zión).
- Mucha energía de la glucosa se pierde en la fermentación o se conserva en “productos de desecho”.
- Regeneración del NAD⁺ por transferencia de e desde NADH a piruvato.
- Diversidad metabólica: representado en la siguiente reacción
 - Vías de utilización de azúcares (común a las respiraciones).
 - Destinos del piruvato y productos de reducción.

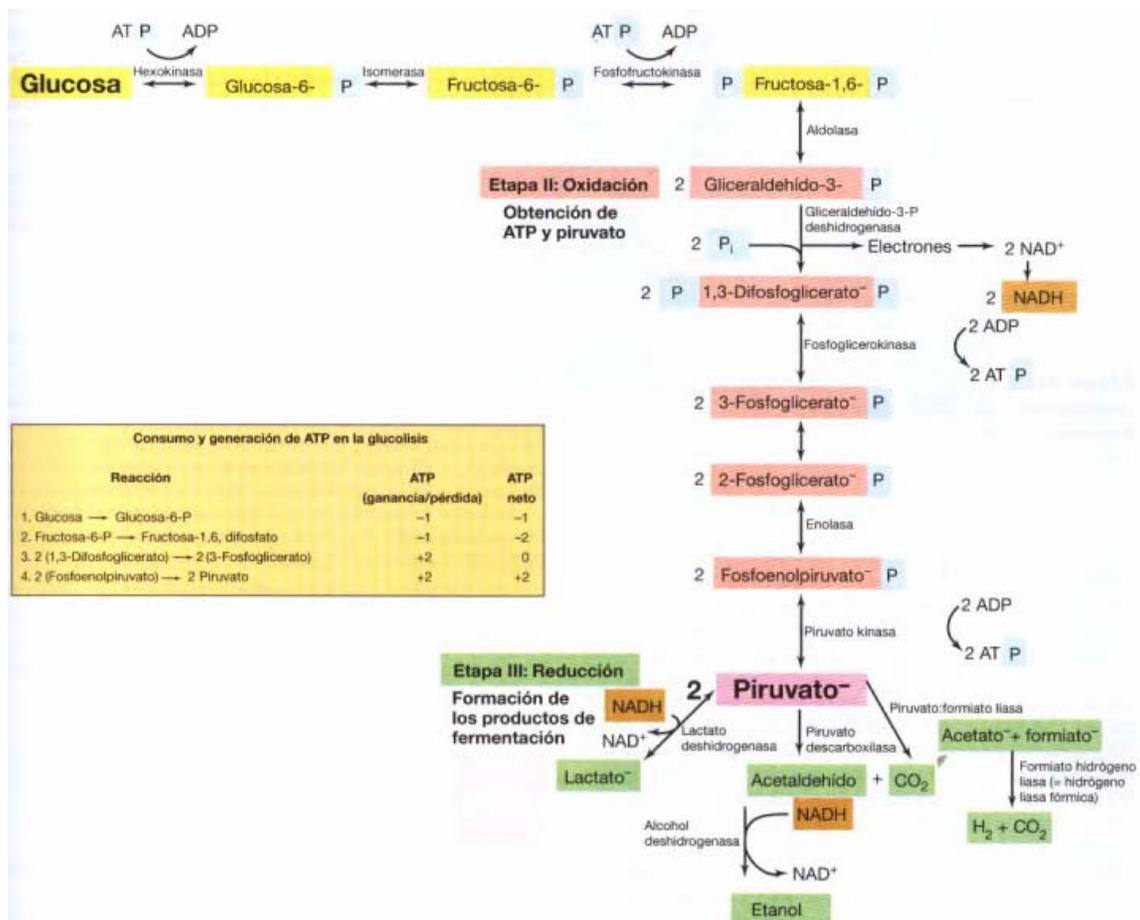
La levadura es el microorganismo utilizado para la obtención del etanol como la *Saccharomyces cerevisiae*, que convierte las hexosas en etanol en condiciones anaeróbicas, generando 2 moles del compuesto portador de energía en los seres vivos, el adenosín trifosfato (ATP), por cada mol de hexosa consumida. (Pares I Farras R. y Juárez Giménez A., 1997) Además de 2 moles de etanol. Las levaduras tienen la ventaja adicional de tolerar concentraciones relativamente altas de etanol (hasta 150 g/L). Se han evaluado otros microorganismos con capacidad de hidrolizar la celulosa, de asimilar pentosas y de trabajar en condiciones termofílicas, ya que el incremento de la temperatura acelera los procesos metabólicos y disminuye las necesidades de refrigeración. Entre los microorganismos de este tipo se encuentran levaduras como *Pichia stipitis*, *Candida Shehatae* y *Pachysolen tannophilus*, pero su tasa de producción de etanol a partir glucosa es menor a la observada para *S. cerevisiae*. (Echegaray, O, Carvalho J, Fernández A. 2000)

1.6.2 Reacciones Bioquímicas en la Fermentación

1.6.2.1 Biosíntesis de Etanol

Se produce en condiciones anaerobias, el piruvato producido durante el catabolismo es procesado por la piruvato descarboxilasa a acetaldehído y CO₂, se produce entonces etanol a partir de acetaldehído mediante la reducción por alcohol deshidrogenasa, Figura 12. Los sistemas discontinuos para la producción de etanol se inicia aeróbicamente para obtener la máxima biomasa, ya que si las condiciones anaeróbicas comienzas demasiado pronto la densidad de población no será lo suficiente alta para obtener una buena velocidad de conversión. Puede ser incluso necesaria la aireación forzada durante un tiempo corto a fin de evitar perdidas de rendimiento. (Pares I Farras R. y col, 1997)

Figura 12. Biosíntesis del etanol

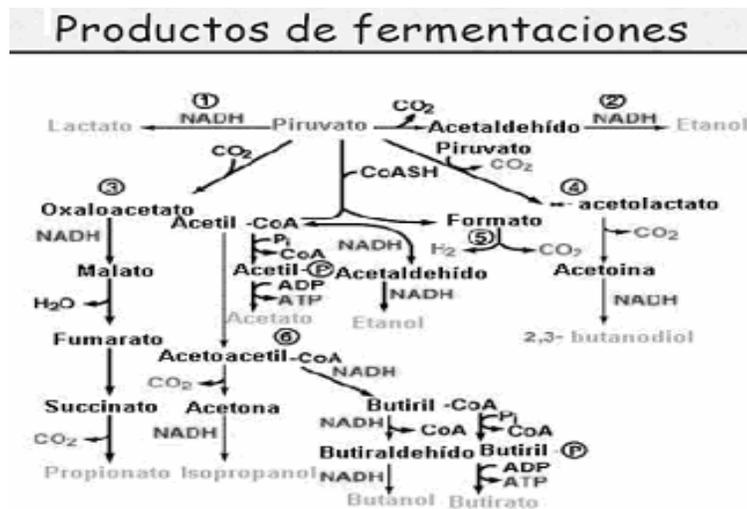


Fuente: Michael T. Madigan y col, 2004

1.6.2.2 Productos generados durante la Fermentación

Los subproductos producidos durante la fermentación ejemplo; el ácido butírico, el butanol, la acetona y el isopropanol se obtienen a partir de la fermentación de hidrolizados de la madera y pentosas como se observa en la Figura 13. El butanol al que nos referimos aquí es enteramente n-butanol. También se producen hidrógeno y anhídrido carbónico. El organismo origina un rendimiento neto de 2 ATP en las etapas desde glucosa a piruvato y esta es la energía total liberada cuando no se produce ácido acético. El butanol, a una concentración de menos del 0,5 % no tiene influencia sobre las células, mientras que a concentraciones mayores causa daño a los fosfolípidos de las membranas celulares; a concentraciones por encima de 1,3 % la producción de butanol cesa. El anhídrido carbónico producido durante la fermentación se recupera y se convierte en CO₂ líquido o en hielo seco. La acetona, el butanol se recupera mediante destilación continua y fraccionamiento. El residuo después de la destilación puede ser desecado y utilizado como pienso para animales.

Figura 13. Metabolitos producidos durante la fermentación



Fuente: www.metabolismo.com

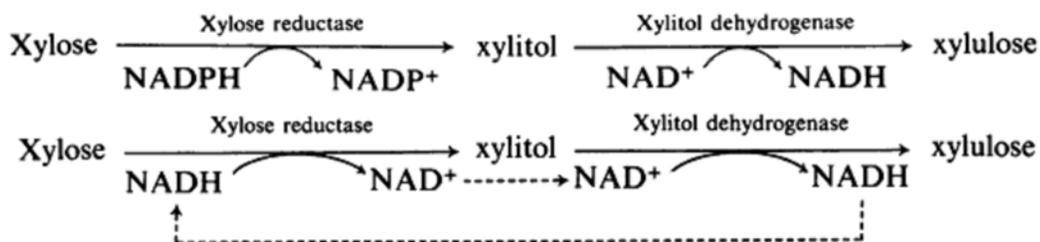
El glicerol, es formado por las levaduras junto con el etanol durante la fermentación alcohólica normalmente la cantidad de glicerol es mínima, pero modificando el balance de la fermentación, puede aumentar fuertemente la cantidad de glicerol producida. Normalmente el NADH₂ formado durante la primera parte de la glicólisis se reoxida mediante el acetaldehído para formar etanol, pero si el acetaldehído se elimina por formación de un complejo con sulfito, el NADH₂ queda disponible

para la reducción de la dihidroxiacetona fosfato (que también se forma durante la glicólisis). La producción de ácido acético, es una oxidación incompleta más que una auténtica fermentación, debido a que el poder reductor que se produce se transfiere al oxígeno. La primera etapa de oxidación a partir de etanol conduce a acetaldehído mediante una alcohol deshidrogenasa específica de NAD⁺ a NADH. Existe luego una hidratación a acetaldehído hidratado y una segunda oxidación con acetaldehído deshidrogenasa a ácido acético como se muestra a continuación, durante la oxidación se produce 1 mol de ácido acético por 1 mol de etanol.

La biosíntesis de ácido láctico, a partir de glucosa procede vía gliceraldehído-3-P, 1,3 di-P-glicerato y piruvato. El poder reductor producido durante la oxidación del gliceraldehído fosfato se transfiere por una lacto deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ a piruvato, que es reducido estereoespecíficamente a ácido L(+) o D(-) láctico

1.6.3 Fermentación de Pentosas

En los recientes años mucho trabajo se ha consagrado a encontrar los micro-organismos que fermentan las pentosas directamente a etanol. La levadura *Pichia stipitis* parece ser muy eficaz; sin embargo hasta ahora ninguna ha alcanzado el rendimiento, productividad y concentración del producto encontradas con la *Saccharomyces cerevisiae* al fermentar las hexosas aunque el consumo de estos dos azúcares por la *P. stipitis* según la ruta metabólica propuesta en la Figura 14, son paralelamente metabolizadas la única diferencia que existe es que el consumo de glucosa es menor que cuando se consume xilosa para producir etanol (Kolot, F.B., 1980.) Además, la mayor parte de las investigaciones para fermentar las pentosas, se concentraron en utilizar levaduras con sustrato sintético de pentosas, donde se dieron a conocer la participación primordial de las enzimas la xilosa reductasa y el xilitol deshidrogenasa así como también de los cofactores.

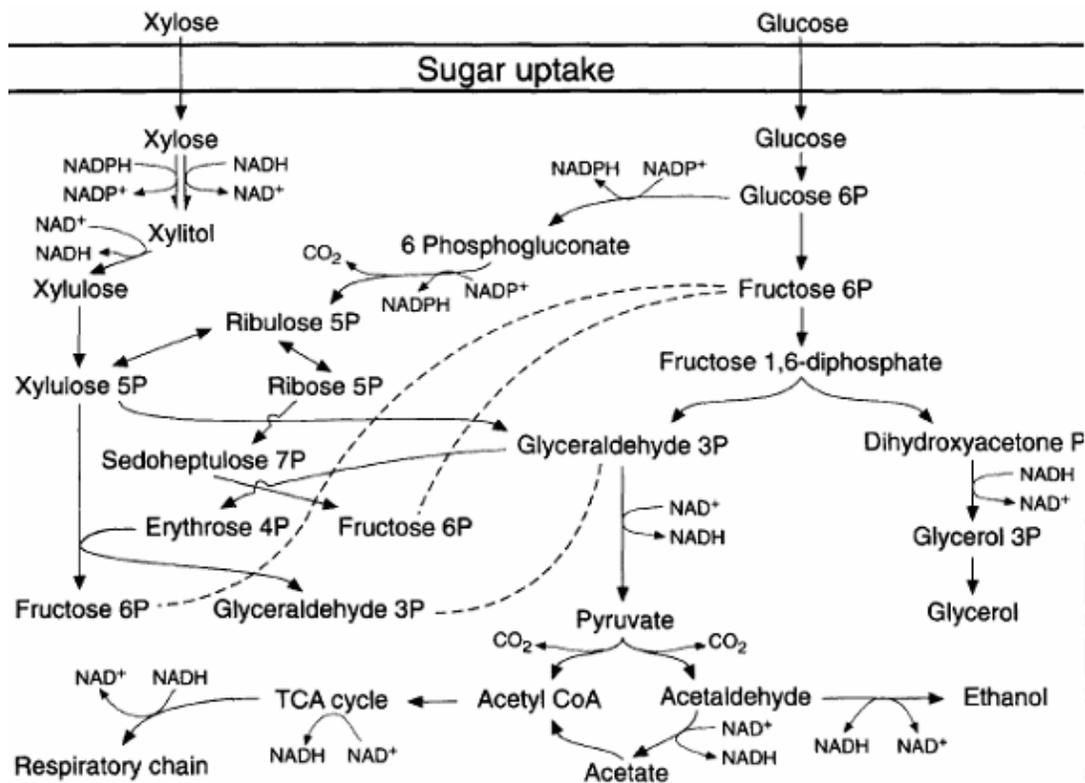


Fuente: Cornelis VERDUYN,* Ronald VAN KLEEF y col, 1985

El material hidrolizado lignocelulósico pretratado cuando se ha usado, el consumo de estos sustratos por las levaduras ha sido inferior (Watson, N.E., Prior, B.A. 1984) en las primeras investigaciones después se continuo con las líneas de investigación encontrando que a la *Pichia stipitis* se la puede adaptar al medio de cultivo que contenga xilosa y glucosa desde un principio para que sea efectiva en la fermentación, se realizaron estudios de diferentes levaduras evaluando el comportamiento y la respuesta frente a diferentes condiciones de sustrato y oxígeno.

La *S. cerevisiae* no puede fermentar xilosa pero puede fermentar su producto de isomerización. La xilosa-isomerasa se obtiene de una enzima bacteriana, esta enzima es comercialmente usada para isómeros de la fructosa, lo cual hace otro tipo de investigación genéticamente.

Figura 14. Ruta metabólica de la xilosa y la glucosa por la levadura fermentadora de xilosa (*Pichia stipitis*)



Proposed pathway for the metabolism of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeasts

Fuente: Winkelhausen Eleanora and Kuzmanova Slobodanka, Microbial Conversion of D-Xylose to Xylitol Faculty of Tecnology and Metalurgy, 1998.

1.6.4 Influencia del Oxígeno en la fermentación

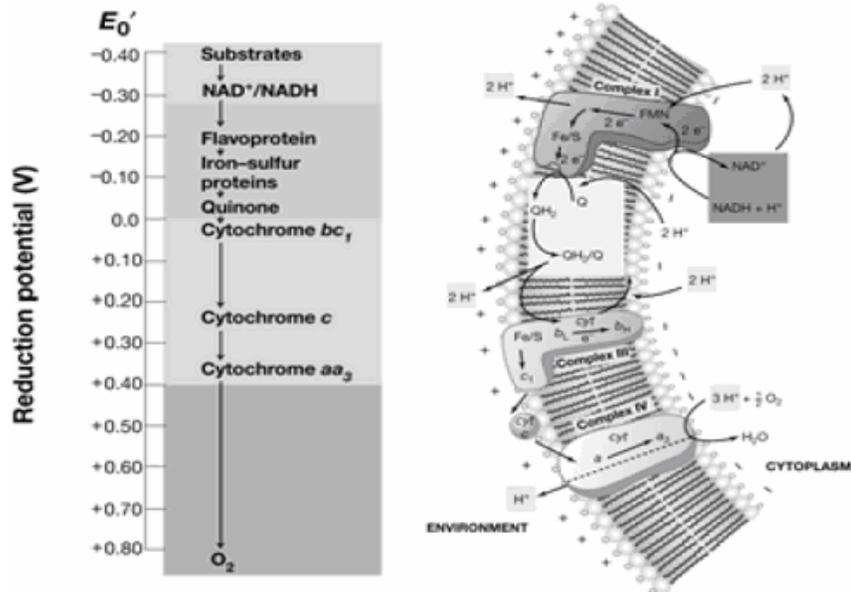
La levadura *Pichia stipitis* fermenta directamente la xilosa a etanol requiriendo para ello un nivel de oxigenación muy bajo pero a su vez sumamente bien controlado para la producción óptima de bioetanol; por otra parte una fracción considerable del sustrato de xilosa es convertido al subproducto denominado xilitol. Se han hecho numerosos esfuerzos para establecer el nivel de la oxigenación óptima para la producción máxima de etanol en levaduras, siendo entre ellos, la oxigenación limitada, donde se observa la variación del radio del volumen de cultivo del matraz erlenmeyer con relación a la agitación y rangos de rotación del mismo experimento. (Watson, 1984) El rango específico de oxígeno consumido. (Cheng y col, 1986) Los rangos de transferencia de oxígeno. (Skoog y col, 1989) La tensión de oxígeno disuelto. (du Prez y col, 1989) La única conclusión de estos estudios, determina que la oxigenación para este microorganismo es necesaria para la producción máxima de etanol, y que este nivel se encuentra en un valor muy bajo, a la fecha ya se tiene datos con una producción máxima de etanol en glucosa y xilosa 0,35 y 0,13 g/gh respectivamente y el flujo máximo de oxígeno proporcionado es 0,005 mol/Lh. (D.R.J. Grootjen y col 1990)

1.6.5 Influencia del oxígeno en la reproducción de la levadura

1.6.5.1 Respiración aerobia

El proceso de obtención de energía en el cual un compuesto se oxida y el oxígeno u otro aceptor terminal de electrones externo a la célula se reduce como se ve en la Figura 15.

Figura 15. Respiración aerobia de la célula “Cadena de transporte de electrones de electrones y generación de fuerza protón–motriz”



Fuente: Michael T. Madigan y col, 2004

Flujo de electrones en la respiración:

- Electrones del NADH, FADH₂ pasan a una quinona (CoQ) luego a los citocromos y a un aceptor terminal de electrones
- O₂ en respiración aerobia.

La energía liberada en cada paso crea un gradiente electroquímico (fuerza motriz de protones, FMP): la diferencia de potencial se usa en trabajo. En la fosforilación oxidativa la síntesis de ATP usa energía (FMP) para catalizar la reacción: $\text{ADP} + \text{P}_i = \text{ATP}$

1.6.6 Tolerancia al Etanol

La levadura *Pichia stipitis* exhibe una tolerancia baja al etanol (du Prez, J. C. y col, 1989) En vista de una reciente investigación que relaciona los efectos de etanol a la toxicidad de una acumulación intracelular de etanol. (Jones, R. P. 1989) Uno podría especular que se relaciona la tolerancia del etanol bajo la fermentación de la xilosa, las levaduras al hecho que el oxígeno es un requisito previo para el formación del etanol para la *P. stipitis*, ha sido observado que hay un equilibrio entre la formación del etanol y consumo oxígeno las condiciones limitadas. (Lohmeier-Vogel y col, 1989)

1.6.7 Los Inhibidores

Los inhibidores microbianos potenciales presentes en el hidrolizado de material lignocelulósico son numerosos; el ácido acético, furfural, fenolitos, ácidos aromáticos y neutralización. Todavía los inhibidores desconocidos permanecen sin ser identificados, y se espera que los inhibidores actúen sinérgicamente. Además, el efecto inhibitorio se relaciona a la cantidad de células usada en fermentación. Hay dos maneras de minimizar los efectos inhibitorios presentes de un hidrolizado de material lignocelulósico: Primero con un pretratamiento previo para quitar los inhibidores, por ejemplo, intercambio iónico de resinas y detoxificar la alimentación. (Lohmeier-Vogel y col, 1987) Segundo adaptación de la alimentación. (Lohmeier-Vogel y col, 1986)

1.6.8 Crecimiento Microbiano

Para poder tener crecimiento microbiano, desde el punto de vista de la fermentación, es necesario que se cumplan varios requisitos tanto de tipo biológico como fisicoquímico. En primer lugar es necesario tener un cultivo en condiciones adecuadas, es decir, células en estado vegetativo o esporas susceptibles de reproducirse. Para ello es menester conservar adecuadamente las cepas en el laboratorio y es recomendable que cada 3 a 4 meses las cepas almacenadas sean transferidas a nuevos medios.

El microorganismo requiere para su crecimiento de una fuente de energía y de fuentes de materia. En la mayoría de las fermentaciones industriales la fuente de energía y la de materia son las mismas, pero es necesario que la fuente de materia contenga todos los elementos constitutivos de la masa celular en las proporciones requeridas por la composición interna del organismo.

1.6.9 Cultivo por Lotes Alimentado (CLA).

1.6.9.1 Aspectos Generales

Esta modalidad de fermentación presenta características muy peculiares, que hacen atractiva su aplicación a una variada gama de procesos de fermentación. Básicamente es una operación

discontinua durante la cual los nutrientes o parte de ellos se alimentan al fermentador mediante una corriente de alimentación y que al no existir una corriente de descarga se produce una variación continua del volumen de fermentación. Las condiciones iniciales de un cultivo por lotes alimentado se logran a través de una etapa previa obligatoria de cultivo por lotes, una vez alcanzada las condiciones iniciales previstas se inicia la alimentación y con esto el comienzo del cultivo por lotes alimentado.

