

# Universidad Nacional de Ingeniería

FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA  
Y MANUFACTURERA



## “ Estudio Tecnológico para la Conversión del Bagacillo en Sustrato Fermentable ”

**T E S I S**

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

***INGENIERO QUIMICO***

**ILDEFONSO SALINAS GLORIA**

**LIMA • PERU • 1985**

**ESTUDIO TECNOLÓGICO PARA LA CONVERSIÓN DEL  
BAGACILLO EN SUSTRATO FERMENTABLE**

**INDICE DE MATERIAS**

	<b>PAG.</b>
<b>CAPITULO 1      INTRODUCCION</b>	
<b>1.1    PROPUESTA</b>	<b>1.1</b>
<b>1.2    OBJETIVO</b>	<b>1.4</b>
<b>1.3    RESUMEN DE RESULTADOS</b>	<b>1.5</b>
<b>CAPITULO 2      FUNDAMENTOS TECNOLÓGICOS</b>	
<b>2.1    MARCO DE REFERENCIA</b>	<b>2.1</b>
<b>2.2    BIOTECNOLOGIA</b>	<b>2.2</b>
<b>2.3    SUCROQUIMICA</b>	<b>2.5</b>
<b>CAPITULO 3      PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO</b>	
<b>3.1    ORGANIZACION ADMINISTRATIVA</b>	<b>3.1</b>
<b>3.2    ORGANIZACION TECNICA</b>	<b>3.2</b>
<b>CAPITULO 4      ESTUDIO Y PRETRATAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA</b>	
<b>4.1    DEFINICION</b>	<b>4.1</b>
<b>4.2    ANALISIS QUIMICO</b>	<b>4.2</b>
<b>4.3    PRETRATAMIENTO DEL BAGACILLO</b>	<b>4.5</b>
<b>CAPITULO 5      PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL I : HIDROLISIS QUIMICA</b>	
<b>5.1    HIDROLISIS DE HÉMICÉLULOSAS</b>	<b>5.1</b>
<b>5.2    HIDROLISIS DE CÉLULOSAS</b>	<b>5.3</b>

	PAG.	
CAPITULO 6	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL II : HIDROLISIS ENZIMATICA	
6.1	ENZIMAS UTILIZADAS : ORIGEN Y DEFINICION	6.1
6.2	MEDIOS DE INDUCCION Y ACTIVIDAD ENZIMATICA	6.3
6.3	HIDROLISIS ENZIMATICA DEL BAGACILLO	6.8
CAPITULO 7	PROYECCION DEL ESTUDIO A ESCALA PRE - PILOTO	
7.1	ESCALAMIENTO	7.1
7.2	PROGRAMA DE ACTIVIDADES	7.3
7.3	PRESUPUESTO	7.4
CAPITULO 8	RESUMEN DEL ESTUDIO	
8.1	RESULTADOS	8.1
8.2	DISCUSION DE RESULTADOS	8.2
8.3	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	8.3
CAPITULO 9	NOMENCLATURA Y REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	
9.1	NOMENCLATURA	9.1
9.2	BIBLIOGRAFIA	9.2

## ANEXOS

- I ANALISIS DE LA MATERIA PRIMA
- II ANALISIS DEL PRODUCTO DE HIDROLISIS
- III PRESUPUESTO PARA ETAPA PRE - PILOTO
- IV NORMAS TAPPI PARA ANALISIS QUIMICO
- V DEFINICION DE TERMINOS QUIMICOS
- VI REACCIONES QUIMICAS DE HIDROLISIS
- VII DESCRIPCION DE LOS PROCESOS DE OBTENCION DE SUSTRATO FERMENTABLE

## CAPITULO 1 INTRODUCCION

### 1.1 PROPUESTA

Sociedad Paramonga Ltda. S.A. (SPL), dentro de sus diferentes actividades de producción, procesa el bagazo, un subproducto de la caña de azúcar para, mediante procedimientos elaborados convertirlo en pulpa y finalmente en papel.

En el procedimiento del bagazo existen etapas de depuración mecánica mediante las cuales se separan dos porciones denominadas fibra y polvillo.