1.6.9.2 Tipos de Alimentación

Para su crecimiento los microorganismos requieren de nutrientes adecuados, aparte de condiciones ambientales favorables. Si se fija la atención en el consumo del nutriente limitante, se verá que la velocidad con que las células lo utilizan es directamente proporcional a la velocidad específica de crecimiento (μ), a la concentración celular (X) y al volumen de cultivo (V), definidos en un instante, e inversamente proporcional al rendimiento en células del sustrato limitante ($Y_{X/S}$). Esta velocidad de consumo corresponde a una demanda de nutrientes y se puede representar por la siguiente expresión:

$$\text{Velocidad de Consumo} = \frac{\mu * X * V}{Y_{X/S}} \text{ (g/h) (demanda)} \quad \text{Ec. 2}$$

La ecuación 2 muestra que para un sustrato y masa celular dada, esta demanda podrá ser mayor o menor dependiendo del valor de la velocidad específica de crecimiento. Bajo estas condiciones el máximo valor de la demanda corresponderá cuando los microorganismos se encuentren en crecimiento a su máxima velocidad específica de crecimiento.

La velocidad de alimentación corresponde a una oferta de nutrientes y se representa por la siguiente expresión:

$$\text{Velocidad de Alimentación} = F - S_F \text{ (g/h) (oferta)} \quad \text{Ec. 3}$$

Así definidas la demanda y oferta de nutrientes se tendrá en general, desde el punto de vista de la velocidad específica de crecimiento del microorganismo, dos situaciones:

- a) Si la oferta es igual o mayor que la demanda máxima, la masa celular crecerá a su velocidad específica de crecimiento máximo (μ_M).

- b) Si la oferta es menor que la demanda máxima, la masa celular crecerá a una velocidad específica menor que la máxima.

1.6.9.3 Ecuaciones Generales del CLA

Para plantear en forma simple los balances de materia del sistema, se tendrá en consideración las siguientes suposiciones. (Yamané e Hirano y col, 1977)

- a) El rendimiento en células del sustrato limitante ($Y_{X/S}$) es constante durante toda la fermentación. El crecimiento es balanceado, vale decir que la replicación es asincrónica y el metabolismo no se relaciona directamente con la edad del cultivo.
- b) El aumento de volumen en el reactor es igual al volumen de solución nutriente alimentada. A través de plantear los diferentes balances de materia, se llega a las siguientes ecuaciones que permiten definir la dinámica del sistema:

- ✓ Velocidad de cambio del volumen de cultivo:

$$\frac{dV}{dt} = F(t) \quad \text{Ec. 4}$$

- ✓ Velocidad de cambio de la masa total de microorganismos en el fermentador:

$$\frac{d(VX)}{dt} = \mu * X * V \quad \text{Ec. 5}$$

- ✓ Velocidad de cambio de la cantidad total de sustrato limitante en el fermentador:

$$\frac{d(SV)}{dt} = F * S_F - \frac{\mu * X * V}{Y_{X/S}} \quad \text{Ec. 6}$$

La cuarta ecuación del sistema la constituye la relación de Monod, la cual expresa la funcionalidad de μ con respecto a la concentración del sustrato limitante.

$$\mu = \mu_M \frac{S}{K_S + S} \quad \text{Ec. 7}$$

Es necesario definir una de las variables para poder resolver las 4 ecuaciones con 5 incógnitas.

III. JUSTIFICACION

El aumento del precio de venta del petróleo provocó un profundo impacto sobre los países importadores del recurso y despertó un interés en los procesos de producción de bioetanol por fermentación para ser adicionado como suplemento oxigenado. En la actualidad alrededor del 90 % de las necesidades energéticas de nuestro planeta son satisfechas con la con la utilización de combustibles fósiles (petróleo, gas y carbón), todos ellos no renovables y fuertemente contaminantes de tipo ambiental lo cual ha acrecentado la necesidad de realizar diferentes investigaciones en la búsqueda de nuevos aditivos oxigenados que ayuden a la disminución de las emisiones gaseosas negativas.

Bolivia es uno de los países ricos en recursos energéticos, sin embargo existe la preferencia de exportación de los mismos por razones de economía. No obstante, a raíz de los cambios socioeconómicos de los últimos años el crecimiento poblacional en centros urbanos y las necesidades de exportación, han permitido el desarrollo de industrias agroalimentarias, etc. Dando lugar a la contribución en la generación de residuos agrícolas (lignocelulosicos), sin utilidad los mismos al no ser gestionados convenientemente puede provocar problemas ambientales en el futuro. Por tanto, Bolivia un país maderero con la mayor cantidad de bosques acreditados en el ámbito mundial y con gran disponibilidad de residuos de aserrín, los cuales actualmente ocasionan problemas de contaminación, resulta interesante utilizar estos residuos para producir bioetanol, a la vez que se estaría contribuyendo a minimizar tanto los problemas de la crisis del petróleo, como energía alternativa y ayudar en la difícil tarea de disminuir el calentamiento global.

En el presente trabajo se han desarrollado mecanismos de optimización para procesos fermentativos en la mejora de producción de bioetanol. La investigación en la utilización de microorganismos fermentadores de pentosas, fuentes de carbono provenientes de diversos hidrolizados como es el caso de las cepas *Pichia stipitis* CBS 5770, 5773 y 6054 además de la optimización en el mejoramiento de las condiciones de cultivo de las mismas, así como su adaptación en medios ricos en xilosa (sintéticos e hidrolizados de *Curupaú*) basado en la obtención de etanol representan una posible alternativa bioenergética atrayente en Bolivia.

IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar las condiciones óptimas del cultivo de las cepas *Pichia stipitis* CBS 5770, 5773 y 6054 para la producción de bioetanol a partir del aserrín de *Curupaú* como residuo lignocelulósico.

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer y optimizar el proceso de hidrólisis acida del aserrín de *Curupaú* basándose en estudios preliminares.
- Optimizar las condiciones físico-químicas del medio de cultivo, aireación y concentraciones de sustrato mixto (glucosa y xilosa), respectivamente para incrementar la biomasa de las cepas *Pichia stipitis* CBS 5770, 5773 y 6054. Seleccionar una cepa *Pichia stipitis* con el mejor rendimiento en la producción de biomasa para realizar el escalamiento en las condiciones optimizadas en un fermentador de 2.5 litros.
- Establecer cultivos batch de la cepa *Pichia stipitis* seleccionada para la producción de bioetanol a partir del hidrolizado de aserrín de *curupaú* en base a las condiciones físico-químicas optimizadas.

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

1. METODOLOGÍA DE EXPERIMENTACIÓN

1.1 Métodos Analíticos

1.1.1 Cuantificación de la composición del hidrolizado de aserrín de *Curupaú*

La cuantificación de la composición del hidrolizado de aserrín de *Curupaú* se realizó mediante los análisis, en un cromatógrafo de líquidos (HPLC) ver anexo B. Agilent serie 1100 dotado de dos detectores, Índice de refracción y un detector espectro en el rango ultravioleta-visible.

La separación de los diferentes componentes del efluente del reactor se realizó con la columna BioRad H87X utilizando como fase móvil una solución de H₂SO₄ para la determinación de azúcares con detector IR, flujo de 0.630 ml/min, temperatura de columna 65 °C y para los productos inhibidores, la longitud de onda empleada para detectar estos compuestos fue de 210 nm ± 50 nm.

La curva de calibración para cada uno de los productos obtenidos del hidrolizado de aserrín *Curupaú* se realizaron mediante la preparación de estándares a diferentes concentraciones referencia (Quispe, 2007) fueron analizados con las lámparas de detectores del UV y IR como ser inhibidores (Ac. Acético, HMF, Furfural) analizadas en la región ultravioleta (UV) y los azucares (glucosa, xilosa, arabinosa) en el IR índice de refracción interna del software, así como los tiempos de retención para cada uno de los compuestos químicos, al analizar cualquier muestra de reacción se comparaban los tiempos de retención de cada uno de los picos obtenidos en el cromatograma, con los registros grabados de los diversos estándares de esta forma fue posible cuantificar e identificar la presencia de los compuestos en el líquido hidrolizado, se presentara en resultados un cromatograma característico obtenido del equipo de análisis, para una muestra de salida del reactor correspondiente a la hidrólisis térmica, podemos ver la presencia de Celobiosa, Glucosa, Xilosa, Arabinosa, Ácido Acético, HMF y Furfural según orden de aparición.

Para la cuantificación de los productos obtenidos por fermentación se realizo con una misma columna BioRad H87X con detector IR y ultravioleta.

1.1.2 Determinación de Sólidos Totales

Se determinaron los sólidos totales para realizar el balance de masa y calcular el rendimiento de la reacción, el procedimiento es el siguiente:

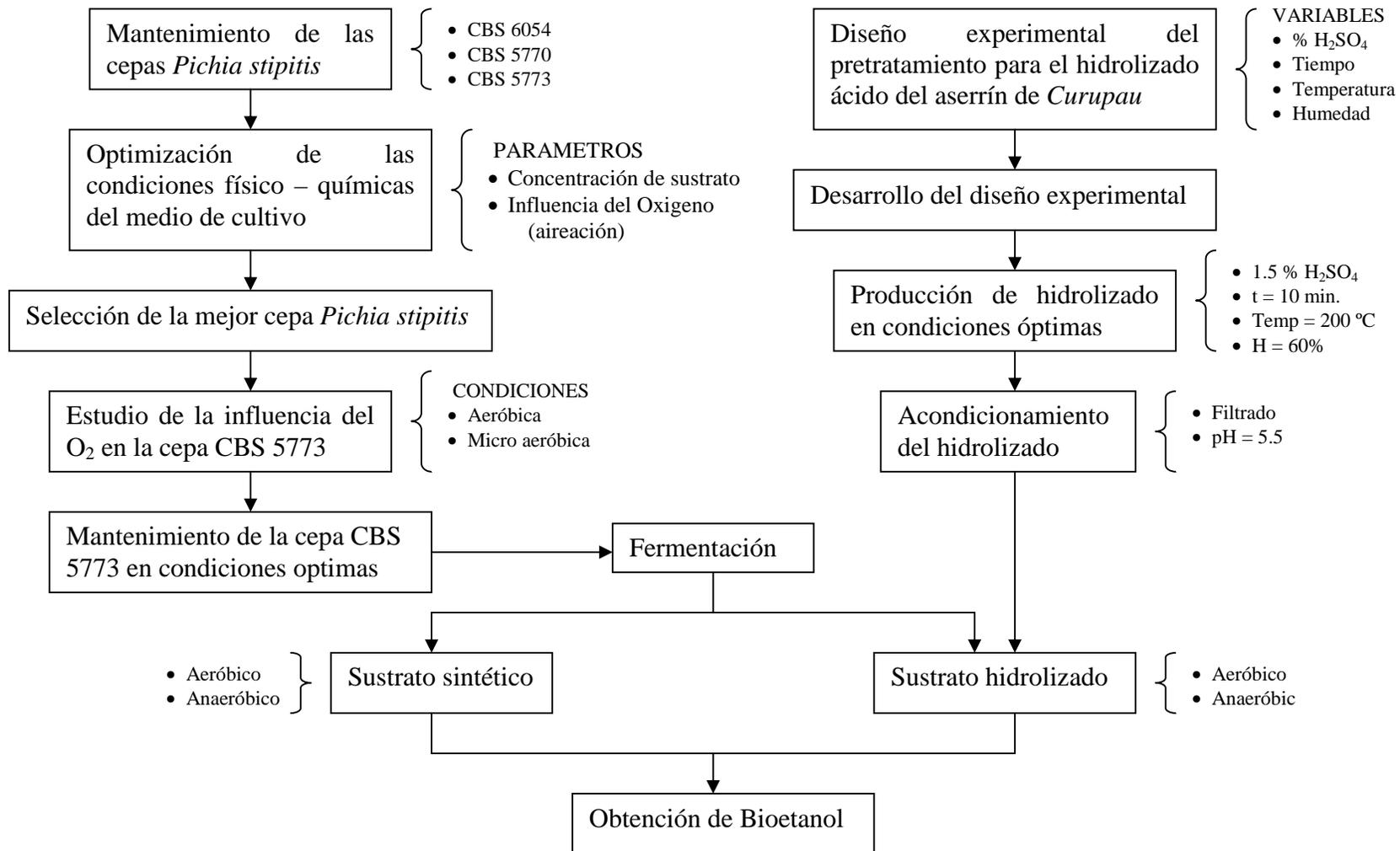
- ✓ Filtra el residuo y pesar
- ✓ Tomar una muestra del sólido, secarlo para calcular su humedad, a 75°C 12 horas hasta peso constante.
- ✓ Poner la muestra en el desecador y pesar.

1.2 Metodología experimental

A continuación en la Figura 16 se presenta un diagrama de flujo del procedimiento que se va a seguir en el proyecto.

Figura 16. Diagrama de flujo del procedimiento.

Fuente: Elaboración propia



1.2.1 Diseño experimental para el pretratamiento del aserrín de *Curupaú*

El pretratamiento realizado para obtener el volumen necesaria de hidrolizado de aserrín de *Curupaú* fue para realizar pruebas experimentales en la fermentación puestas en marcha con las condiciones previamente establecidas referencias (Quispe, 2007) en su proyecto de grado, 1.5 % de H₂SO₄, tiempo de residencia 10 min, 200°C y 60% de humedad, las experiencias fueros desarrolladas en un reactor denominado hidrolizador o generador de vapor (ver anexo B).

1.2.1.1 Toma de Muestras

La muestra se tomara en el lugar de origen aserradero (barraca) MARSA SRL ubicada en la calle 25 de Achumani teniendo antecedentes que la materia prima es Curupaú, aproximadamente tomar en cuatro puntos del lote a distintos niveles de altura, recoger 10 % del total, para tener una muestra representativa. Recolectar la cantidad necesaria en bolsas para este propósito, evitar la contaminación del mismo sellando completamente las bolsas al llevar la muestra. (Ref. Quispe, 2007).

1.2.1.2 Tamizado del Aserrín

Según bibliografía el tamaño de partícula es importante para el pretratamiento físico-químico que se realizara con el aserrín, el rango tamaño de partícula se encuentra 10 mm y 20 mm para un tipo de madera dura, no aplicable para otro tipo de material lignocelulósico. Conservar a -4°C de temperatura con su respectivo código de identificación (ver anexo B).

- ✓ Realizar el tamizado respectivo con un tipo de malla (1.18 mm.)
- ✓ Recoger lo retenido en una bolsa con su respectivo número de malla, también del colector.

1.2.1.3 Lavado del Aserrín

El lavado debe efectuarse con agua destilada a 50°C siendo necesario todos los baños hasta que este último baño tenga un aspecto transparente.

1.2.1.4 Filtrado del Aserrín

Se filtra con trapos para tener la humedad requerida por la experimentación. Se trabajara con dos diferentes muestras de distintas humedades. Controlar la humedad de 40% y otras de 60%.

1.2.1.5 Impregnación con Ácido Sulfúrico

El cálculo de la cantidad de ácido sulfúrico a adicionar se la realiza en base al contenido de agua en la materia prima respecto a la cantidad de agua adicionada en el lavado y que contenía este material en su composición y el posterior ensayo de humedad, siguiendo el procedimiento detallado a continuación. La Tabla 4 se utiliza para determinar la cantidad de agua que se debe añadir de acuerdo a la humedad de la materia prima, por ejemplo si tengo una humedad del 15 % pesar 8.24g de materia prima y para tener una humedad del 40 % debo añadir 3.43g de agua todo esto se realiza en un balanza.(ver anexo B)

Tabla 4. Impregnación del Aserrín con Ácido Sulfúrico.

Humedad Inicial del Aserrín [%]	Masa de Aserrín[g]	Masa de H ₂ O a Añadir [g] *	Masa de H ₂ S0 ₄ al 1.5%
5.00	7.44	10.13	32.50

* La cantidad de agua que se adiciona es para llegar a una humedad del 60%.

Fuente: Elaboración propia (Tabla solo de las condiciones usadas)

1.2.1.6 Determinación de las Variables en Estudio

Tabla 5. Variables de Estudio y Condiciones

Tipo de variable	Nombre	Símbolo	Unidades	Condición optima
Variables dependientes	Azucres fermentables	Az	g/L	---
Variables independientes	Temperatura	T	° C	200
	Tiempo	t	min y h	10
	Concentración Ácido Sulfúrico	Conc. Ac.	% m/m	1.50
	Humedad	H	% m/m	60

Fuente Elaboración propia

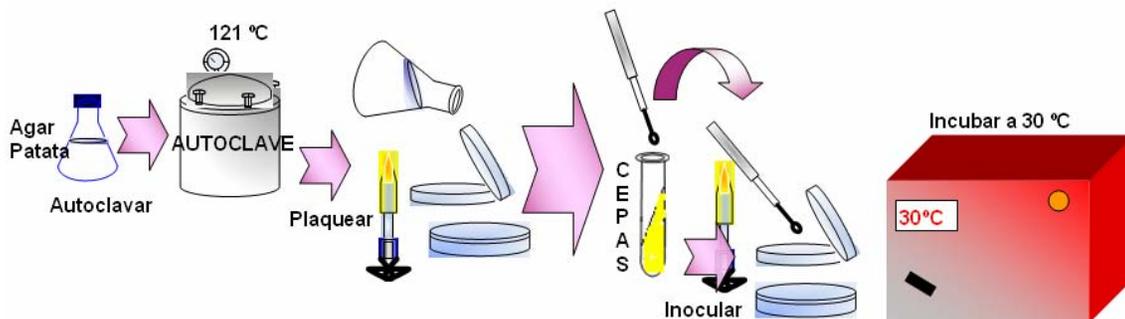
1.2.2 Condiciones de cultivo de las *Pichia stipitis*

Para el proceso de acondicionamiento hacia un determinado medio de cultivo y fermentación se debe tener cuidado cuando se trabaja con levaduras, estas pueden contaminarse y reportar valores errados, se cuenta con las cepas *Pichia stipitis* CBS 6054, 5770 y 5773 las mismas fueron sometidos a diferentes condiciones ya sea aeración (oxígeno) y sustrato (glucosa y xilosa) con constantes resiembras para tenerla pura basado en su mantenimiento ya sea en medio sólido y medio líquido.

1.2.2.1 Método directo (medio sólido)

Se prepara 200 mL de Agar patata dextrosa + 0.05g de tetraciclina sembrar e incubar a 30°C por 48 horas, el procedimiento se representa en la Figura 17.

Figura 17. Procedimiento del método directo.



Fuente: Elaboración propia

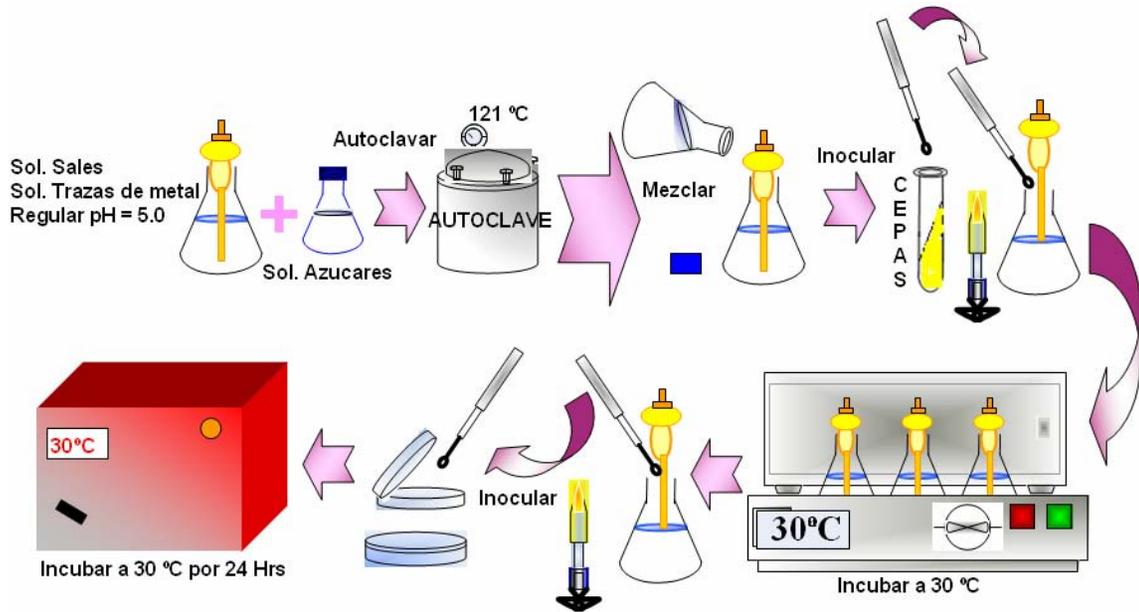
1.2.2.2 Método indirecto (medio líquido)

Se prepara el siguiente medio de cultivo:

- | | | | | |
|---|--|--------|---------------|-------------------------------------|
| • | 7.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 5 mL | } Auto clavar | + Soluciones de Vitaminas
0.1 mL |
| • | 3.5 g/L KH_2PO_4 | 2.5 mL | | |
| • | 0.75 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.8 mL | | |
| • | Solución de Trazas de metal | 1.0 mL | | |
| • | 20 g/L Azúcar | 50 mL | | |

La preparación del inoculo en este medio se auto clava las soluciones de sales y de azúcar separadamente como se detalla en la Figura 18, ajustar el pH de la solución de sales a 5.0 con 2 M NaOH antes de la esterilización, adicionar la solución de vitaminas a través de un filtro de 20 μm Cultivar 100 mL de medio en un shaker a 220 rpm y 30°C por 36 h. (ver anexo B)

Figura 18. Procedimiento método indirecto (preparación del inoculo)



Fuente: Elaboración propia

1.2.2.2.1 Preparado de Soluciones

Preparado de Solución de Trazas de Metal

Ajustar el pH hasta 4.00 con NaOH adicionar agua destilada hasta un volumen de 200 mL. Luego, auto clavar por 121°C y 20 min y colocar la solución dentro del refrigerador. Según los reactivos utilizados y cantidades (ver anexo A).

Preparado de Solución de Vitaminas

Sea diciona 25 mg de d-Biotin en 10 mL de una solución de NaOH 0.1 M. llenar hasta un volumen de 400 mL ajustando el pH a 6.5 con una solución de 10 % en peso de acido sulfúrico, luego adicionar las vitaminas siguiendo la tabla (ver anexo A). Ajustado el pH hasta 6.5 con NaOH, adicionar 12.5 mg m-Inositol y completar agua destilada hasta un volumen de 500 mL aproximadamente y 100 mL mas luego auto clavar.

1.2.2.2 Preparación del inoculo

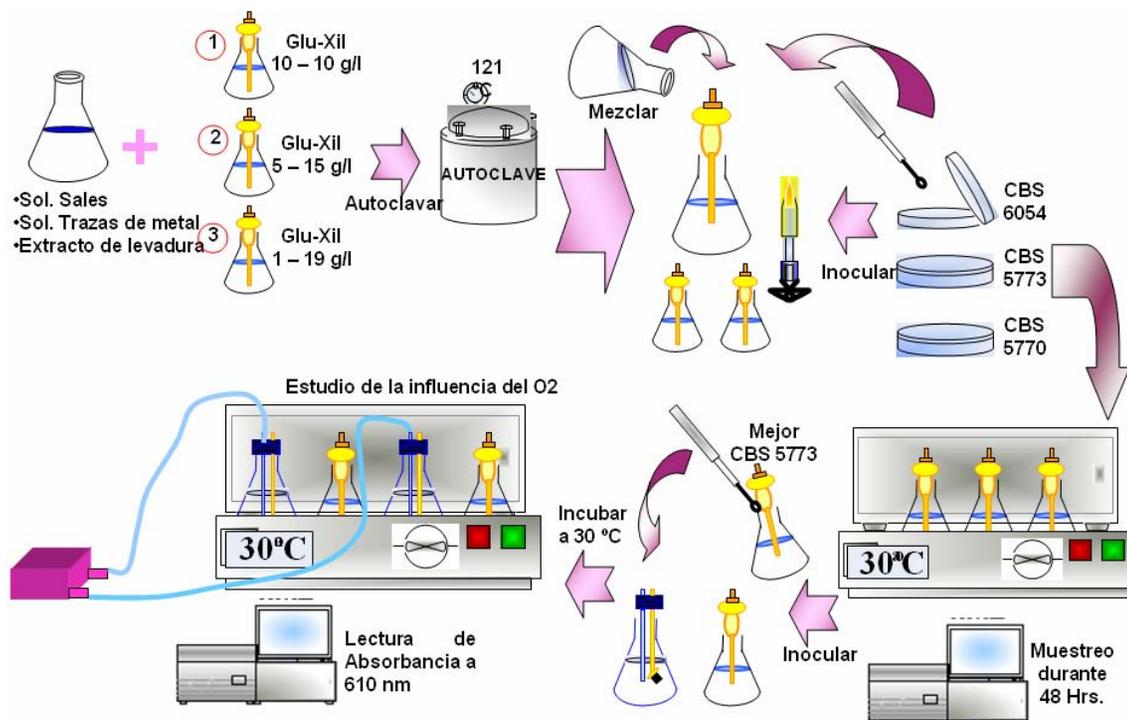
Para los siguientes experimentos la preparación del inoculo se realiza preparando las soluciones de azúcares en 50 mL y en otro 50 mL la solución de sales por separado como se observa en la Figura 19, realizar los cálculos para un volumen final de 100 mL según la Tabla 6.

Tabla 6. Relación de sustrato para un volumen de 100 mL

Nº de Experimento	Glucosa [g]	Xilosa [g]	Concentración de Azúcares [g/L]	Relación de Concentración Experimental
1	1.00	1.00	20	10:10
2	0.50	1.50	20	5:15
3	0.10	1.90	20	1:19

Fuente: Elaboración propia

Figura 19. Procedimiento de experimentos y Cultivos en condiciones de aireación y micro aireación



Fuente: Elaboración propia

Curva de Calibración

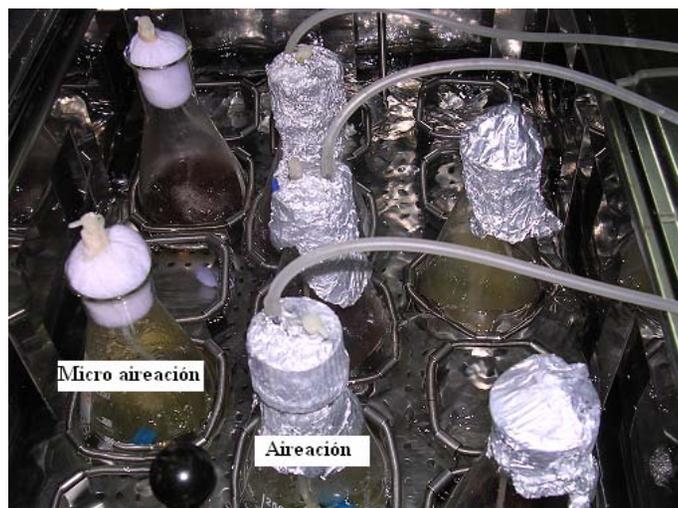
Para realizar las lecturas de las absorbancias se realizó la curva de calibración con extracto de levadura a diferentes concentraciones lectura realizada por el método colorimétrico mediante el espectrofotómetro a 610 nm. longitud de onda. (ver anexo C)

1.2.2.3 Cultivo de la *Pichia stipitis* en sistemas diseñados con aireación y micro aireación

La influencia del oxígeno se pone en marcha mediante dos formas de alimentación a la cepa seleccionada dentro de las tres *Pichia stipitis* ya mencionadas y tratadas en las anteriores experimentaciones la misma que es sometida a dos tipos de sistemas observada en la Figura 19 donde se determina mediante la lectura de la absorbancia la condición adecuada del medio de cultivo a la cual fue enfrentada la levadura para el mejoramiento del rendimiento de producción de biomasa.

- **Micro aireación** para crear este sistema se realiza tapones de gasa y algodón equipado con una jeringa para muestrear después se tapa el erlenmeyer permitiendo el limitado paso de oxígeno como se ve en la Figura 20.
- **Aireación** en este caso el sistema es creado mediante una bomba de pecera acoplado hacia la tapa rosca del erlenmeyer adjuntado un capilar dentro el medio de cultivo lo cual origina directamente el libre paso de oxígeno constante en el medio de cultivo como se observa en la Figura 20.

.Figura 20. Diseño de los sistemas de aireación y micro aireación



Fuente: Elaboración propia

Los erlenmeyers de los dos sistemas diseñados deben ser colocados en un shaker (ver anexo B) a una temperatura de 30°C y una agitación constante, el muestreo se lo realiza periódicamente como se detallo en la anterior experiencia.

Cultivo de la *Pichia stipitis* en condiciones optimizadas en un reactor de 2.5 lts.

Una vez establecida las condiciones de cultivo, se pone en marcha el medio de cultivo definido, en un reactor de capacidad de 2.5 litros se debe tomar las muestras ejemplo de muestreo se toma el mismo del test de fermentación tomando 5 ml de muestra 2 mL para análisis de azúcares y 3 mL para determinar peso seco. El fermentador tiene un Software donde registra los historiales del cultivo pH, Oxígeno, Temperatura, tiempo.

1.2.2.4 Determinar las condiciones de cultivo

✓ Peso seco:

El peso seco se determina para hallar la concentración de biomasa, inicialmente se pesa los tubos de centrifuga vacíos, (w_1 , w_2). Se adiciona 10 mL del inculo con jeringas de 10 mL, centrifugar (3000 rpm, 3 min) y vaciar los sobre nadantes. Lavar 2 veces con agua destilada los pellets de células, secar 24 h a 85°C y pesar ambos tubos incluyéndose los pellets (w_1^* , w_2^*) y calcular:

$$\text{Concentración de células}_1 = (w_1^* - w_1) * 10^3 / 10 \text{ (g/L)}$$

$$\text{Concentración de células}_2 = (w_2^* - w_2) * 10^3 / 10 \text{ (g/L)}$$

$$\text{Concentración promedios de células: } |X| = (\text{Concentración de Células}_1 + \text{Cells concentration}_2) / 2$$

✓ Parámetros del inculo

Concentración celular: Se toma una muestra para la determinación de la concentración de células, después colocar la muestra en el espectrofotómetro OD (610 nm). El valor ideal es de OD₍₆₁₀₎ < 0.5, en el caso que no sea diluir la muestra con la siguiente ecuación:

$$\text{OD}_{(610)} = \text{Valor real} * \text{DF} = |X|$$

$$\text{Donde: DF} = (\text{Volumen de agua (mL)} / \text{Volumen de inculo (mL)})$$

$$\text{La concentración de células: } |C| = f * |X|$$

$$\text{Donde: } f = \text{factor} = 0.4 \text{ (factor para extracto de levadura)}$$

Confirmar este valor de 0.4 con la determinación de peso seco.

La concentración de células final debe ser ≈ 5 g/L, calcular la concentración de:

$$\text{Concentración de células} = 5 \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) * \text{Vol. de sol. del frasco} (100 * 10^{-3} \text{ L}) = |Y|$$

$$\text{Volumen calculado para cada muestra: } V = \frac{[Y]}{[C]} (\text{mL})$$

Se coloca el volumen calculado en tubos de centrifugación de 10 mL a 4000 rpm por 10 min. y vaciar el sobrenadante. Resuspender el pellet centrifugado en cada tubo para un volumen final de 1 mL con una solución esterilizada de 0.9 % (w/v) NaCl. Adicionar el pellet resuspendido de 1 mL en cada erlenmeyer o vial de 50 mL en un medio estéril para la fermentación

1.2.3 Producción de bioetanol en Sustratos Sintético e hidrolizado de aserrín de *Curupaú* en Condiciones Aerobias y no estrictamente anaerobias (fermentativas).

Se lleva a cabo las fermentaciones aeróbica y fermentativa cuyo volumen total sea de 50 mL y se coloca en el shaker a 250 rpm y 30 °C preparando de la siguiente manera:

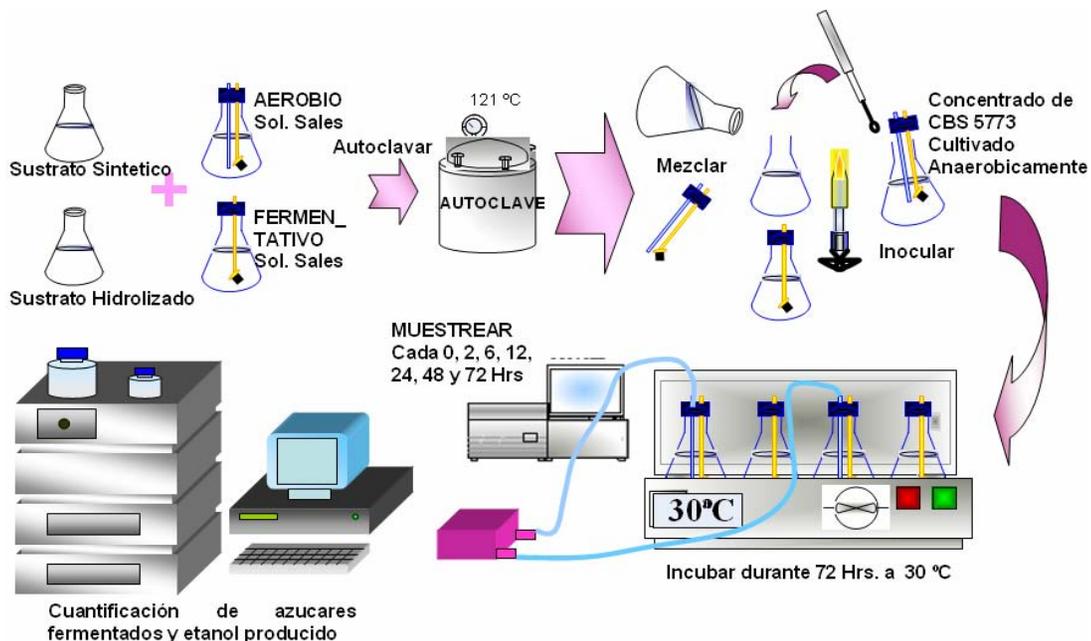
- | | | |
|--|---------------------------|---------------------|
| • 0.50 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.166 mL (15 g/100 mL) | |
| • 13.6 g/L KH ₂ PO ₄ | 4.840 mL (28.10 g/200 mL) | Auto clavar |
| • 0.50 g/L MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.268 mL (9.30g/100 mL) | |
| • g/L 0,77 glucosa, 5,01 xilosa, 0,5 arabinosa | 45.00 mL sintético | } No Auto
clavar |
| • 1.00 g/L extracto de levadura | 0.510 mL (9.8 g/100mL) | |
| • 900 mL/L hidrolizado | 45.00 mL hidrolizado | |
| • 1 mL Inoculo | 5.0 g/L | |

Para el sistema fermentativo el erlenmeyer estará equipado de una tapa con una jeringa y para el aerobio el erlenmeyer estará insertado una jeringa y un capilar para la aeración el procedimiento se detalla en la Figura 21.

La producción de bioetanol empezara cuando se adicione el inoculo con una concentración inicial de 5 g/L. Se debe muestrear durante 72 horas a las 0, 2, 6, 12, 24, 48 y 72 hrs. después colocar

inmediatamente en tubos eppendorf, centrifugar a 5000 rpm, 5 min y almacenar -8°C para análisis posteriores, paralelamente leer biomasa en el espectrofotómetro.

Figura 21. Procedimiento de la producción de bioetanol en condiciones aerobias y no estrictamente anaerobias (fermentativa)



Fuente: Elaboración propia

Análisis Las muestras serán analizadas en el HPLC, todas las muestras deben ser centrifugadas, filtradas y diluidas 10 veces (150:1350) y filtradas con filtros estériles de 0.20 μm .

VI. RESULTADOS

1. Pretratamiento del aserrín de *Curupaú*

Los resultados de los análisis relacionados a la composición comprueban que el *Curupaú* es la materia rica en xilosa prima idónea para posteriores procesos de pretratamiento al demostrarse en estudios anteriores realizados en coordinación con Quispe, 2007 que la prueba # 23, reporto concentraciones altas en extracción de xilosa.

1.1 Resultados de la Hidrólisis Acida

La hidrólisis desarrollada en un reactor batch, nos da como producto dos fracciones una líquida y sólida, efectuando el correspondiente análisis de la primera, y cálculos de los rendimientos de extracción de azúcares. La Tabla 7 enlista, condiciones de los experimentos, resultado de los análisis de la fracción líquida proveniente de la hidrólisis, concentración de monosacáridos, glucosa, xilosa y arabinosa, el análisis de monosacáridos y sub productos fue realizado en Cromatografía en Fase Líquida (HPLC), la condiciones de operación del HPLC; fueron un flujo de 0.630 mL/min, temperatura de la columna 65 °C, en dos detectores el primero denominado índice de refracción y el segundo de ultra violeta – visible a 210 nm. La determinación de azúcares se realizo en el primer detector, mientras que en el segundo se determinaron los subproductos de degradación de la hidrólisis ácida utilizando una columna BIORAD HPX-87 H con fase móvil de ácido sulfúrico a una concentración de 0.005 M.

Tabla 7. Hidrólisis acida del aserrín de *Curupaú* en condiciones óptimas y resultados del análisis de la fracción líquida *

Sólidos Totales [%]	Masa Filtrada [g]	V liquido filtrado [L]	pH	Azúcares Totales			Subproductos	
				Glucosa [g/L]	Xilosa [g/L]	Arabinosa [g/L]	Ac. Acético [g/L]	HMF [g/L]
16.56	16.60	0.13	2.50	0.47	4.56	0.68	0.05	0.18
18.42	8.40	0.28	2.93	0.52	4.83	0.60	0.03	0.00
16.30	10.66	0.27	2.67	0.54	5.14	1.00	0.06	0.04
29.43	8.27	0.33	2.74	0.49	4.37	0.70	0.03	0.03
16.25	16.53	0.17	2.76	0.63	4.93	0.99	0.04	0.06

* Los factores óptimos que se usaron son: Tiempo de retención = 10 min., [H₂SO₄] = 1.5%, Humedad = 60%, temperatura = 200°C. Fuente: Elaboración propia

Los valores de azúcares totales se obtuvo por ejemplo para la xilosa respecto a la suma de los monosacáridos y oligosacáridos, cuantificándose simultáneamente la arabinosa y glucosa de la misma forma. Las condiciones donde existen mayor cantidad de azúcares totales es la prueba # 23, se tomo el resultados de la prueba mas representativa según la Tabla 7, en función a las condiciones establecidas, los resultados son: 0.54 g/L glucosa, 5.14 g/L xilosa, 1.00 g/L arabinosa.

Los resultados obtenidos nos muestra las pruebas experimentales realizadas conjuntamente en colaboración con estudios preliminares por Quispe, 2007 que permite corroborar la extracción de los azúcares acorde a los resultados obtenidos en la prueba # 23 de manera comparativa según la Tabla 8, el porcentaje de extracción es 75.28 %, donde podemos decir que de 100 gramos de aserrín obtenemos 10.16 g Xilosa, 1.07 g de Glucosa y 2.00 g de Arabinosa, el porcentaje de máximo de extracción se refiere solamente a la Xilosa.

Tabla 8. Rendimiento de extracción de azúcares del hidrolizado fracción líquida durante el pretratamiento con relación a la masa seca de aserrín de *Curupaú*

N° Prueba	Sólidos Totales	Masa Filtrada	V liquido filtrado	pH	Xilosa	Glucosa	Arabinosa	Total de Az	Rendimiento	Extracción
	(%)	(g)	(L)		(g/100 g MS)	(g/100 g MS)	(g/100 g MS)	(g/100 g MS)	(%)	(%)
23 ⁽¹⁾	16.56	16.60	0.13	2.50	10.32	1.58	1.04	13.00	26.50	73.50
23 ⁽²⁾	16.25	16,53	0.17	2.76	10.16	1.07	2.00	13.20	24.72	75.28

Fuente Elaboración propia

(1) Luis Quispe

(2) Maribel Peña

Como sub productos se obtuvo 0.02 g 5-HMF y 0.006 g Ácido Acético no lográndose detectar furfural reportados en la Tabla 9 teniendo como referencia los resultados según (Quispe, 2007).

Tabla 9. Rendimiento de extracción de Subproductos del hidrolizado fracción líquido durante el pretratamiento con relación a la masa seca del aserrín de *Curupaú*

N° Prueba	Furfural	5-HMF	Ácido Acético
	(g/ 100 g MS)	(g/ 100 g MS)	(g/ 100 g MS)
23 ⁽¹⁾	0,21	0,00	4,13
23 ⁽²⁾	0.00	0.02	0.06

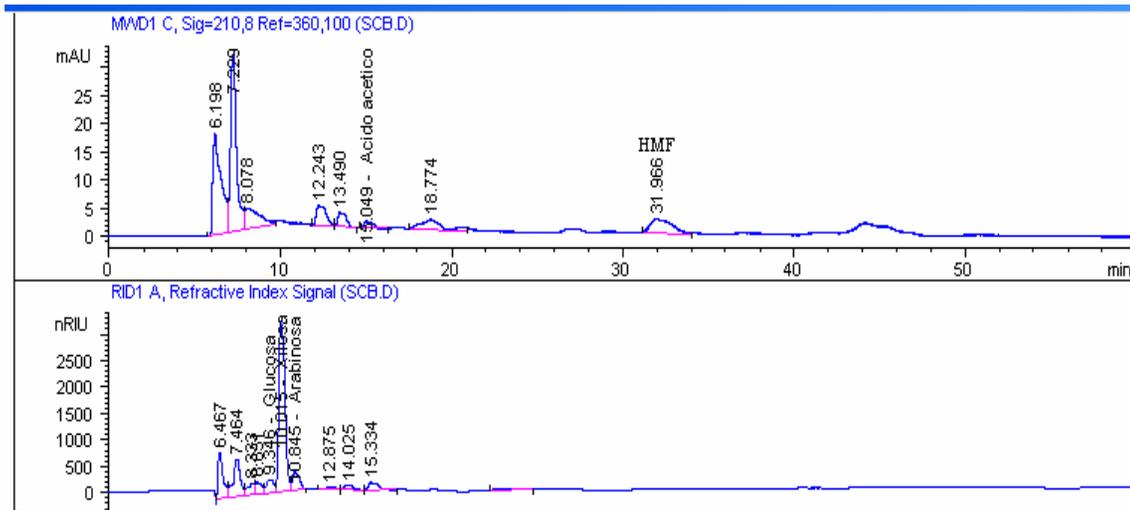
Fuente: Elaboración propia

(1) Luis Quispe

(2) Maribel Peña

En la Figura 22 se puede observar los picos de los metabolitos presentes como los azúcares (glucosa, xilosa y arabinosa) en el hidrolizado de aserrín de curupaú extraídos durante el pretratamiento, también se observa la presencia de los inhibidores (Ac. Acético, HMF y furfural), donde el reporte de un cromatograma hace la representación de los productos.

Figura 22. Cromatograma representado los azúcares y los subproductos extraídos del hidrolizado líquido durante el pretratamiento del aserrín de *Curupaú*



Fuente: Elaboración propia

1.2 Respuesta al comportamiento de diferencia en concentración de sustrato mixto (glucosa y xilosa.)

Las cepas *Pichia stipitis* CBS 5770, 5773 y 6054 por tener la capacidad de metabolizar estos dos azúcares (xilosa y glucosa) paralelamente al activar las enzimas xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa necesarias para el metabolismo de cada azúcar como su fuente de carbono o fuente de energía, demuestran un acondicionamiento al medio de cultivo en el experimento 1 siendo las concentraciones de 10 g/L para la glucosa y la xilosa. La adaptación de las tres levaduras demostró una mejor respuesta para la CBS 5773 como se observa en la Tabla 10 con una concentración 7.41 g/L de biomasa comparándola con la CBS 5770 y CBS 6054 que alcanzaron concentraciones de biomasa de 6.21 y 7.01 g/L, respectivamente.