La porción FIBRA constituye la parte aceptada del proceso de depuración y se destina a la fabricación de pulpa y papel.

La porción POLVILLO, denominado también BAGACILLO, está constituido por el material no fibroso y es el desecho del proceso de depuración (DESMEDULADO).

Actualmente el bagacillo es utilizado directamente como combustible de calderos para la producción de vapor.

De otro lado, SPL posee una línea de producción relacionada con fermentación. La materia prima para esta línea es la melaza, un subproducto de la fabricación de azúcar de caña.

El producto final es el alcohol etílico que en gran parte se destina a la fabricación de plásticos tipo PVC.

Como puede apreciarse en el Cuadro 1.1, en SPL no existe nexo entre los residuos celulósicos (bagacillo) y los procesos de fermentación alcohólica.

La propuesta de este estudio es establecer el mencionado nexo

de forma que las operaciones del Complejo Papelero - Químico de SPL se integren más efectivamente en un futuro cercano.

Las principales causas que amparan la propuesta son :

#### Factores Empresariales

- a. Demanda creciente de etanol para uso industrial.
- b. Escasez de melaza para fermentación (la melaza es única fuente no petroquímica del etanol industrial).
- c. Disponibilidad de ácido clorhídrico (agente de hidrólisis).
- d. Excesos estacionales de bagacillo para combustión en calderos.

#### Factores Tecnológicos

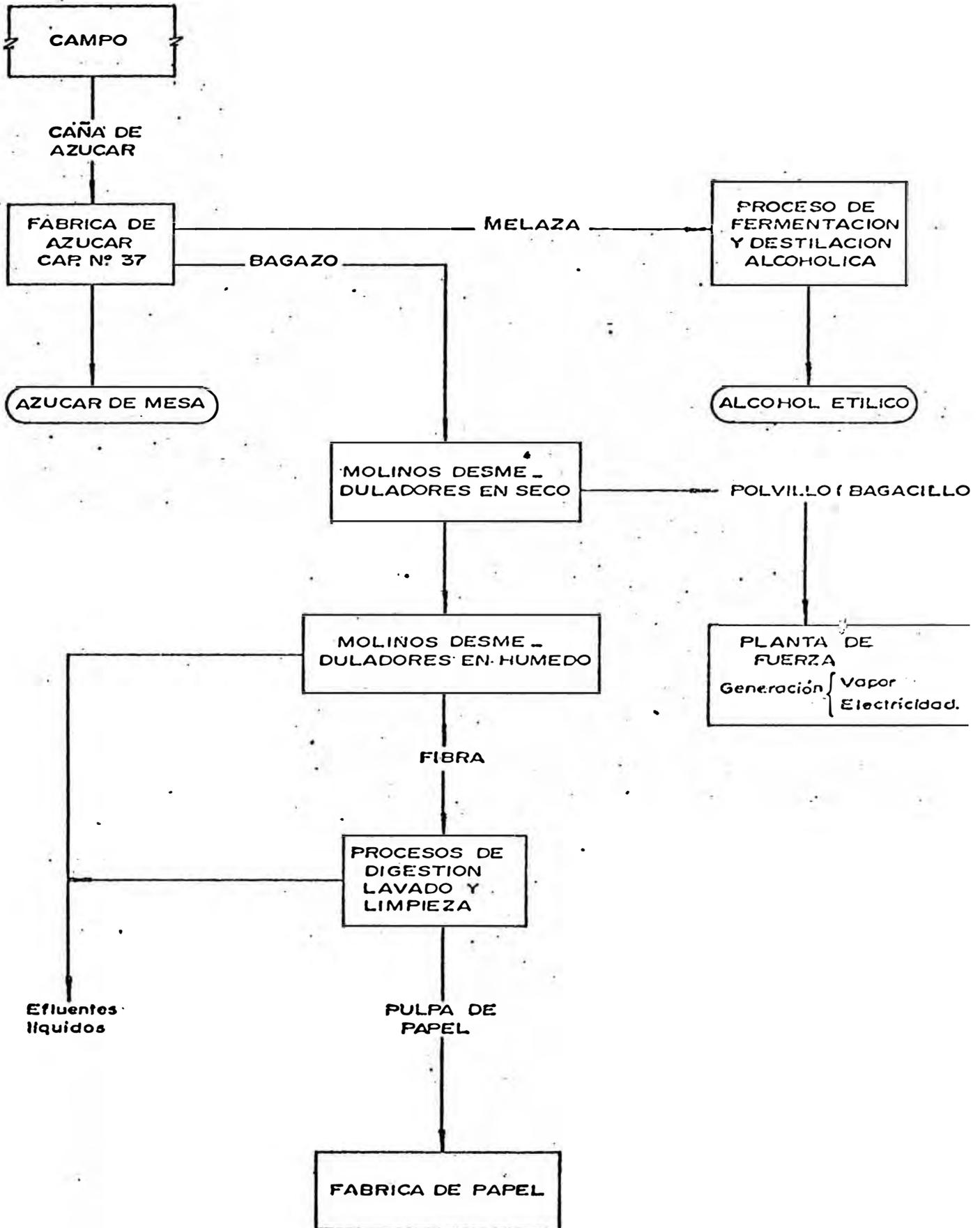
A nivel mundial, la sacarificación de materiales celulósicos se viene estudiando por más de 90 años y su aplicación a escala industrial está próxima a concretarse.