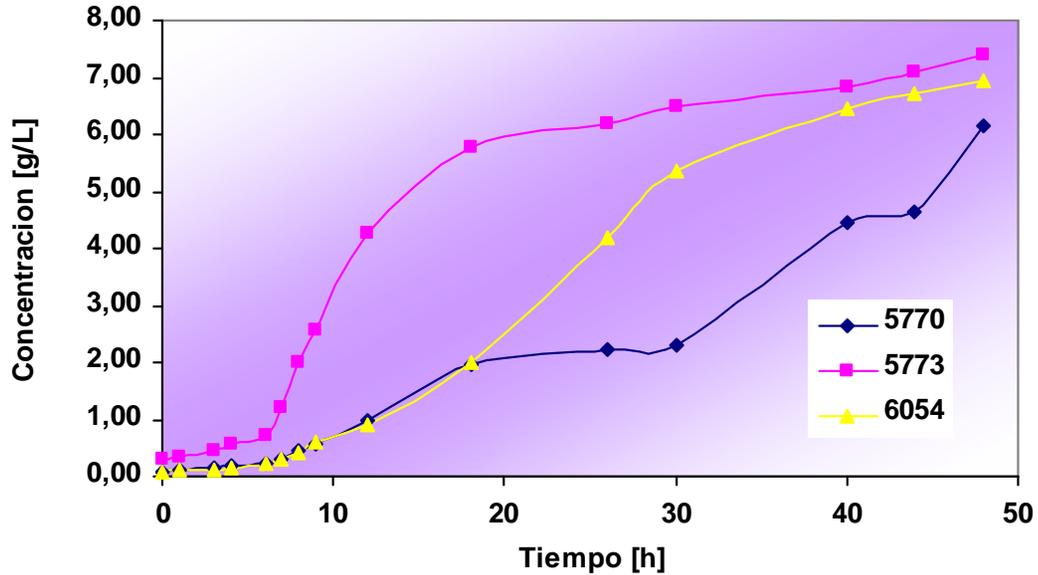
Tabla 10. Producción de biomasa de la *Pichia stipitis* CBS 5770, 5773 y 6054 con el experimento 1 con una concentración de azúcares 20 g/L relación glucosa: xilosa (10:10) durante un periodo de 48 h

T [h]	Abs.5770	Conc. [g/l]	$\frac{1}{t} \ln \left(\frac{C_i}{C_o} \right)$	Abs.5773	Conc. [g/l]	$\frac{1}{t} \ln \left(\frac{C_i}{C_o} \right)$	Abs.6054	Conc. [g/l]	$\frac{1}{t} \ln \left(\frac{C_i}{C_o} \right)$
0	0.07	0.08	0.00	0.31	0.32	0.00	0.08	0.09	0.00
1	0.09	0.10	0.06	0.23	0.34	0.06	0.09	0.10	0.08
2	0.11	0.12	0.14	0.29	0.39	0.10	0.11	0.12	0.12
3	0.12	0.13	0.12	0.35	0.45	0.12	0.12	0.13	0.10
4	0.17	0.18	0.17	0.45	0.56	0.14	0.15	0.16	0.14
6	0.23	0.24	0.16	0.63	0.74	0.17	0.23	0.24	0.16
7	0.30	0.31	0.17	1.10	1.20	0.19	0.30	0.31	0.17
8	0.43	0.44	0.19	1.92	2.01	0.23	0.42	0.43	0.19
9	0.56	0.57	0.20	2.49	2.57	0.23	0.59	0.59	0.21
10	0.70	0.70	0.20	3.87	3.93	0.25	0.67	0.67	0.20
12	0.99	1.00	0.20	4.20	4.26	0.22	0.90	0.90	0.19
18	1.98	1.97	0.13	6.00	5.78	0.13	2.00	1.99	0.17
26	2.25	2.23	0.12	6.22	6.20	0.12	4.22	4.18	0.15
30	2.31	2.29	0.11	6.51	6.50	0.11	5.41	5.35	0.14
40	4.51	4.47	0.10	6.64	6.83	0.08	6.52	6.45	0.11
44	4.70	4.66	0.09	6.90	7.10	0.07	6.80	6.73	0.10
48	6.21	6.14	0.09	7.41	7.40	0.07	7.01	6.93	0.09

Fuente: Elaboración propia

Los correspondientes azúcares son consumidos durante la ruta metabólica de la glicólisis, la fase logarítmica (Log) transcurre lentamente para las tres levaduras demostrándose que el consumo de estas fuentes de carbono son limitados en relación de azúcares (g/L) glucosa: xilosa (10:10), según la Figura 23 a partir de la hora 0 comienza la fase de adaptación del microorganismo en el medio de cultivo donde la CBS 5773 asimila más rápidamente estos azúcares.

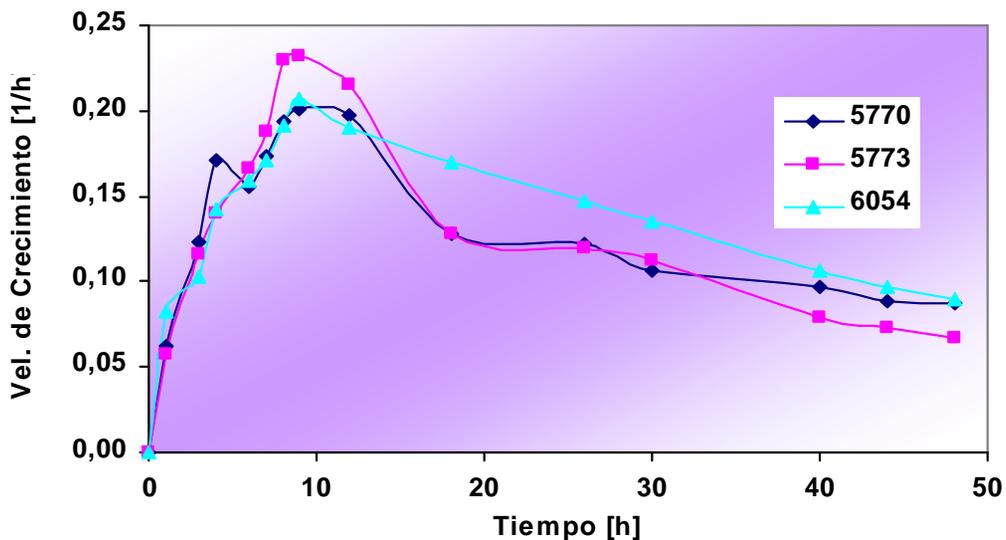
Figura 23. Concentración de Biomasa vs. Tiempo durante un periodo de 48 h Experimento 1
 concentración de azúcares 20 g/L relación glucosa: xilosa (10:10).



Fuente: Elaboración propia

En la Figura 24 muestra que a la hora 10 la cepa CBS 5773 alcanza una velocidad máxima de crecimiento de 0.251 h^{-1} donde se puede observar su reproducción (ver anexo B), comparándolas con la CBS 6054 y CBS 5770 que reportan resultados 0.21 (9 h) y 0.20 (10 h), respectivamente (regresiones lineales ver anexo C).

Figura 24. Velocidad de crecimiento durante 48 h en el experimento 1.



Fuente: Elaboración propia

La representación de la reproducción del microorganismo según el experimento 1, donde la adaptación del *P. stipitis* 5773 desde un medio de cultivo limitado de xilosa representa ser el factor limitante del crecimiento en un cultivo proliferante, se puede observar una ligera reproducción del microorganismo lo cual nos sirve para corroborar este experimento siendo la mas representativa (ver en anexo B).

La producción de biomasa en el medio de cultivo respecto al experimento 2 [relación de azúcares (g/L) glucosa: xilosa (5:15)] es mayor en la cepa CBS 6054 reportándose en la Tabla 11 una concentración de 7.76 g/L con relación a las cepas CBS 5773 y CBS 5770, donde se obtuvieron concentraciones por debajo de este valor durante las 48 h de crecimiento celular.

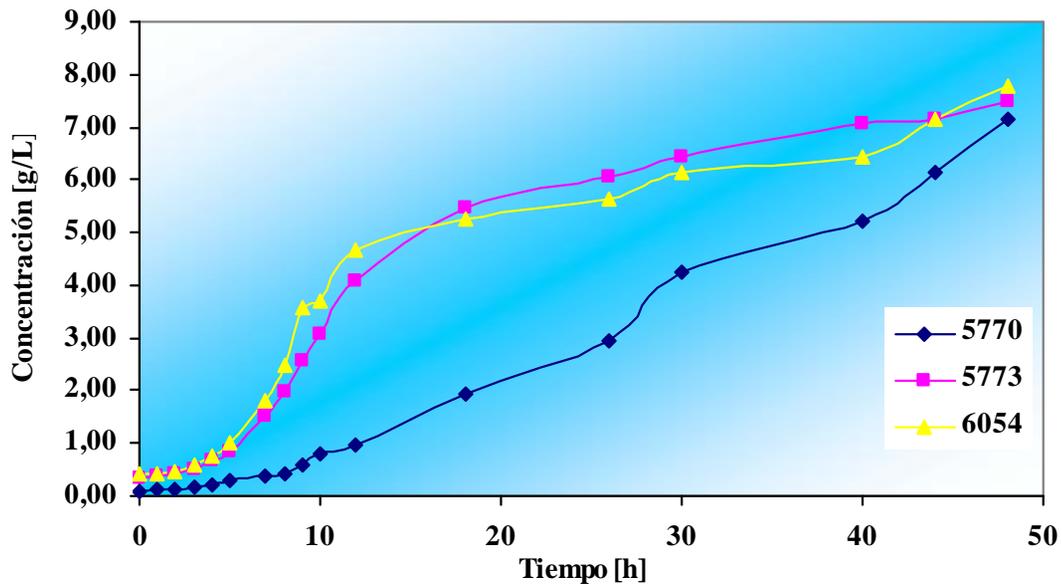
Tabla 11. Producción de biomasa de la *Pichia stipitis* CBS 5770, 5773 y 6054 con el experimento 2 con una concentración de azucares 20 g/L relación glucosa: xilosa (5:15) durante un periodo de 48 h.

Tiempo h	Abs 5770	Conc. [g/l]	$\frac{1}{t} \ln \left(\frac{C_i}{C_o} \right)$	Abs 5773	Conc. [g/l]	$\frac{1}{t} \ln \left(\frac{C_i}{C_o} \right)$	Abs 6054	Conc. [g/l]	$\frac{1}{t} \ln \left(\frac{C_i}{C_o} \right)$
0	0,09	0,10	0,00	0,35	0,36	0,00	0,39	0,40	0,00
1	0,11	0,12	0,14	0,37	0,38	0,06	0,42	0,42	0,05
2	0,13	0,14	0,16	0,43	0,44	0,10	0,47	0,48	0,09
3	0,15	0,16	0,15	0,51	0,51	0,12	0,58	0,58	0,14
4	0,19	0,20	0,16	0,66	0,66	0,16	0,74	0,74	0,16
5	0,29	0,30	0,18	0,85	0,85	0,14	1,00	1,00	0,19
7	0,38	0,38	0,19	1,50	1,50	0,20	1,81	1,80	0,22
8	0,40	0,41	0,17	1,98	1,97	0,21	2,48	2,46	0,23
9	0,61	0,61	0,20	2,60	2,58	0,22	3,62	3,59	0,25
10	0,78	0,78	0,20	3,10	3,08	0,22	3,73	3,70	0,22
12	0,98	0,98	0,19	4,10	4,06	0,20	4,70	4,66	0,21
18	1,96	1,95	0,16	5,53	5,47	0,11	5,32	5,27	0,14
26	2,95	2,92	0,13	6,11	6,05	0,11	5,67	5,62	0,10
30	4,31	4,26	0,12	6,50	6,43	0,10	6,20	6,13	0,09
40	5,25	5,20	0,10	7,16	7,08	0,08	6,50	6,43	0,07
44	6,21	6,14	0,09	7,21	7,13	0,07	7,20	7,13	0,07
48	7,13	7,147	0,089	7,66	7,579	0,063	7,844	7,760	0,062

Fuente: Elaboración propia

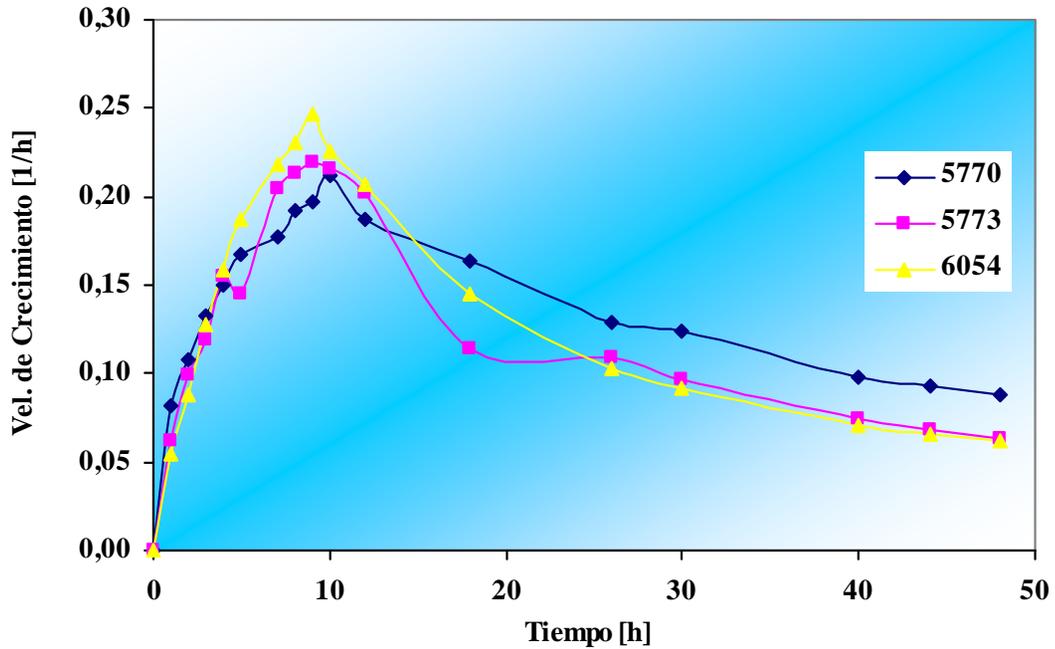
La evaluación en el experimento 2 demostró mayores concentraciones de biomasa en comparación con el experimento 1; según la Figura 25 la relación de azúcares glucosa: xilosa (5:15) demostró una mejor adaptación en el medio de cultivo rico en xilosa dando lugar al incremento en concentración de biomasa para las tres levaduras, donde la CBS 6054 alcanzó un valor máximo 7.76 g/L en comparación con las otras levaduras.

Figura 25. Concentración de Biomasa vs. Tiempo durante 48 h Experimento 2. Concentración de azúcares 20 g/L relación glucosa: xilosa (5:15)



Fuente: Elaboración propia

De la misma manera que la concentración de biomasa anteriormente mencionada para la misma cepa, la velocidad de crecimiento máxima alcanzada para esta cepa fue de 0.25 h^{-1} durante las 10 h de experimentación, mientras las otras cepas reportan resultados por debajo de este valor donde las velocidades de crecimiento fueron de 0.20 y 0.22 h^{-1} para la CBS 5770 y 5773, resultados que se pueden observar en la Figura 26 y la reproducción de la CBS 5773 (ver anexo B), (regresiones lineales ver anexo C).

Figura 26. Velocidad de crecimiento durante 48 h en el experimento 2.

Fuente: Elaboración propia

El aprovechamiento de las pentosas por la *Pichia stipitis* presentes en hidrolizados obtenidos de residuos lignocelulósicos demostraron una adecuada adaptación según las anteriores investigaciones (D.R.J. Grootjen y col, 1990). El experimento 3 [relación de azúcares (g/L) glucosa: xilosa (1:19)] reportaron concentraciones de biomasa, donde la CBS 5773 alcanzo un valor máximo de 7.92 (g/L) según la Tabla 12. Por su parte las otras cepas produjeron concentraciones inferiores a este valor.

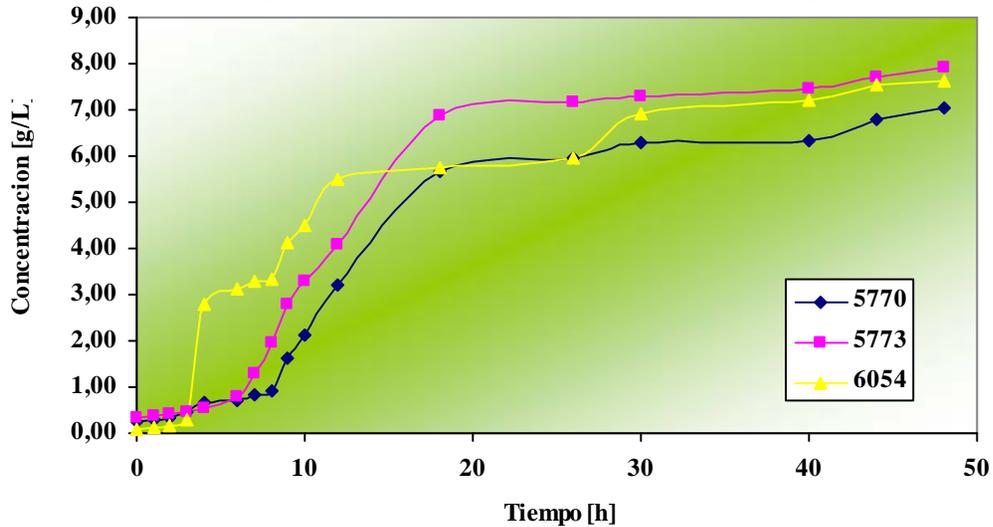
Tabla 12. Producción de biomasa de la *Pichia stipitis* CBS 5770, 5773 y 6054 con el experimento 3 con una concentración de azúcares 20 g/L relación glucosa: xilosa (1:19) durante un periodo de 48 h

Tiempo hrs.	Abs 5770	Conc. g/l	$\frac{1}{t} \ln \left(\frac{C_i}{C_o} \right)$	Abs 5773	Conc. g/l	$\frac{1}{t} \ln \left(\frac{C_i}{C_o} \right)$	Abs 6054	Conc. g/l	$\frac{1}{t} \ln \left(\frac{C_i}{C_o} \right)$
0	0,25	0,25	0,00	0,34	0,35	0,00	0,09	0,09	0,00
1	0,28	0,29	0,13	0,37	0,37	0,06	0,13	0,13	0,05
2	0,34	0,35	0,16	0,42	0,42	0,09	0,18	0,18	0,08
3	0,45	0,45	0,20	0,47	0,48	0,10	0,28	0,28	0,12
4	0,67	0,68	0,24	0,56	0,56	0,12	2,79	2,79	0,14
6	0,71	0,71	0,17	0,78	0,78	0,13	3,14	3,14	0,15
7	0,83	0,83	0,17	1,30	1,29	0,19	3,28	3,28	0,19
8	0,91	0,91	0,16	1,96	1,95	0,21	3,34	3,34	0,22
9	1,64	1,63	0,21	2,82	2,80	0,23	4,11	4,11	0,24
10	2,13	2,11	0,21	3,32	3,29	0,26	4,51	4,51	0,25
12	3,24	3,21	0,16	4,10	4,07	0,20	5,48	5,48	0,21
18	5,74	5,68	0,17	6,94	6,87	0,12	5,75	5,75	0,12
26	6,03	5,97	0,12	7,22	7,15	0,11	5,95	5,95	0,12
30	6,34	6,28	0,11	7,38	7,30	0,10	6,90	6,90	0,11
40	6,40	6,33	0,08	7,53	7,45	0,08	7,20	7,20	0,08
44	6,88	6,81	0,08	7,80	7,72	0,07	7,53	7,53	0,07
48	7,12	7,24	0,07	8,01	7,92	0,07	7,65	7,71	0,06

Fuente: Elaboración propia

La adaptación de las cepas en estudio en el medio de cultivo con relación a la concentración de azúcares glucosa: xilosa (1:19) esta enfocada a un mayor aprovechamiento de la xilosa que la glucosa, según la Figura 27 se puede ver en la fase de adaptación ($t = 0$) que la CBS 5773 asimilo lentamente al medio de cultivo pero de forma mas eficiente comparada con las otras cepas CBS 5770 y 6054, donde las mismas demostraron también una adecuada adaptación al medio de cultivo durante las 48 h.

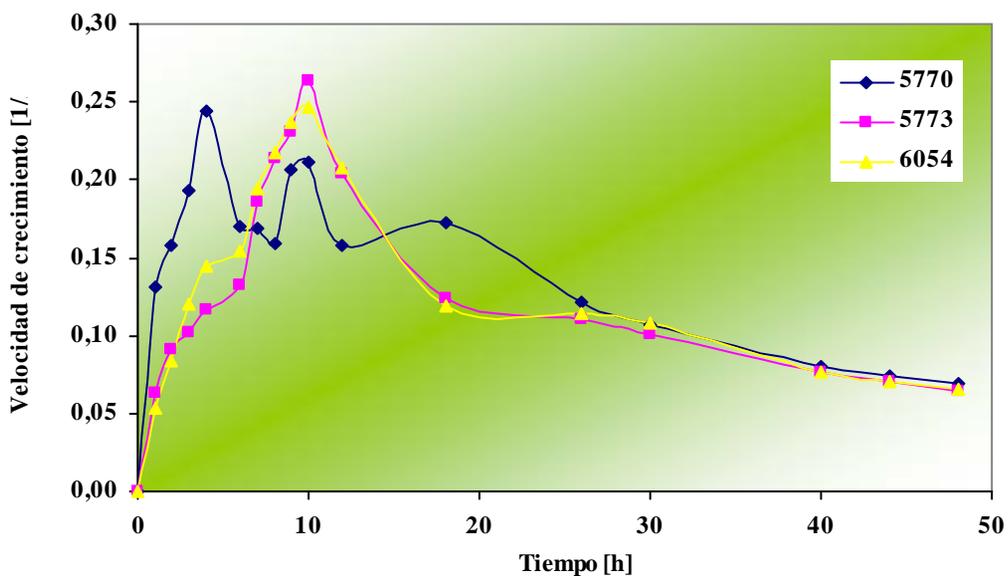
Figura 27. Concentración de Biomasa vs. tiempo durante un periodo de 48 h experimento 3 concentración de azúcares 20 g/L relación de azúcares glucosa: xilosa g/L (1.19)



Fuente: Elaboración propia

En el experimento 3 la fase exponencial (log) máxima alcanzada es por la CBS 5773 durante las diez primeras horas alcanzando una velocidad de crecimiento $0.25 \text{ (h}^{-1}\text{)}$, siendo la más representativa en comparación con las otras cepas según la Figura 28. Después de la fase exponencial la fase estacionaria representada por la CBS 5770 a la 10 h es muy inestable puesto que su velocidad de crecimiento es alcanzada a las 4 h no se llegó a la fase de regazo o muerte porque ya se tenía una absorbancia representativa hasta las 48 h.

Figura 28. Velocidad de crecimiento durante 48 h con el experimento 3.



Fuente: Elaboración propia

La reproducción del microorganismo según el experimento 3, donde la adaptación de la *P. stipitis* 5773 desde un medio de cultivo limitado del xilosa hasta un medio rico en xilosa representa ser el factor limitante del crecimiento en un cultivo proliferante, como se puede observar la incrementada reproducción del microorganismo donde se puede observar (ver en anexo B).

1.3 Influencia del Oxígeno

La *Pichia stipitis* seleccionada en las anteriores experimentaciones reportaron resultados con un incremento en la producción de biomasa representada en el experimento 3 por la CBS 5773. La misma cepa fue estudiada bajo la influencia del oxígeno donde la máxima concentración de biomasa que se alcanzó fue en condiciones aeróbicas durante un periodo de 48 h en un sustrato compuesto por glucosa y xilosa con una relación (1:19) g/L según el experimento 3. En la Tabla 13 se puede observar la influencia mencionada incrementándose la producción de biomasa celular en condiciones aireación de 8.81 g/L y de 7.65 g/L en condiciones micro aireación

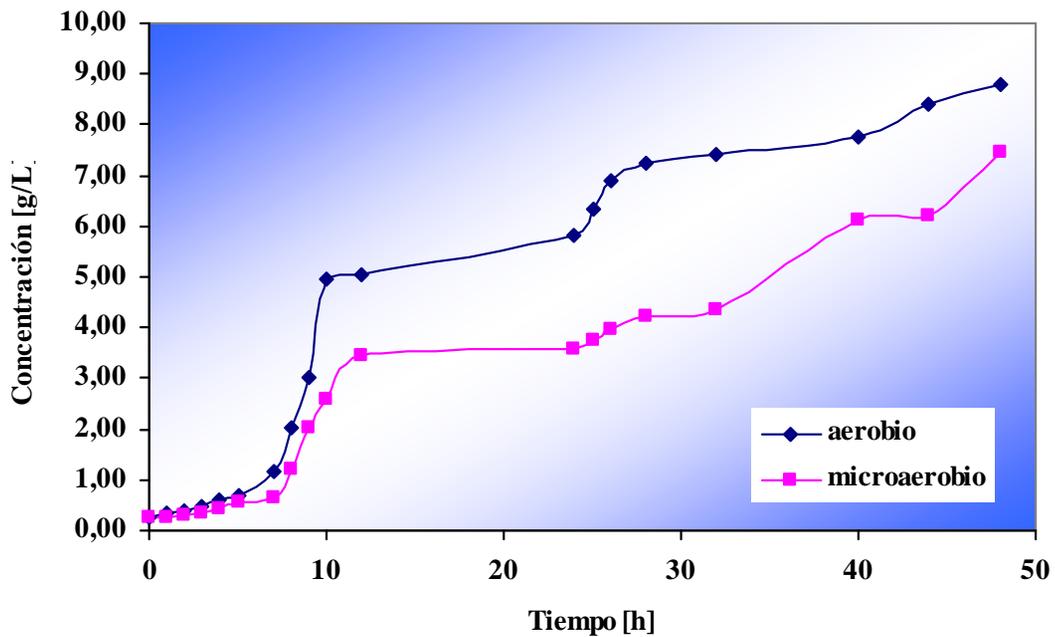
Tabla 13. Producción de biomasa con la CBS 5773 en condiciones de aireación y micro aireación durante un periodo de 48 h

Tiempo (h)	Abs con aireación	[C] g/l	$I/T*\ln(Ci/Co)$	Abs micro-aireación	[C] g/l	$I/T*\ln(Ci/Co)$
0	0,24	0,25	0,00	0,24	0,25	0,00
1	0,35	0,36	0,05	0,25	0,26	0,05
2	0,40	0,40	0,08	0,29	0,29	0,08
3	0,46	0,47	0,10	0,33	0,33	0,10
4	0,58	0,59	0,13	0,43	0,44	0,14
5	0,69	0,69	0,14	0,57	0,58	0,17
7	1,18	1,18	0,18	0,65	0,66	0,14
8	2,04	2,02	0,22	1,19	1,19	0,20
9	3,03	3,00	0,24	2,03	2,02	0,23
10	4,99	4,94	0,27	2,60	2,58	0,23
12	5,07	5,02	0,22	3,50	3,47	0,22
24	5,88	5,82	0,12	3,62	3,59	0,11
25	6,42	6,35	0,12	3,80	3,77	0,11
26	6,96	6,89	0,12	4,00	3,96	0,11
28	7,31	7,23	0,11	4,25	4,21	0,10
32	7,50	7,42	0,10	4,40	4,36	0,09
40	7,83	7,75	0,08	6,19	6,12	0,08
44	8,50	8,41	0,07	6,26	6,20	0,07
48	8,91	8,81	0,07	7,53	7,45	0,07

Fuente: Elaboración propia

El desarrollo aerobio depende de un suministro de oxígeno suficiente y de concentración de azúcares, ya que en condiciones anaerobias la velocidad de consumo del sustrato puede ser mucho más alta, generalmente las pentosas se consumen aeróbicamente. En la Figura 33 se representa la forma en que se consumen los azúcares por la CBS 5773.

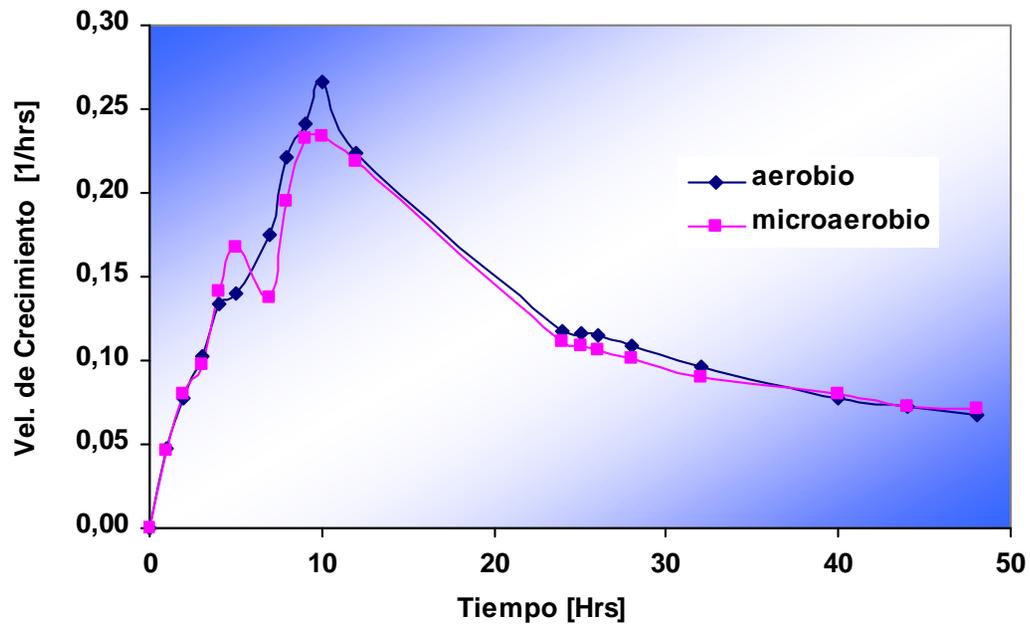
Figura 29. Concentración de biomasa con relación del tiempo de la *Pichia stipitis* CBS 5773 en condiciones de aireación y micro aireación durante 48 h.



Fuente: Elaboración propia

En la Figura 34 se observa una velocidad de crecimiento incrementada (fase exponencial) de $0,26 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ (10 h de experimentación), en comparación con el experimento 3 se tiene una velocidad de crecimiento de $0,25 \text{ (h}^{-1}\text{)}$, una vez encontrado el máximo de velocidad de crecimiento y tiempo experimental de ya podíamos preparar inóculos para posteriores Fermentaciones (regresiones lineales ver anexo C).

Figura 30. Velocidad de crecimiento vs. tiempo de la *Pichia stipitis* CBS 5773 en condiciones de aireación y micro aireación



Fuente: Elaboración propia

1.4 Escalamiento del medio de cultivo (CBS 5773) en condiciones optimas en un reactor de capacidad 2.5 L

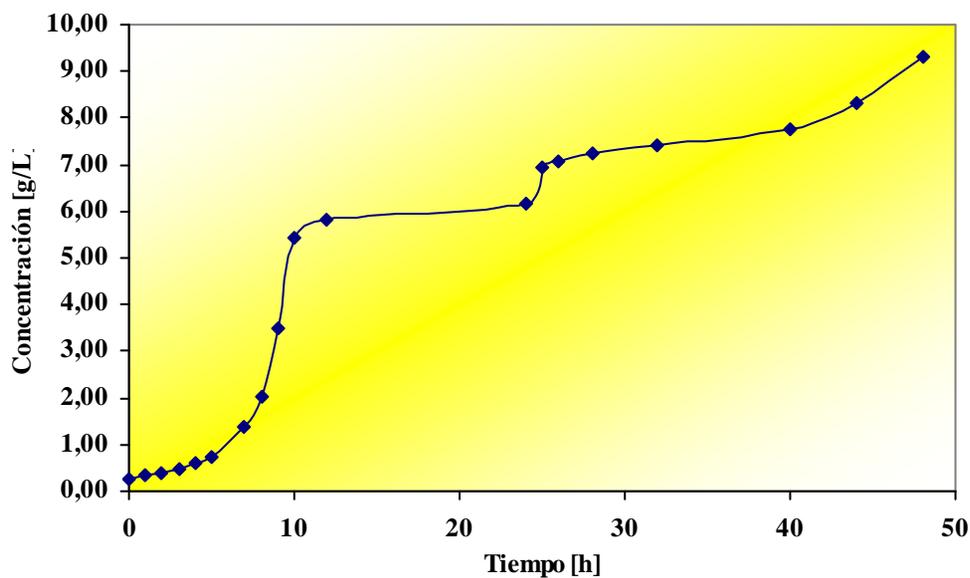
El escalamiento fue puesto en marcha en un reactor de capacidad de 2,5 L con las condiciones del medio de cultivo previamente establecidas para la levadura CBS 5773 en el experimento 3 relación de azúcares [glucosa: xilosa, (1:19)g/L] con constantes resiembras en el mismo medio con el sustrato como factor limitante. Se obtuvieron resultados corroborativos e incluso se los optimizaron en el reactor comparativamente con los experimentos anteriormente realizados para volúmenes de 100 mL en condiciones aeróbicas (ver Tabla 15). En la Tabla 16 y la Figura 35 se pueden observar una absorbancia alcanzada de 9.42 y una concentración de biomasa de 9.30 g/L a 30°C, pH de 5.0 y una dosificación de oxígeno de (2Lmin⁻¹) durante un periodo de 48 h.

Tabla 14. Producción de biomasa de la *Pichia stipitis* CBS 5773 en condiciones optimas en un reactor de capacidad 2.5 L durante 48 h

Tiempo h	Abs	[C] g/L	I/T*ln(Ci/Co)
0	0,24	0,25	0,00
1	0,35	0,36	0,05
2	0,40	0,40	0,08
3	0,46	0,47	0,10
4	0,58	0,59	0,13
5	0,75	0,75	0,16
7	1,38	1,37	0,20
8	2,04	2,02	0,22
9	3,53	3,50	0,26
10	5,50	5,44	0,28
12	5,87	5,81	0,24
24	6,22	6,16	0,12
25	7,00	6,93	0,12
26	7,15	7,07	0,12
28	7,31	7,23	0,11
32	7,50	7,42	0,10
40	7,83	7,75	0,08
44	8,40	8,31	0,07
48	9,41	9,31	0,07

Fuente: Elaboración propia

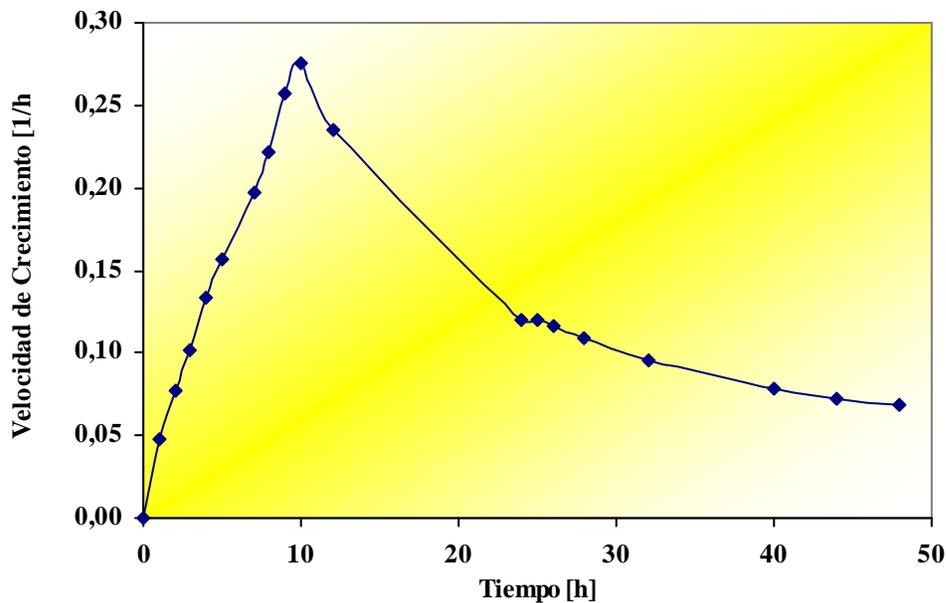
Figura 31. Concentración de biomasa con relación al tiempo de la *Pichia stipitis* CBS 5773 en condiciones optimas durante 48 h.



Fuente: Elaboración propia

La velocidad de crecimiento respecto al tiempo se incremento rápidamente transcurrido las 10 h de experimentación comparada con los anteriores experimentos (ver Fig. 30) que alcanzo una velocidad máxima de $0.26 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ comparada con el crecimiento en el reactor que alcanzo un valor de $0.28 \text{ (h}^{-1}\text{)}$. Por su parte la fase de adaptación según la Figura 32 expresa una rápida asimilación del microorganismo en el medio de cultivo acondicionado a concentraciones azucres relación glucosa: xilosa (1: 19)g/L.

Figura 32. Velocidad de Crecimiento de la *Pichia stipitis* CBS 5773 en condiciones óptimas durante un periodo de 48 h .



Fuente: Elaboración propia

1.5 Producción de bioetanol con la *Pichia stipitis* CBS-5773

La fermentación fue realizada mediante cultivos en batch utilizando sustrato (sintético e hidrolizado de aserrín de *Curupaú*) conteniendo concentraciones de azucres fermentables extraídas en el pretratamiento catalítico de la materia prima (aserrín de *Curupaú*) y así poder observar la adaptación del microorganismo en el sustrato rico en pentosas, así como de fermentar las mismas para producción de etanol. Comparativamente se realizo ambas experiencias en sustratos sintéticos y en duplicado en volúmenes de 100 mL, empleando sistemas aeróbicos y no estrictamente anaeróbicos.

Los mismos que fueron evaluados periódicamente mediante dos métodos el colorimétrico (espectrofotómetro) y cuantitativo (HPLC) (ver anexo B). Es importante también mencionar que los experimentos se incrementaron a 72 h con el propósito de evaluar un consumo mayor de la xilosa en el hidrolizado.

1.6 Producción de bioetanol en sustrato sintético

En la Tabla 15 se puede observar que en condiciones aeróbicas el microorganismo metabolizó el sustrato solamente para incrementar la concentración de biomasa a 14.3 g/L y no así producir altas concentraciones de etanol (ver Tabla 16) a diferencia del proceso de fermentación no estrictamente anaeróbico (sin oxígeno) se alcanzó una concentración de biomasa de 2.3 g/L hasta las 72 h. Según los resultados alcanzados se demuestra que en estas últimas condiciones (no estrictamente anaeróbicas), la levadura *Pichia stipitis* CBS 5773 produce mayores concentraciones de etanol (resultados corroborados por bibliografía). Los cromatogramas correspondientes a la metabolización de azúcares para ambos medios se los puede observar en la Figura 38

Tabla 15. Producción de biomasa de la *Pichia stipitis* CBS 5773 en condiciones aeróbicas y no estrictamente anaeróbico (fermentativo) durante un periodo de 72 h.

CBS 5773 en medio de cultivo con sustrato sintético						
Tiempo (h)	Abs aerobio	[C] g/l	$I/T * \ln(C_i/C_o)$	Abs fermentativo	[C] g/l	$I/T * \ln(C_i/C_o)$
0	0,14	0,15	0,00	0,12	0,13	0,00
1	0,36	0,36	0,05	0,26	0,27	0,06
2	0,40	0,41	0,09	0,32	0,33	0,14
4	0,51	0,52	0,10	0,52	0,52	0,19
6	1,49	1,48	0,24	0,99	0,98	0,23
12	2,12	2,10	0,15	2,85	2,83	0,20
24	5,30	5,24	0,11	3,50	3,48	0,11
48	8,72	8,63	0,07	2,97	2,94	0,05
72	14,38	14,29	0,05	2,32	2,30	0,03

Fuente: Elaboración propia

La concentración de azúcares iniciales y metabolizadas utilizando sustrato sintético en condiciones aeróbicas y no estrictamente anaeróbicas se representa en la Tabla 16. La concentración máxima de etanol fue de 1.45 (g/L) obtenida después de las 72 h en condiciones no estrictamente anaeróbicas donde el rendimiento de etanol teórico (Yea) respecto a los azúcares iniciales fue de 0.40 (g/g) representado en porcentaje de 79.21 (%) respecto a un rendimiento máximo teórico de 0.51 (g/g) y un rendimiento de biomasa (Yxa) respecto a los azúcares iniciales de 0.17 (g/g).

Tabla 16. Rendimiento de producción de etanol por la *Pichia stipitis* CBS 5773 en medio de cultivo Sintético durante la fermentación

Condición	Azúcares Iniciales		Consumo de Azúcares		Producción de Etanol [g/L]	Rendimientos		
	Glucosa [g/L]	Xilosa [g/L]	Glucosa [%]	Xilosa [%]		Yea [g/g]	Yea [%]	Yxa [g/g]
Anaerobio ⁽¹⁾	0,69 ⁽²⁾	4,56 ⁽²⁾	100 ⁽²⁾	99,78 ⁽²⁾	1,45 ⁽²⁾	0,40 ⁽²⁾	79,21 ⁽²⁾	0.17 ⁽²⁾
Aerobio	0.63 ⁽²⁾	4.72 ⁽²⁾	100 ⁽²⁾	99.74 ⁽²⁾	0.53 ⁽²⁾	0.10 ⁽²⁾	19.80 ⁽²⁾	0.30 ⁽²⁾
Aerobio	0,63 ⁽³⁾	4,72 ⁽³⁾	100 ⁽³⁾	97,67 ⁽³⁾	0,40 ⁽³⁾	0,08 ⁽³⁾	14,78 ⁽³⁾	0.08 ⁽³⁾

Fuente: Elaboración propia

⁽¹⁾ No estrictamente anaeróbico (fermentativo)

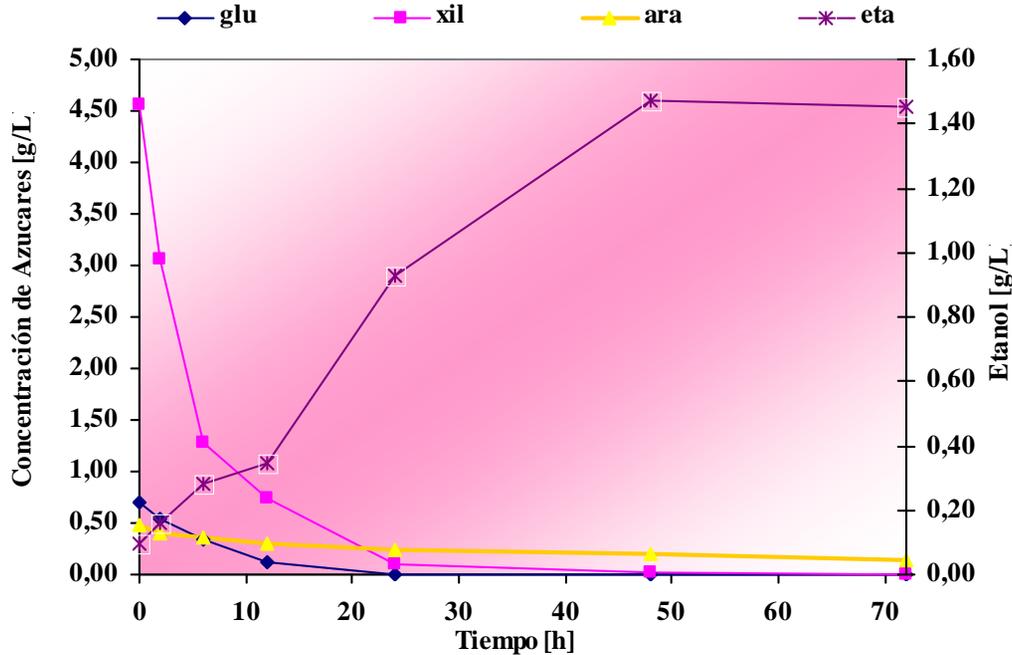
⁽²⁾ Después de 72 horas

⁽³⁾ Después de 24 horas

En condiciones aeróbicas el rendimiento de etanol (Yea) decrece considerablemente a 0.08 (g/g) expresándose también este resultado en (%) 14.78 alcanzando este valor máximo después de las 24 horas (fase del consumo de la glucosa), posteriormente a este periodo de tiempo la fuente principal de carbono fue el etanol (fase del consumo de etanol) observándose también un mayor rendimiento de biomasa Yxa de 0.30 (g/g) respecto a los azúcares iniciales según la Tabla 18 después de las 72 h.