En la actualidad muchos países desarrollan intensa actividad de investigación sobre la producción de alcohol (etanol, metaanol) a partir de fuentes celulósicas renovables como parte de sus programas tecnológicos de energía no convencional.

El avance logrado por los programas energéticos se debe en gran parte a una disciplina novísima iniciada en la década del 70, y a mediano plazo, llamada a producir una evolución industrial : la BIOTECNOLOGIA.

CUADRO 1.1.

DIAGRAMA GENERAL DE PROCESAMIENTO DE RECURSOS CELULOSICOS EN S.P.L.



## 1.2 OBJETIVO DEL ESTUDIO

La consideración de los aspectos mencionados en la Sección 1.1, aunados al hecho de que en el Perú muy poco se ha avanzado en este campo, trajo como resultado la formulación de este estudio.

En consecuencia, el objetivo primordial de este trabajo es el estudio de la obtención de productos susceptibles de ser fermentados a etanol u otros químicos, utilizando al bagacillo como fuente celulósica.

Dentro de este contexto se entiende que los productos susceptibles de fermentación son los substratos azucarados (soluciones de sacarosa o glucosa) y, el estudio de la obtención es a través de métodos experimentales que impliquen el uso de agentes de sacarificación de la celulosa ya sean estos químicos o biológicos.

### 1.3 RESUMEN DE RESULTADOS

A partir del estudio experimental se desprenden los resultados que se dan a continuación :

#### Hidrólisis de Hemicelulosas

- Rendimiento : 88.8% Expresado en peso de azúcares reductores sobre contenido de hemicelulosas en el bagacillo.
- Hemicelulosas en el bagacillo 22.52 % (base seca)\*
- Rendimiento de Hidrólisis :  $88.8 \times 0.2252 = 20\%$
- El mejor agente de hidrólisis es el ácido clorhídrico.

#### Hidrólisis de Celulosa

- Rendimiento promedio 80.6% : Expresado en peso de glucosa sobre celulosa contenida en el bagacillo.  
Celulosas en el bagacillo : 38.44 % (base seca)
- Rendimiento de Hidrólisis :  $80.6 \times 0.3844 = 31\%$
- La vía química y la vía enzimática arrojan resultados similares.
- En la vía química el mejor agente de hidrólisis es el ácido sulfúrico.

#### Rendimiento Total

El 51 % del peso de bagacillo seco se convierte a azúcares fermentables.

#### Hidrolizado

- El producto de hidrólisis se denomina hidrolizado.
- La mejor concentración obtenida fue de 3.4% expresado en peso de azúcares reductores sobre peso total.