La Figura 33 muestra que en condiciones no estrictamente anaeróbicas, el consumo de glucosa fue de un 100% (después de las 72 h), la xilosa fue consumida hasta un 99,78% (después de las 72 h) representada durante una rápida fase exponencial del microorganismo y la producción de etanol se ve incrementada comparativamente con las condiciones aeróbicas.

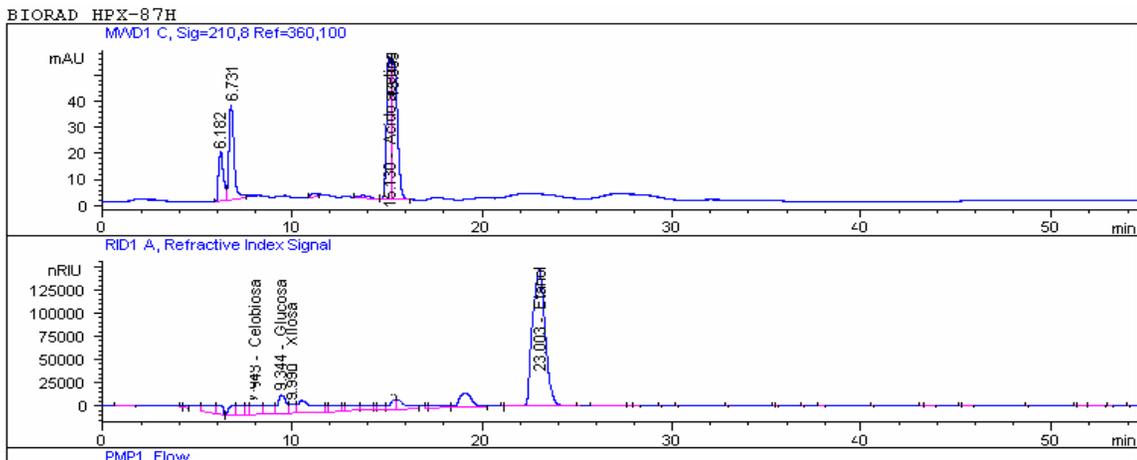
Figura 33. Fermentación con la *Pichia stipitis* CBS 5773 en medio de cultivo sintético en condiciones no estrictamente anaerobias (fermentativas) con relación a la concentración de etanol y azúcares.



Fuente: Elaboración propia

El reporte de los resultados durante la fermentación en condiciones no estrictamente anaerobias se lo puede corroborar mediante la representación de un cromatograma Figura 34 en la que se observa una considerable producción de etanol y el consumo de los azúcares (xilosa y glucosa) después de las 72h.

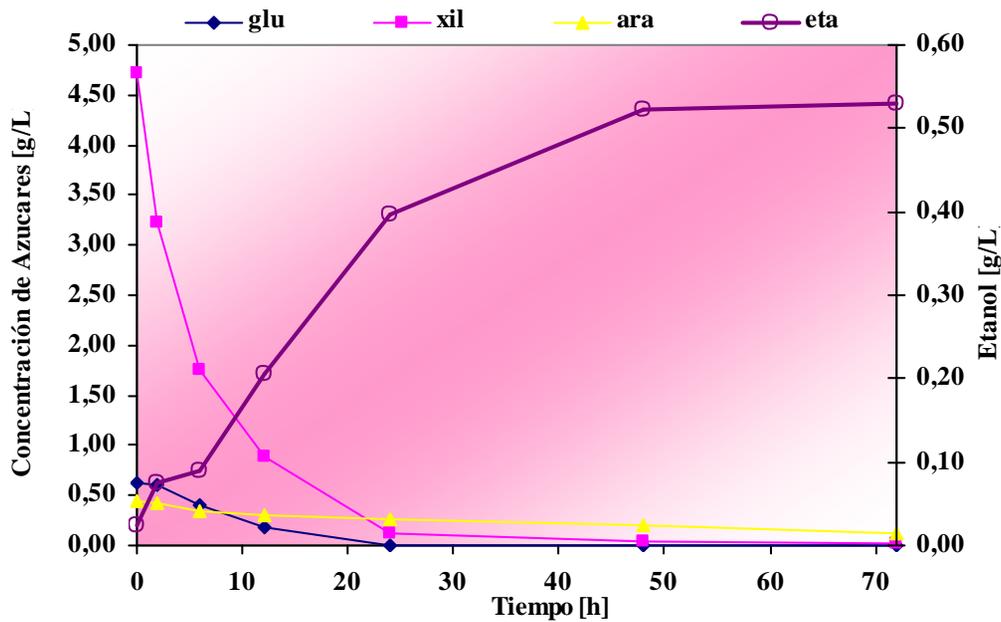
Figura 34. Cromatograma representando la producción de etanol y consumo de azúcares por la *Pichia stipitis* CBS 5773 después de las 72 h



Fuente: Elaboración propia

Según la Figura 35 en condiciones aeróbicas el etanol producido entra en descenso (fase etanólica) después del consumo total de azúcares glucosa en un 100% (después de 72 h) y de xilosa en un 97.67% (después de 24 h) Comparando las Figuras 33 y 34, el consumo respecto a la xilosa se incremento aproximadamente en un 2% para las condiciones no estrictamente anaerobias (fermentativo).

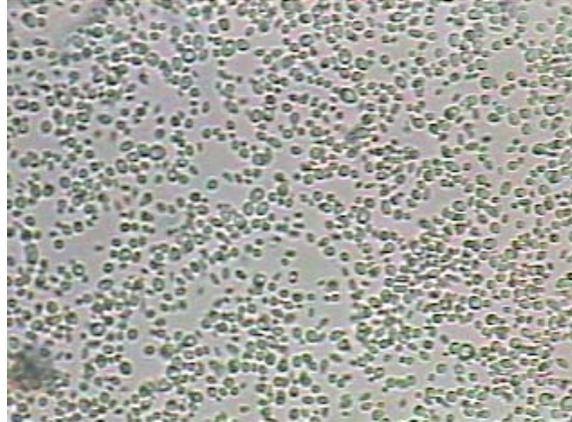
Figura 35. Fermentación con la *Pichia stipitis* CBS 5773 en medio de cultivo sintético en condiciones aeróbicas con relación a la concentración de etanol y azúcares.



Fuente: Elaboración propia

En la Figura 36 se observa la reproducción del microorganismo de manera progresiva donde la producción de biomasa se ve incrementada en la fermentación con la CBS 5773 en medio de cultivo sintético después de las 24h en condiciones aeróbicas.

Figura 36. Reproducción de la *Pichia stipitis* CBS 5773 en condiciones aerobias con medio de cultivo sintético después de las 72 h



Fuente: Elaboración propia

1.7 Producción de bioetanol a partir del hidrolizado de aserrín de *Curupaú*

La fermentación alcohólica y el crecimiento celular después de la adaptación en medio sintético (medio rico en xilosa) fue llevado utilizando el hidrolizado de aserrín de curupaú como sustrato en condiciones aeróbicas y no estrictamente anaeróbicas. En la Tabla 17, se observa que los azúcares fueron consumidos solo para incrementar la concentración de biomasa principalmente obteniéndose una concentración máxima de 12.24 g/L en un periodo de 72 h en condiciones aeróbicas. En condiciones anaeróbicas, la producción de biomasa se redujo considerablemente a 2.12 g/L en 72 h.

Tabla 17. Producción de biomasa durante la fermentación en condiciones aeróbicas y no estrictamente anaeróbicas con la *Pichia stipitis* CBS 5773 en medio de cultivo hidrolizado fracción líquida de aserrín de *Curupaú*

Tiempo (h)	Abs Con O ₂	[C]g/L	1/T*ln(Ci/Co)	Abs sin O ₂	[C]g/L	1/T*ln(Ci/Co)
0	0,23	0,24	0,00	0,32	0,33	0,00
1	0,36	0,36	0,05	0,49	0,49	0,68
2	0,40	0,41	0,09	0,54	0,55	0,39
4	0,51	0,52	0,10	0,52	0,53	0,19
6	1,28	1,27	0,22	0,82	0,82	0,20
12	2,12	2,10	0,15	2,50	2,48	0,19
24	3,50	3,47	0,10	3,14	3,12	0,10
48	7,94	7,85	0,07	2,75	2,73	0,05
72	12,40	12,24	0,05	2,14	2,12	0,03

Fuente: Elaboración propia

El consumo de azúcares y la producción de etanol por la levadura adaptada dieron como resultados porcentajes de consumo de azúcares altos y bajos rendimientos de alcohol con los medios sintéticos. En condiciones anaeróbicas, el consumo de glucosa fue de un 100% (después de 72 h) y xilosa de 99.79% (después de 72 h). Por su parte el rendimiento teórico de etanol (Yea) fue de 0.26 (g/g), al tanto por ciento este fue de 51.77% y un rendimiento de biomasa (Yxa) de 0.16 (g/g) después de las 72 h como se observa en la Tabla 18. Para las condiciones aeróbicas, los consumos respectivos de glucosa y xilosa fueron 100% (72 h) y 98.38% (72 h), respectivamente. El rendimiento de etanol (Yea) disminuyó considerablemente a 0.07 (g/g), expresada en tanto por ciento se obtuvo un 13.02% y el rendimiento de biomasa aumento a 0.27 (g/g) después de las 72 h.

Tabla 18. Rendimiento de producción de etanol por la *Pichia stipitis* de los productos en medio de Cultivo con sustrato hidrolizado fracción líquida durante la fermentación

Condición	Azúcares Iniciales		Consumo de Azúcares		Producción de Etanol [g/L]	Rendimientos		
	Glucosa [g/L]	Xilosa [g/L]	Glucosa [%]	Xilosa [%]		Yea [g/g]	Yea [%]	Yxa [g/g]
Anaerobio ⁽¹⁾	0,67 ⁽²⁾	4,86 ⁽²⁾	100 ⁽²⁾	99,79 ⁽²⁾	1,46 ⁽²⁾	0,26 ⁽²⁾	51,77 ⁽²⁾	0,16 ⁽²⁾
Aerobio	0,67 ⁽²⁾	4,86 ⁽²⁾	100 ⁽²⁾	99,74 ⁽²⁾	0,37 ⁽²⁾	0,07 ⁽²⁾	13,02 ⁽²⁾	0,27 ⁽²⁾
Aerobio	0,69 ⁽³⁾	4,94 ⁽³⁾	100 ⁽³⁾	98,38 ⁽³⁾	0,32 ⁽³⁾	0,06 ⁽³⁾	11,49 ⁽³⁾	0,07 ⁽³⁾

Fuente: Elaboración propia

⁽¹⁾ No estrictamente anaeróbico

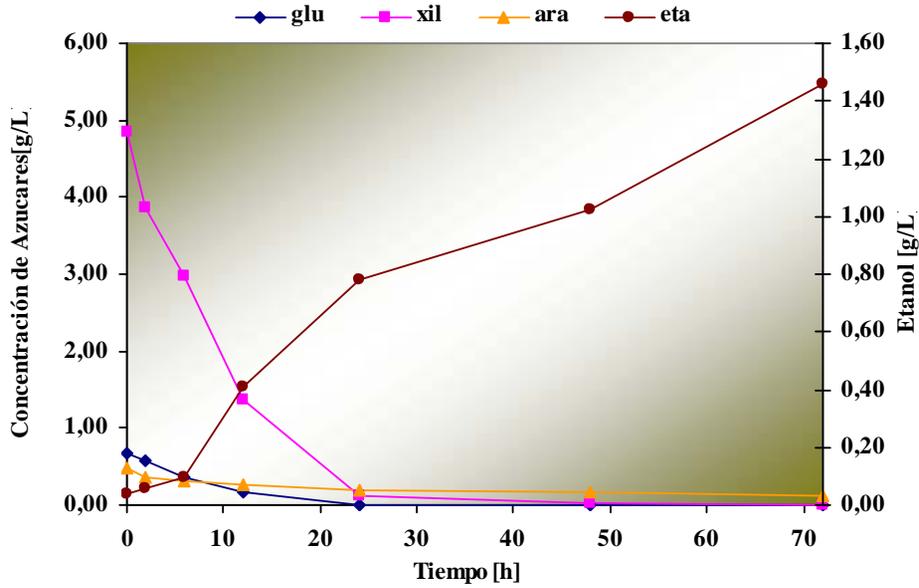
⁽²⁾ Después de 72 horas

⁽³⁾ Después de 24 horas

Las Figuras 37 (condiciones anaeróbicas) y 38 (condiciones aeróbicas) representan una rápida fase exponencial en ambos casos proporcionalmente por altos consumos de azúcares (glucosa y xilosa) denominada competición de transportes de fuentes de carbón pero con bajos rendimientos de etanol. La producción de biomasa dependiendo de las condiciones corroboran resultados bibliográficos pero con la diferencia del medio utilizado como es el hidrolizado de curupaú.

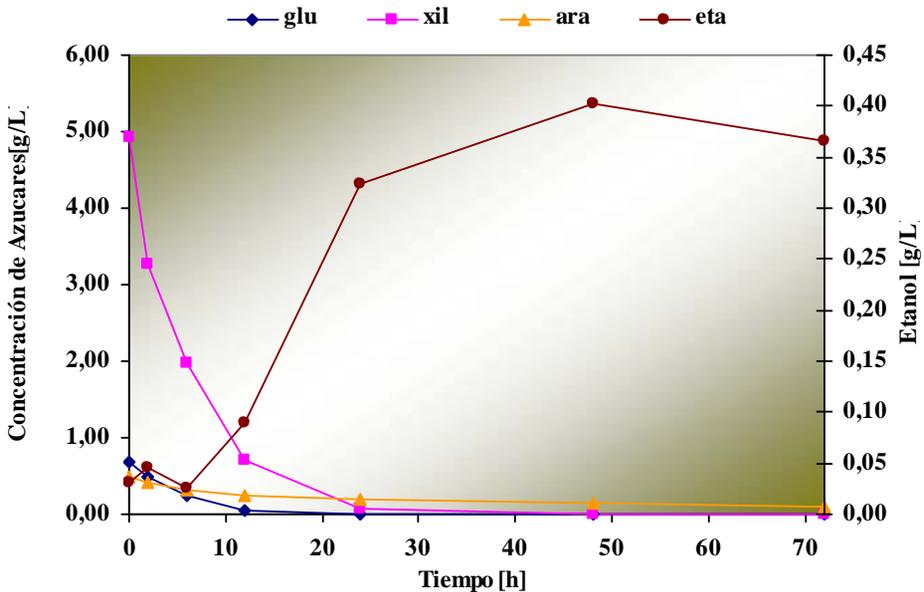
Los cálculos realizados del rendimiento teórico de etanol utilizando curupaú comparándolos con los de los sustratos sintéticos se ve principalmente influenciada por la presencia de inhibidores conocidos (ácido acético, HMF y furfural) y desconocidos (poli fenoles y ácidos orgánicos) en el sustrato.

Figura 37. Fermentación con la *Pichia stipitis* CBS 5773 en medio de cultivo sustrato hidrolizado fracción líquida en condiciones no estrictamente anaeróbicas (fermentativas) con relación a la concentración de etanol y azúcares.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 38. Fermentación con la *Pichia stipitis* CBS 5773 en medio de cultivo sustrato hidrolizado fracción líquida en condiciones aeróbicas con relación a la concentración de etanol y azúcares.



Fuente: Elaboración propia

VII. DISCUSIÓN

1. PRETRATAMIENTO PARA LA HIDROLISIS DEL ASERRIN DE *Curupaú*

Diferentes técnicas de pretratamiento ácido-diluidos son desarrollados por diferentes institutos de investigación que reportan la preparación de la materia prima para una mejor hidrólisis, en este caso el aporte de este trabajo es colaborar con el desarrollo del pretratamiento en el cual ya se tiene referencia sobre el tipo de madera y su composición realizada por la investigación “aprovechamiento de residuos lignocelulósicos de las industrias madereras para la producción de bioetanol” (ver ref.), donde se hacen algunas correcciones de los métodos desarrollados en un nuevo lignocelulósico como es el *curupaú*, materia prima caracterizada por un alto porcentaje de celulosa y una considerable presencia de hemicelulosa. En la hidrólisis ácida, que existe ya desde hace mucho tiempo en la producción de etanol a partir de madera, se estudia una amplia gama de tipos de maderas (FUNDES, 2005), pero donde no se menciona el recurso lignocelulósico en estudio.

Para obtener el hidrolizado de aserrín de *Curupaú* se busco las mejores condiciones para una adecuada extracción de los azúcares fermentables, esto se logra mediante el Diseño Experimental realizado por Quispe, 2007 en el IIDEPROQ; participándose de manera conjunta con el IIFB en el desarrollo del pretratamiento, y posteriores análisis dando a discusión de que factores en la hidrólisis influyen para la extracción de los azúcares fermentables. La elección y el estudio de las variables en el pretratamiento fueron evaluadas siendo las mismas la temperatura, tiempo de residencia, concentración de ácido sulfúrico y la humedad de la madera.

Los resultados demuestran que un incremento de temperatura no favorece a la extracción, y es mejor trabajar a temperaturas moderadas en este caso 200 °C porque a esa temperatura se liberan mejor las pentosas (xilosa y arabinosa), además de obtener bajas concentraciones de subproductos (ácido acético, HMF y furfural). La concentración de ácido sulfúrico, juega también un papel importante en la extracción de azúcares puesto que actúa como catalizador durante el pretratamiento, a mayores concentraciones de ácido se tiene mejores extracciones, pero no se pueden manejar concentraciones muy elevadas de ácido sulfúrico por el echo de que se deterioran mas rápidamente los equipos y se obtienen mayores concentraciones de productos degradados. El tiempo y la humedad, influyen en la

extracción de manera mas discreta que los anteriores acorde a (Quispe, 2007), pero se deben considerar, porque interactúan con los otros factores en el modelo experimental.

La determinación de monosacáridos y oligosacaridos es preponderante ya que si solo contamos con la referencia de azúcar total, no sabemos en que cantidad se hidrolizaron los oligomeros, eso significa que no solo buscamos tener la mas alta concentración de azucares sino que buscamos tener la mas alta concentración en monómeros. Como se ve la xilosa es más fácil de extraer en una etapa de hidrólisis ácida, comparada con la glucosa en una segunda etapa. (Choi, C.H. y col., 1996).

Los resultados obtenidos de la prueba # 23 según Quispe, 2007, fueron motivos para iniciar la investigación en la utilización de hidrolizados ricos en xilosa a partir de aserrín de *Curupaú* así mismo en este trabajo se realizo la cuantificación de monosacáridos y oligosacaridos corroborando los datos previamente estudiados. En la obtención del hidrolizado se alcanzo una concentración representativa de xilosa, obteniéndose una mayor cantidad de monómeros respectos a los oligomeros obteniendo un sustrato idóneo para el crecimiento y fermentación de la *Pichia stipitis*.

2. COMPORTAMIENTO DEL CULTIVO DE CEPAS *Pichia stipitis* CBS 6054, 5770 Y 5773 FRENTE A LA DIFERENCIA EN CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO MIXTO (GLUCOSA Y XILOSA).

Las levaduras, tanto cuando metabolizan oxidativamente como fermentativamente la glucosa, pueden asimilar una parte de la misma, acumulándola en la biomasa celular en forma de glucógeno, grasa, etc. El principio de la adaptación del microorganismo hacia un medio de cultivo rico en xilosa se enfoca en la asimilación de la misma donde puede valorarse midiendo los azucares totales y las células del cultivo. (Ramón Pares y Antonio Juárez, 1997).

Si la concentración de azúcar es el factor limitante del crecimiento en un cultivo proliferante, entonces podemos tener un desarrollo equilibrado en el cual el numero de células, el peso en seco el RNA y DNA se incrementan a la misma velocidad, pero esto no ocurre cuando el sustrato esta en exceso, ya que entonces se producen velocidades diferentes de incremento de uno o varios de estos parámetros. (Ramón Pares y Antonio Juárez 1997)

El comportamiento del cultivo de cepas *Pichia stipitis* frente a la diferencia en concentración de sustrato sintético mixto (glucosa y xilosa) se la realiza en función a una concentración de sustrato de azúcares de 20g/L. La relación de azúcares para cada experimento fue la siguiente: Experimento 1 (10:10), Experimento 2 (5:15) y Experimento 3 (1:19) resultados reportados en las Tablas 10, 11 y 12, éstas dos fuentes de carbono fueron consumidos durante la ruta metabólica de la glicólisis, el microorganismo puede dirigirse por dos rutas donde una es solo para proporcionar la energía necesaria para la célula en condiciones (aeróbicas) y así incrementar el rendimiento en biomasa y la otra para la producción de etanol en condiciones anaeróbicas.

La evaluación realizada durante un periodo de 48 h concluye que la CBS 5773 respondió mejor en el experimento 3 dando como concentración máxima de células 8.74 g/L en medio sintético. El crecimiento y la actividad química de la levadura en un cultivo dependen del medio en que han sido preparado el inóculo, por esto para trabajar en un sistema de células hay que hacer previamente varias resiembras y cultivos en el mismo medio con el sustrato como factor limitante de esta manera, utilizando xilosa como sustrato, puede estudiarse su degradación biosintética con formación de células de levadura, etanol y CO₂. (Ramón Pares y Antonio Juárez 1997)

3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL OXIGENO (aireación)

La influencia del oxígeno fue estudiado en la cepa CBS 5773, los resultados obtenidos evidencian un mayor crecimiento en medios sintéticos ricos en xilosa bajo condiciones aireación y micro aireación. Cuando la concentración de azúcares es el factor limitante del crecimiento se obtiene mucha más biomasa en aerobiosis (Ramón Pares y Antonio Juárez 1997), en este caso la producción celular y CO₂ por gramo de azúcar consumida es mayor que en la fermentación en condiciones aeróbicas. La *Pichia stipitis* seleccionada en condiciones aeróbicas reporto resultados dentro de lo esperado según (D.R.J. Grootjen y col, 1990), donde la asimilación de xilosa en presencia de oxígeno es la más adecuada porque contribuye con la respiración de la célula que es un proceso de producción de energía donde el oxígeno actúa como último aceptor de electrones, en tanto en la cadena de transporte contribuye generando más ATP para mantener la permeabilidad de la membrana lo cual es importante para el microorganismo (Ramón Pares y Antonio Juárez 1997). La evaluación realizada durante un periodo de 48 hrs. reporto resultados altos en condiciones aeróbicas

alcanzando una concentración máxima de 8.81 g/L. El dato de asimilación alcanzado permitió realizar el estudio en un reactor de 2.5 L de capacidad utilizando un volumen de 1L para el cultivo de la CBS 5773 en condiciones optimas (pH 5.0, oxígeno 2Lmin^{-1} , temperatura 30°C y tiempo 48h), de esta manera se mejoro la concentración de biomasa alcanzadazo un máximo de 9.30 g/L., puesto que contiene un software con un historial que almacena toda la información de lo transcurrido a cada minuto y mantiene todas las condiciones ya mencionadas constantes.

4. PRODUCCION DE BIOETANOL

Como otros microorganismos, muchas levaduras son facultativas y la fermentación solo tiene lugar cuando falta oxígeno. Sin embargo, en los medios azucarados en presencia de aire se pasa espontáneamente al proceso anaerobio porque el consumo de oxígeno es muy alto, por lo que se agota rápidamente. Además la abundante producción de CO_2 suele desplazar el aire de la atmósfera, dificultando la disolución del oxígeno. (Ramón Pares y Antonio Juárez 1997).

Si a una suspensión celular se le añade xilosa, tiene lugar inmediatamente una activa fermentación hasta el agotamiento del sustrato. No obstante no hay crecimiento, puesto que la biosíntesis esta prácticamente bloqueada por la falta de fuentes de N, P, y S. El sistema de células no proliferante o en reposo permite la obtención de una fermentación activa de la xilosa con concentraciones del 5 al 10%. La fermentación con sustrato sintético sirvió de referencia comparativa con la fermentación del hidrolizado de aserrín de curupaú. Las concentraciones de azúcares fermentables fueron calculadas y exactamente preparadas para el medio sintético determinadas durante acondicionamiento del pretratamiento del hidrolizado en condiciones aeróbicas como parcialmente anaeróbicas, según (Quispe, 2007) en condiciones anaeróbicas las levaduras fermentan mejor los azúcares porque el 10% lo utiliza como fuente de carbono y el 90% para producir etanol, otras investigaciones demuestran que la *Pichia stipitis* fermenta mejor en condiciones no estrictamente anaeróbicas (fermentativas) y de oxígeno limitado. Según los resultados obtenidos, el rendimiento de producción de etanol en sustrato sintético Y_{ea} fué 0.40 (g/g) resultado que expresa un buen rendimiento porque al fermentarse este medio demuestra una adecuada adaptación y no existe influencia por parte de los inhibidores que se logro determinar ya que podría existir otros inhibidores que no se determinaron por la dificultad de contar con otros estándares que perjudiquen

la fermentación, en comparación con la fermentación con hidrolizado de aserrín de *Curupaú* como sustrato en condiciones no estrictamente anaeróbicas (fermentativa). El rendimiento de producción teórico de etanol alcanzado en el hidrolizado Y_{ea} fue de 0.26 (g/g) después de las 72 hrs. Sin duda la disminución de este rendimiento se ve afectada por la presencia de inhibidores extraídos durante el pretratamiento. Las bajas concentraciones de inhibidores conocidos (ácido acético, HMF y furfural) permiten contradecir la discusión explicada anteriormente, posiblemente la presencia de otros sub-productos no conocidos (compuestos fenólicos y otros) coadyuven una mayor inhibición en la fermentación. Una posible alternativa para resolver este problema es la detoxificación del hidrolizado mediante distintos métodos. (JN Nigam, 2000).

La fermentación alcohólica y el proceso respiratorio permiten esperar, respectivamente, una producción de CO_2 o un consumo de 134.4 mL de O_2 por mili mol de azúcar utilizada, se ha demostrado en investigaciones estudiadas el efecto del oxígeno en el metabolismo de xilosa y glucosa por la *P. stipitis* donde es necesaria para la fermentación con formación de etanol y producción de biomasa en bajos flujos de 0.005 mol/Lh según (D.R.J. Grootjen y col, 1990).

En la presente investigación se observaron limitantes en la medición de bajos flujos de oxígeno requeridos necesariamente por el microorganismo. Sin embargo la determinación experimental en condiciones aeróbicas muestra un rendimiento de producción de etanol en sustrato sintético *Yea* fue 0.10 (g/g) después de las 24 h resultado que expresa una baja producción de etanol, puesto que el microorganismo en presencia de oxígeno en su medio de cultivo produce más biomasa que etanol alcanzando un valor máximo de 14.3 g/L de concentración en biomasa según la Tabla 15, y el rendimiento de biomasa Y_{xa} fue 0.30(g/g) respecto a los azúcares iniciales después de las 72 h en comparación de la fermentación en sustrato hidrolizado la producción de etanol *Yea* fue 0.06 (g/g) después de las 24 h de la misma manera en condiciones aeróbicas produce más células donde reporta una concentración de 12.24g/L según la Tabla 17 y el rendimiento de biomasa Y_{xa} fue 0.27(g/g) respecto a los azúcares iniciales después de las 72 h en comparación con el sintético este valor se encuentra esta por debajo ya que se vio influenciada por la presencia de subproductos presentes en hidrolizado de aserrín de *Curupaú*.

VIII. CONCLUSIONES

1. PRETRATAMIENTO PARA LA HIDROLISIS DEL ASERRIN DE *Curupaú*

El tipo de pretratamiento con las variables establecidas ([C] de H₂SO₄, temperatura, tiempo y humedad) fueron consideradas para realizar el diseño experimental realizado por (Quispe, 2007) en el IIDEPROQ poniendo en marcha 40 pruebas; participándose de manera conjunta con el IIFB en el desarrollo del pretratamiento, así como también en la cuantificación de los azúcares extraídos (monosacáridos y oligosacáridos), pero dentro de ellos los monómeros son más importantes por ser los azúcares fermentables. En la obtención del hidrolizado se alcanzó una concentración representativa g/L de xilosa 5.14, de glucosa 0.69 y de arabinosa 1.13 con las condiciones ya establecidas de las variables (1.5 % de H₂SO₄, 200 °C, tiempo de residencia 10 min, 60% de humedad), a partir de esas condiciones se realizó la producción de hidrolizados según el volumen necesario para posteriores pruebas experimentales.

2. COMPORTAMIENTO DEL CULTIVO DE CEPAS *Pichia stipitis* CBS 5770, 5773 Y 6054 FRENTE A LA DIFERENCIA EN CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO MIXTO (glucosa y xilosa).

Se modificó paralelamente tres tipos de concentraciones con sustrato sintético mixto en el medio de cultivo de las cepas *P. stipitis* CBS 5770, 5773 y 6054 en la que la CBS 5773 respondió satisfactoriamente al medio de cultivo con el experimento 3 alcanzando la concentración máxima de biomasa 8.74 g/L durante un periodo de 48 h y una velocidad de crecimiento de 0.26 t⁻¹ en la fase exponencial del microorganismo alcanza a las 10 h, en la que se observa una significativa reproducción del microorganismo desde un medio de cultivo limitado en concentraciones de xilosa hasta un medio rico, representada con el experimento 3 con una relación de azúcares [glucosa: xilosa (1:19)]. Con el reporte de estos datos se concluye que la adaptación de la CBS 5773 en el medio de cultivo previamente establecido es la adecuada para realizar la fermentación y que el cambio no sea brusco a un sustrato rico en xilosa; azúcar presente en el hidrolizado de aserrín de Curupaú y así favorezca en la producción de etanol.

3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL OXIGENO (aireación)

La influencia del oxígeno fue estudiado en la cepa CBS 5773, los resultados obtenidos evidencian un mayor crecimiento en medios sintéticos ricos en xilosa bajo condiciones de aireación y micro aireación constantes donde se obtiene una concentración máxima de 8.81 g/L después de 48 h con estos datos se concluye que la *Pichia stipitis* debe crecer en condiciones aeróbicas constantes. El dato de asimilación alcanzado permitió realizar el estudio en un reactor de 2.5 L de capacidad utilizando un volumen de 1L para el cultivo de la CBS 5773 en condiciones óptimas dando lugar al escalamiento con una concentración alcanzada de 9.3 g/L.

4. PRODUCCION DE BIOETANOL

En la producción de bioetanol con sustrato sintético y en condiciones no estrictamente anaeróbicas (fermentativa) el rendimiento de producción de etanol es Yes 0.40 (g/g) siendo este el máximo dentro de estas dos condiciones lo cual hace referencia en la fermentación con hidrolizado que es donde se ve los inconvenientes por la presencia de inhibidores dando como rendimiento de producción de etanol Yes 0.26 (g/g), después de las 72 h en condiciones no estrictamente anaeróbicas (fermentativa).

IX. RECOMENDACIONES

- La mejora del rendimiento de etanol en la fermentación con hidrolizado se aserrín de *Curupaú* puede ser mucho mejor todavía empleando enzimas sobre la pulpa hidrolizada denominado sacarificación y fermentación simultanea (SSF).
- Se puede realizar otro pretratamiento sobre el ya se ha realizado al solidó rescatado en condiciones mas severas para rescatar mas azucres fermentables del que ya se tiene.
- Otra alternativa es la adaptación de los microorganismos a los inhibidores puede lograrse, mediante adaptaciones graduales del microorganismo a estos medios, atribuida a la síntesis de nuevos enzimas o coenzimas que afectan al metabolismo de los inhibidores
- También se puede emplear métodos de detoxificación sobre el hidrolizado, utilizando soluciones básicas para la precipitación de los inhibidores que interfieren durante la fermentación pero involucran mas costos.
- Teniendo el microorganismo optimizado y adaptado a un medio de cultivo rico en xilosa como azúcar fermentable, presente en hidrolizados provenientes de residuos lignocelulosicos lo cual es aprovechable en Bolivia por su abundancia. Con esta investigación se hace una contribución para disminuir la dependencia de petróleo por países exteriores.

X REFERENCIAS

- BOLFOR, Proyecto de Manejo Forestal Sostenible, 2004
- BOLFOR, Proyecto de Manejo Forestal Sostenible, 2004.
- Browning, B.L. 1993, ed. The chemistry of wood Interscience, 687 p. Nueva York.
- C. Y. Liang, K. H. Bassett, E. A. McGinnes, y R. H. Marchessault, Tappi, 43, 1017 (1960)
- Cahela, D. R., Lee, Y. Y., Chambers, R. P., 1983. Modeling of percolation process in hemicellulose hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. 25, 3-17.
- Cámara Forestal de Bolivia, 1999
- Claassen PAM, van Lier JB, López Contreras AM, van Niel EWJ, Sijtsma L, Stams AJM, de Vries SS, Weusthuis RA (1999) Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 741-755.
- Clark, T. A and Menz, D. N. J. (1987), J. Wood. Chem. Technol. 7(3), 373-403
- Charlotte Tengborg, 2000. Bioethanol Production: Pretreatment and enzymatic hydrolysis of softwood. Departemnt of chemical Engineering 1 Lund University, Sweden. 1, 14.
- Cheng, I, S, and Lee, Y. Y: (1986), Enzyme Micro. Technol. 8(8), 503 – 507.
- Chol, C.H. y Mathews A.P., (1996), Two-step acid hydrolysis process Kenetics in the- Experimental studies on the formation and degradation of sugars, Bloresource Technology, 58:101-106
- Chum, H. L., Johnson, D. K., Black, S. K. and Overend, R. P. (1990) Pretreatment-catalyst effects and the combined severity parameter. Appl. Biochem. Biotechnol., 24/25, 1-14
- D.R.J. Grootjen, R.G.J.M. van der Lans and K. Ch. A. M. Luyben (1990) Effests of the aeration rate on the fermentation of glucosa and xylose by *Pichia stipitis* CBS 5773, 12:20-23.
- du Prez, J. C., van Driesse, L. B., and Prior, B. A. (1989), Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 53-58
- Duff, S. J. B., Murray, W. D., 1996 Bioconversion of forest products industry waste cellulosic to fuel etanol from <http://www.eia.doe.gov/oiaf/analysispaper/biomass.html>
- Echegaray, O, Carvalho J, Fernández A, Sato S, Aquarone E, Vitolo M (2000) Fed-batch cultivo of *Saccharomyces cerevisiae* in sugarcane blackstrap molasses; invertase activity of intact cells, in ethanol fermentation. Biomass Bioenerg. 19: 39-50
- El 90% de las emisiones de los gases que producen el efecto invernadero (principalmente el dióxido de carbono) proviene de la combustión de fósiles como el carbón, petróleo y sus derivados.
- En el Protocolo de Kyoto, establecido en la Tercera Conferencia de las Partes de la Convención Marco sobre Cambio Climático (CMCC), se acordó entre los países adherentes reducir en promedio un 5,2 % las emisiones de seis gases de efecto invernadero (dióxido de carbono, metano, óxido nitroso, hidrofluorocarbonos, perfluorocarbonos y hexafluoruro de azufre) respecto de niveles registrados en 1990, para el período 2008-2012.
- G.W. Monier – Williams, J. Chem. Soc. 119, 803 (1991)
- Guía Técnica del sector maderero 2005 FUNDES

- Guia Tecnica del sector maderero 2005 FUNDES.
- I. B. Sachs, I. T. Clark, y J. C. Pew, J. Polym. Sci., Part C, 2, 203 (1993)
- Ing. Daysy Torrico Sevilla, Curso Nacional de Biotecnología, 1994, 4.1-4.4.
- Ing. Mario Rodríguez , Manual de Identificación de Especies forestales de la sub región Andina, Instituto Nacional de investigación Agraria-Peru 2003, 195-210
- J.C. Irvine y C. W. Soutar, J. Chem. Soc. 117. 1489 (1990)
- J.C. Irvine y C. W. Soutar, J. Chem. Soc. 123. 518 (1993)
- JN Nigam, (2000), Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*, Journal of industrial Microbiology & Biotechnology, 26, 145-150.
- Jones, R. P. (1989), Enzyme Microb. Technol. 11 (3), 130 – 153
- Kerstin Stenberg, Charlotte Tengborg, Mats Galbe & Guido Zacchi, 1997, Optimisation of Steam Pretreatment of SO₂ – Impregnated Mixed Softwoods for Ethanol Production. Paper
- Kolot, F.B., 1980. New trends in yeast technology-- immobilized cells. Proc. Biochem., Oct/Nov, pp. 2-8.
- Kolot, F.B., 1980. New trends in yeast technology-- immobilized cells. Proc. Biochem., Oct/Nov., pp. 2-8.
- Ley del medio ambiente N° 1333 – 2000.
- Lohmeier-Vogel, E., Skoog, K., Vogel, H., and Hahn-Hägerdal, B. (1989), Appl. Environ. Microbiol. 55, 1974-1980
- Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS (2002) Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Microbiol. Mol. Biol. R. 66: 506-577.
- McMillan, J. D.; Newman, M. M.; Templeton, D. W.; Mohagheghi, A. Appl. Biochem. Biotechnol. 1999, 77-79, 649.
- McMillan, J.D., 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 100-120.
- Michael T. Madigan, Jhon M. Martin K. y Jack Parker Brock Biología de los Microorganismos, Décima edición, Pearson Prentice Hall 2004, Pg. 103-127
- Millet, M. A., Baker, A. J., Scatter, L. D., 1976. Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. Biotech. Bioeng. Symp. 6, 125-127.c
- Morrel, J. J. and Gartner, B. L. Wood as a material. In: Forest products biotechnology. Eds. Bruce, A. and Palfreyman, J. W., Taylor & Francis Ltd, London, UK, 1998, pp 1-14
- Overend, R. P. and Chorent, E. Fractionation of lignocellulosics by steamaqueous pretreatments. Phil. Trans. R. Soc. London, Series A, 1987, 321, 523-536.
- Parekh, S. R., Yu, S., and Wayman, M. (1986), Appl. Microbiol Biotechnol
- Pares I Farras R. y Juárez Giménez A. Bioquímica de los microorganismos Reverte, S. A. 08014 Barcelona 1997, Pg. 40-47
- Quispe Rivera Luís, Aprovechamiento de residuos lignocelulosicos – Proyecto de Grado, 2007
- RFA, Renewable Fuels Association, 2005, journal March, 2
- RFA, Renewable Fuels Association, 2005, journal March, 3

- RFA, Renewable Fuels Association, 2005, journal March, 4
- RFA, Renewable Fuels Association, 2005.
- Ronald VAN KLEEF,* Johannes FRANK, Jzn.,t Henk SCHREUDER,jJohannes P. VAN DIJKEN* and W. Alexander SCHEFFERS - Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylosefermentingyeast *Pichia stipitis* Cornelis VERDUYN,* Vol. 226, 1985 Pag. 669-677
- Rosillo-Calle y Cortez, 1998; Wheals et al, 1999
- Rosillo-Calle y Cortez, 1998; Wheals et al, 1999
- Skoog. K. and Hahn-Hägerdal, B. (1989), *Biotechnol. Lett.* 11(1), 1-6.
- Superintendencia Forestal de Bolivia, 2003 (1) 1-10
- Superintendencia Forestal de Bolivia, 2003 (1) 15.
- Superintendencia Forestal de Bolivia, Informe anual 2002, La Paz, 2002
- Superintendencia Forestal de Bolivia, Informe anual 2003, La Paz, 2003
- Torget, R. W. U.S. Patent 6,228,177, 2001.
- WWW. Metabolismo.com
- WWW. Microbiologia.com
- Watson, N.E., Prior, B.A., Lategan, P.M. and Lussi, M., 1984. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 6: 451-456.
- Watson, N.E., Prior, B.A., Lategan, P.M. and Lussi, M., 1984. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 6: 451-456.
- Winkelhausen Eleanora and Kuzmanova Slobodanka, *Microbial Conversión of D-Xylose to Xylitol* Faculty of Tecnology and Metalurgy, Vol. 86, 1998, Pag. 1-12.
- Yamané e Hirano (1977) y Jones y Anthony (1977).
- Yu, S., Wayman, M., and Parekh, S. K. (1987), *Biotechnol. Bioeng.* 29:1144-1150

ANEXO A

Características y reactivos empleados utilizados para preparar soluciones, identificación y cuantificación de los efluentes del reactor

Nombre del compuesto	Casa comercial	Pureza	Peso molecular
Acetonitrilo	Baker	Chromasol	41.05
Ácido Acético Glaciar	Riedel-de-Haëneg	99 %	61.04
Arabinosa	Sigma	99 %	150.13
Carbonato de Calcio	Merck	99.9 %	100.09
Furfural	Aldrich	99 %	96.08
Glucosa	Sigma	99 %	180.16
Hidroxi Metil Furfural	Sigma	99 %	126.11
Iso propanol	Merck	Chromasol	60.10
Xilosa	Sigma	99 %	150.13

Fuente: Elaboración propia, Aldrich

Características y reactivos utilizados para preparar soluciones de trazas de metal y vitaminas e identificación y cuantificación de productos de fermentación

Nombre del compuesto	Casa comercial	Pureza	Peso molecular
Acido Láctico	Aldrich	85 %	90.08
Agar Papa	Britania		
Ca-Phantothenate	Delta		
Cloruro Cobaltoso	Merck	99 %	129.84
Cloruro de Calcio 2 H ₂ O	AnalaR	99 %	147.01
Cloruro de Magnesio x H ₂ O	Baker	99.99 %	125.84
Cloruro de sodio	Merck	99 %	58.44
Cloruro Manganoso	Merck	99 %	146.9
Dicromato de Potasio	Baker	99 %	294.18
EDTA	Riedel-de-Haëneg		
Extracto de Levadura	Mcm		
Fosfato di Ácido de Potasio	Cicarelli	99.99 %	174.18
Molibdato de sodio 2H ₂ O	Merck	99.9 %	214.95
Nicotinamida	Delta		
p- Aminobenzóico	Delta		
Peptona	Merck		
Pyridoxine, HCl	Delta		
Thiamine	Delta		