-----  
\* Pentosanos 20.60%  
Otras Hemicelul. 1.92%

## CAPITULO 2 FUNDAMENTOS TECNOLOGICOS

### 2.1 MARCO DE REFERENCIA

Los residuos celulósicos provenientes de las actividades agropecuarias, forestales y municipales constituyen un gran potencial como recursos renovables energéticos y químicos. Las porciones celulósicas y hemicelulósicas son convertibles a azúcares, los que posteriormente pueden ser utilizados para producir alcohol como combustible y como insumo para la industria química. Además los residuos obtenidos de la transformación de la celulosa y hemicelulosa constituyen una fuente rica en proteínas para la alimentación animal y, eventualmente, para humanos.

La conversión de los residuos celulósicos a azúcares, se puede lograr mediante procesos químicos tradicionales, los cuales a su vez, presentan problemas derivados de la producción no controlada de sustancias tóxicas. Actualmente, existe una mejor posibilidad con el empleo de procesos completamente biológicos.

Esta última posibilidad se torna cada vez más factible por el uso de hongos celulolíticos entre los cuales la especie Trichoderma reesei es uno de los más promisorios.

Cualquiera sea el proceso a emplearse (químico o biológico), existe un gran problema inicial a solucionar : el contenido de lignina en los recursos celulósicos. Este componente no sólo es químicamente resistente, sino que su disposición estructural evita el acceso tanto de reactivos químicos como de enzimas hacia la celulosa.

## 2.2 BIOTECNOLOGIA

En la Sección 1.1 se mencionó la palabra Biotecnología, con cepto que es necesario aclarar. La Biotecnología (BT) se basa en la idea de que los organismos vivos pueden realizar muchos complicados procesos químicos y eléctricos con eficiencia muchísimo mayor y usando muchos menos recursos energéticos que los tradicionales procesos industriales.

En cierto modo, el hombre ha venido utilizando la BT durante milenios. Las cepas de levaduras y otros microorganismos usados en fermentación han sido criados para desempeñar una función específica. Ahora, sin embargo, un mayor entendimiento de cómo funcionan los organismos naturales y en particular de cómo las células individuales se reproducen y elaboran sustancias químicas, ha abierto una nueva panorámica.

La BT comprende dos técnicas principales

Inmovilización de enzimas

- Recombinante del Acido Desoxiribonucleico (ADN)

La primera ha sido desarrollada en los últimos 15 años y es a la vez más sencilla y menos sensacional que la segunda. Se basa en la ligazón de las enzimas o células productoras de enzimas a un medio neutro llamado sustrato.

Las enzimas, como es sabido, son catalizadores (o motivadores) naturales y complejos de las proteínas naturales, que fabrican las células para poner en movimiento las reacciones químicas. Debido a que las enzimas se hallan retenidas en un sitio, o "inmovilizadas" en el sustrato, existen menos problemas de recolección y regeneración que en los procesos de fermenta

ción normales.

La segunda técnica principal de la BT, más comunemente conocida por manipulación genética, se basa en cambiar la programación genética de una célula, lo que determina qué enzimas serán producidas.

Si consideramos a una célula simple como una fábrica enzimática, la tarea del "Ingeniero Genético" es adaptarla a la producción de una enzima específica para que ejecute un proceso médico o industrial más eficientemente.

Numerosas empresas multinacionales se hallan trabajando en este campo desde hace algo más de una década. Los logros más resonantes se están obteniendo en la industria farmacéutica, química, agricultura y de polución ambiental. Se prevé incluso que su resonancia será mayor que la revolución industrial lograda por el computador.

El Cuadro 2.2 ilustra los diferentes campos de la actividad industrial donde se aplica la BT.

## CUADRO 2.2

### CAMPOS DE ACTIVIDAD BIOTECNOLOGICA

#### ALIMENTACION Y AGRICULTURA

- Nuevos aditivos alimenticios

- Fijación de nitrógeno (no leguminosas)

- Mejoramiento de especies animales

- Mejoramiento de especies vegetales

#### EN INDUSTRIA QUIMICA

- Oxidación de olefinas

- Producción de Hidrocarburos

- Producción de Enzimas

- Plásticos reciclables

#### EN APLICACIONES ENERGETICAS

- Producción de Etanol

- Producción de Metanol

- Lixiviación de petróleo y minerales

#### EN APLICACIONES FARMACEUTICAS

- Producción de Anticuerpos

- Producción de hormonas de crecimiento

- Producción de Interferona

- Producción de Insulina Humana

- Producción de Vacunas

#### EN CONTROL DE POLUCION

- Descomposición de productos químicos

- Descomposición de pesticidas

- Lixiviación de minerales

### 2.3 SUCROQUIMICA

Como su nombre lo indica, la sucroquímica conceptúa la transformación química del azúcar (entiéndase sacarosa) en productos derivados que pueden ser de valor comercial.

La sacarosa comúnmente conocida como azúcar de mesa, es lejos, el carbohidrato más abundante que existe en la sabia de las plantas de cultivo. Es uno de los pocos compuestos orgánicos disponibles en estado de pureza excelente, en forma muy cristalina, a gran escala y a bajo costo. La sacarosa ha sido producida desde el año 2,000 A.C. a partir del jugo de la caña de azúcar y desde el año 1,800 de nuestra era a partir de remolacha azucarera.

En el Perú, al referirnos a un esquema sucroquímico, se tiene que poner énfasis en la importancia del recurso renovable caña de azúcar como materia prima principal generadora de energía y productos químicos mediante transformaciones adecuadas.

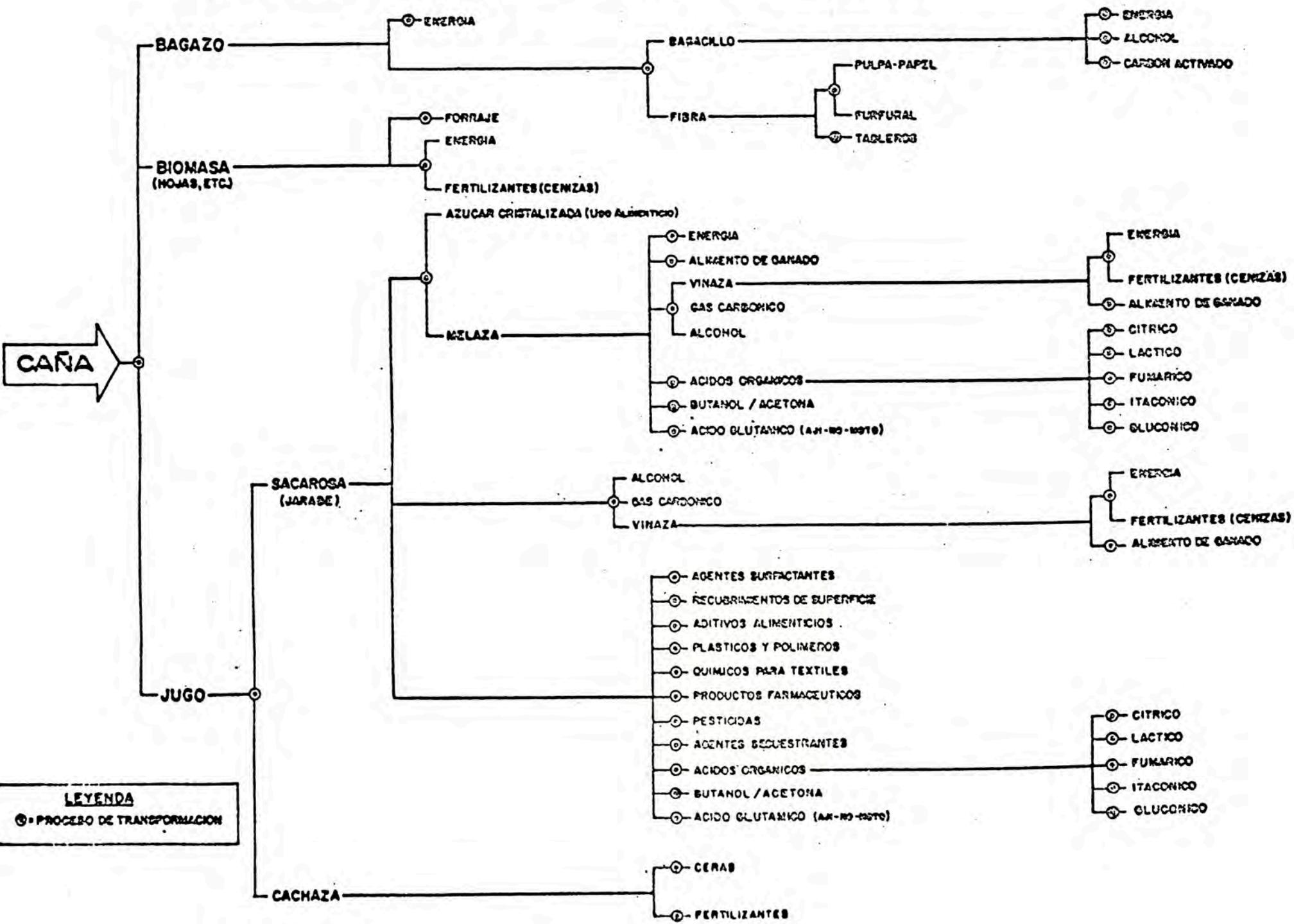
Tratándose de recursos de naturaleza orgánica, la sucroquímica tiene relación directa con el quehacer biotecnológico. En este aspecto, los procesos de fermentación son los mayormente involucrados y en la medida que la BT logre mayores progresos en este campo, la sucroquímica como disciplina de orientación al campo industrial se verá enormemente beneficiada.