Fuente: Elaboración propia, Aldrich

Reactivos para el preparado de solución de Vitaminas

Reactivos utilizados y cantidades

Compuesto	Cantidad
p-Aminobenzoic acid (PABA)	100 mg
Nicotinic acid	500 mg
Calcium pantothenate	500 mg
Pyridoxine, HCl	500 mg
Thiamine, HCl	500 mg

Fuente: Production of Ethanol from Lignocellulosic Materials Barbel Hahn - Hagerdal

ANEXO B

Equipos de trabajo



HPLC



HIDROLIZADOR

SHAKER



SISTEMAS DE AIREACION ACOPLADOS AL SHAKER



FERMENTADOR



FOTOS PRETRATAMIENTO LÍQUIDOS Y SÓLIDOS HIDROLIZADOS

Toma de muestra



Impregnación con ácido sulfúrico



Filtrados de hidrolizados fracción líquida



Pulpa rescatada del hidrolizado filtrado



PREPARACION DEL ACONDICIONAMIENTO DEL INOCULO

Levaduras en incubadora



Erlenmeyers utilizado para preparar el inoculo



Sistema aerobio adaptado al Erlenmeyer

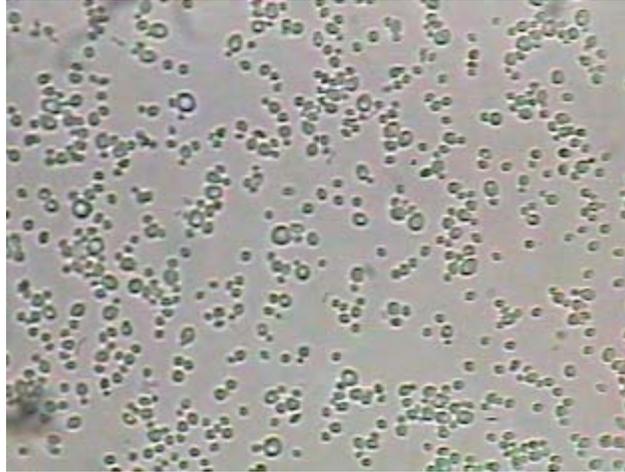


Levadura en agar para inocular al sistema aerobio

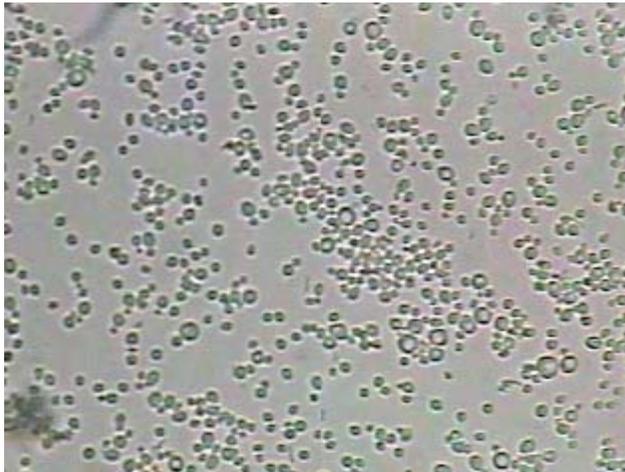


FOTOS REPRODUCCION DE LA CBS 5773 EN LOS EXPERIMENTOS

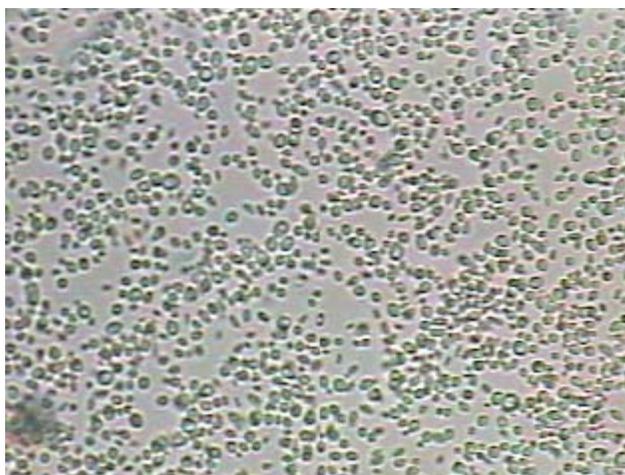
Experimento 1



Experimento 2



Experimento 3



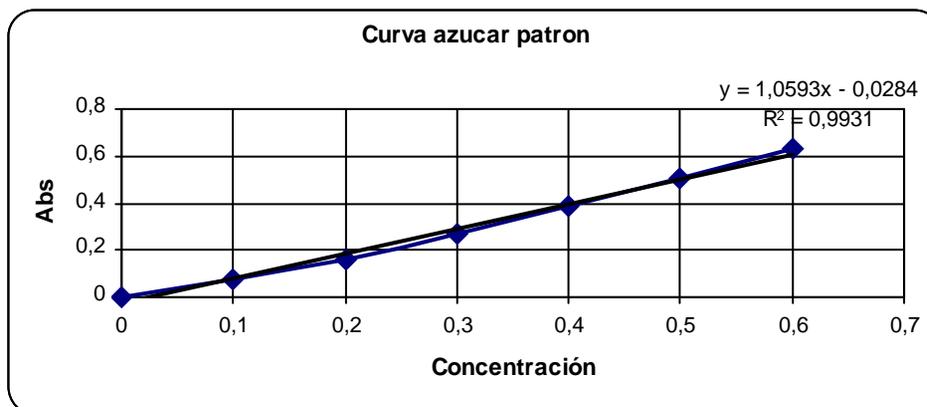
ANEXO C

Tabla 1.C. Mezcla de azúcares

Compuesto	Porcentaje %
Glucosa	40
Manosa	30
Galactosa	10
Arabinosa	10
Xilosa	10

Fuente: Elaboración propia

Figura 1.C. Curva de Calibración



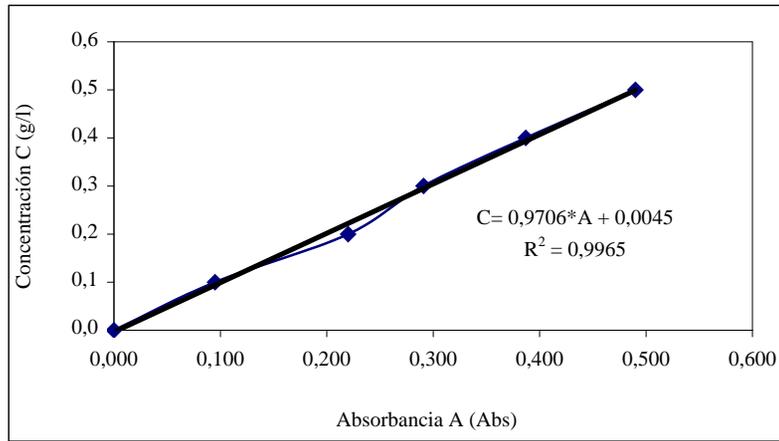
Fuente:Elaboración propia

Tabla 1C Diferentes concentraciones de Extracto de levadura

Curva de Calibración (g/l)	Abs
0,0	0,000
0,1	0,095
0,2	0,220
0,3	0,291
0,4	0,387
0,5	0,490

Fuente:Elaboración propia

Figura 2.C. Curva de calibración



Fuente: Elaboración propia

Figura 3C Regresiones Lineales del Experimento 1 CBS 5770

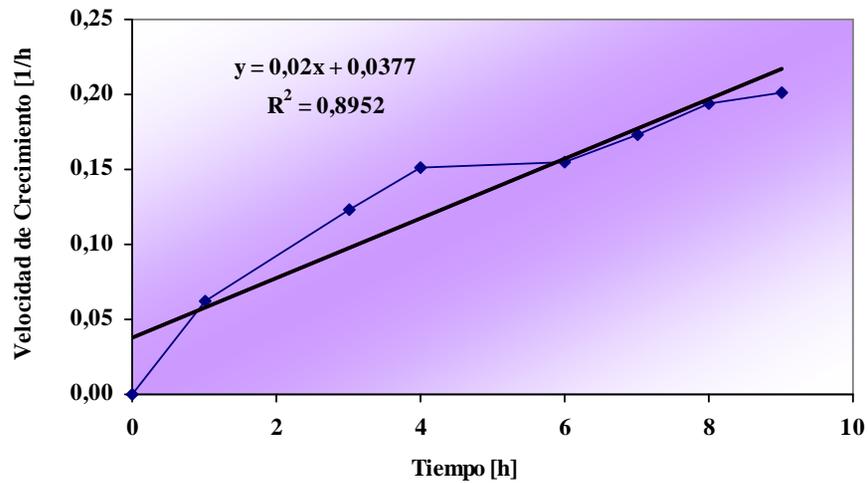


Figura 4C Regresión Lineal CBS 5770

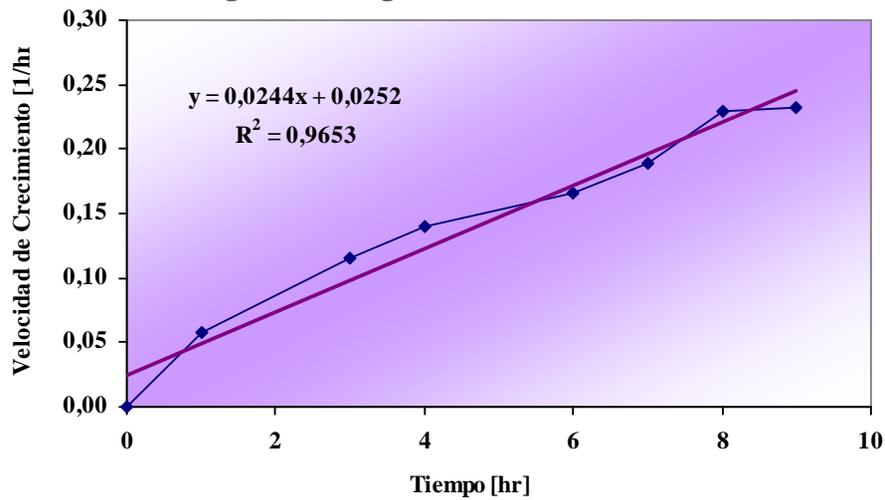


Figura 5C Regresión Lineal CBS 6054

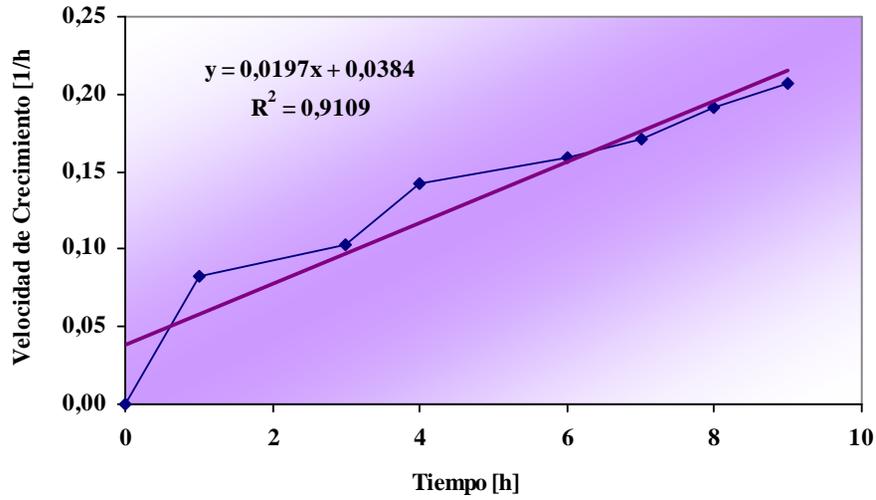


Figura 6C Regresión Lineal Experimento 2 CBS 5770

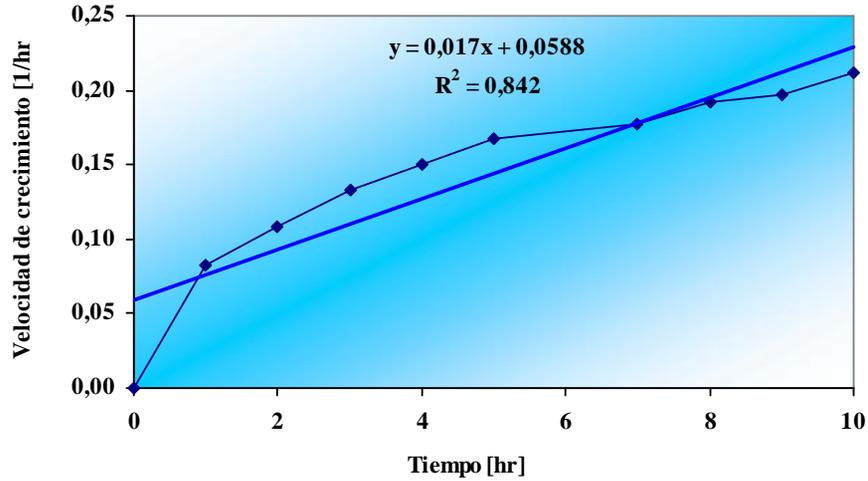


Figura 7C Regresión Lineal Experimento 2 CBS 5773

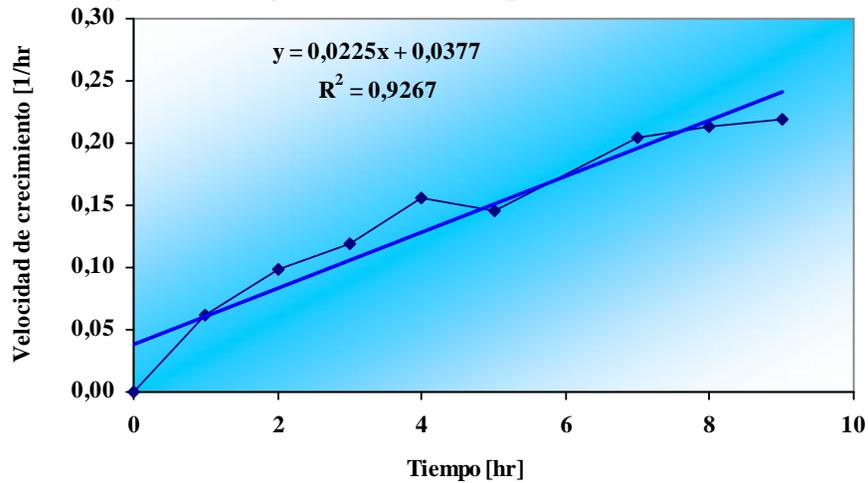


Figura 8C Regresión Lineal Experimento 2 CBS 6054

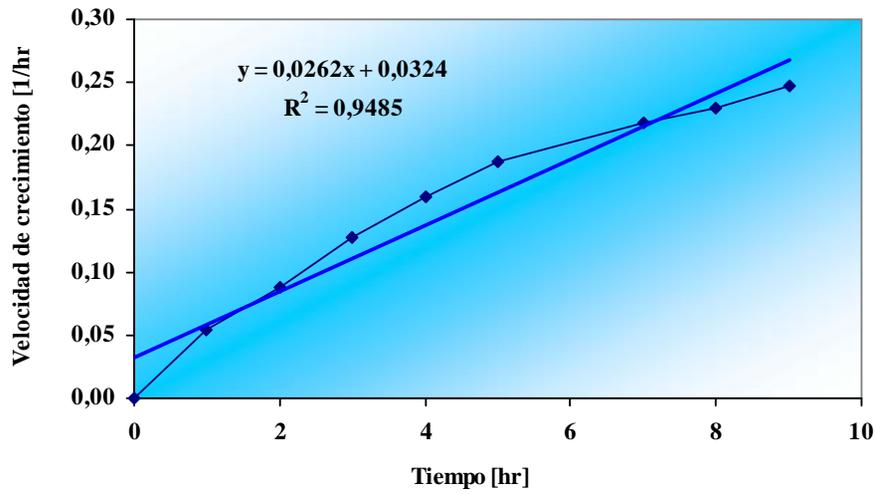


Figura 8C Regresión Lineal Experimento 3 CBS 5770

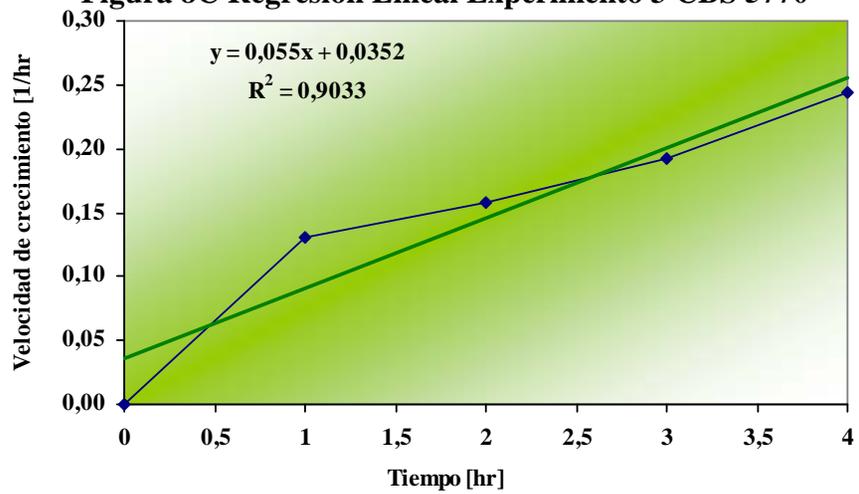


Figura 8C Regresión Lineal Experimento 3 CBS 5773

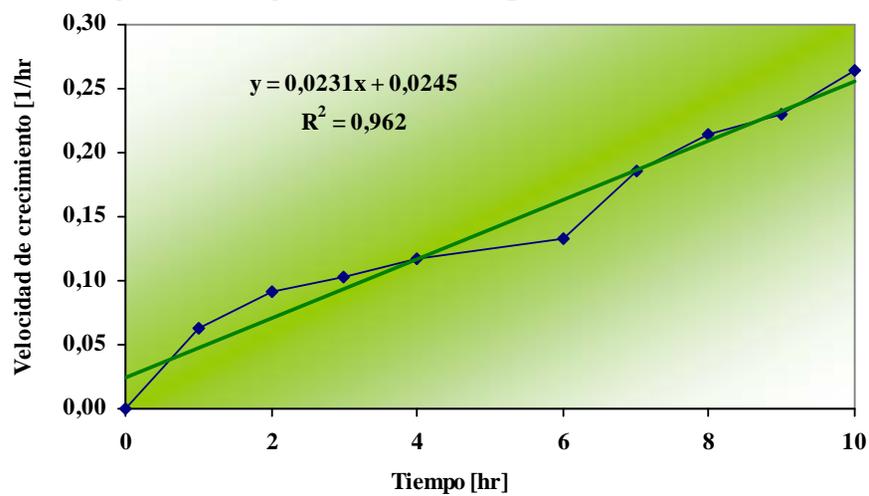


Figura 8C Regresión Lineal Experimento 3 CBS 6054

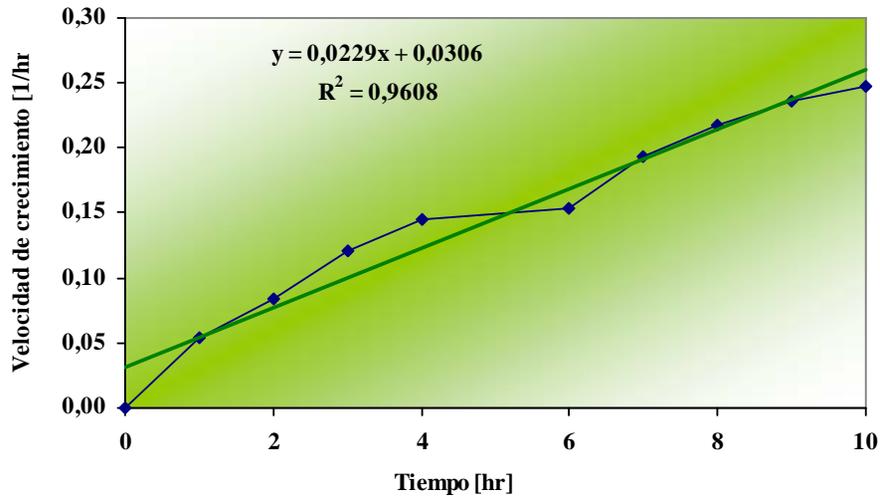


Figura 8C Regresión Lineal Influencia del Oxígeno de la CBS 5773 en condiciones Aerobias y Microaerobias

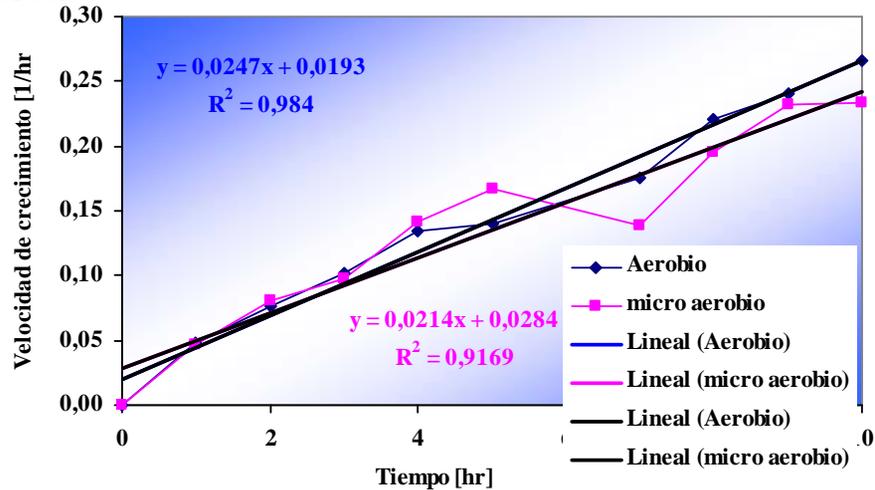


Figura 8C Regresión Lineal de la CBS 5773 en condiciones Optimas