Este estudio, por su naturaleza, se enmarca razonablemente dentro de un esquema sucroquímico pues tiene como fuente primordial a la caña de azúcar generadora del bagacillo. Asimismo, constituye actividad biotecnológica por hacer uso de procesos y técnicas relacionadas con BT.

INSTITUTO NACIONAL  
DE PROCESOS TECNOLÓGICOS  
INDUSTRIALES

El Cuadro 2.3 da una visión panorámica de lo que involucraría un esquema sucroquímico que tenga como base la caña de azúcar. Este estudio sigue la ruta del bagazo, luego del bagacillo para, finalmente propender a la producción de alcohol. Como puede apreciarse, es apenas una pequeña parte dentro - del todo sucroquímico.

# CUADRO 2.3 DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZUCAR



**LEYENDA**  
 ⊙ = PROCESO DE TRANSFORMACION

## **CAPITULO 3 PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO**

### **3.1 ORGANIZACION ADMINISTRATIVA**

**El estudio fue administrado en concordancia con un programa estructurado bajo las siguientes pautas :**

**Centro de Operaciones : Laboratorio de Micología - Dpto. de Biología, Universidad Nacional Agraria - La Molina.**

**Tiempo de Ejecución del Estudio : 10 meses**

**Personal : El Equipo de Trabajo se constituyó con tres profesionales (dos Ingenieros Químicos y un Biólogo) con funciones específicas e interrelacionadas para un desarrollo integral del estudio.**

**Marco Legal : Se concertaron dos convenios para este estudio :**

- a) Convenio SPL - ITINTEC mediante el cual se acuerda utilizar el 2% de la Renta Neta de SPL, que por ley le corresponde a ITINTEC, en el financiamiento del estudio.**
- b) Convenio SPL - UNA. Servicios e infraestructura de laboratorios que la UNA acuerda alquilar a SPL.**

### 3.2 ORGANIZACION TECNICA

Formado el Equipo de Trabajo y de acuerdo a los lineamientos que se mencionan en la Sección 3.1, se elaboró un Cronograma de Acciones coherente con una secuencia lógica de actividades a desarrollarse y tomando en cuenta la bibliografía consultada.

Las Etapas consideradas en el Cronograma como se muestra - en el Cuadro 3.2, cubrieron dos rutas de investigación tecnológica que era necesario evaluar para definir sus ventajas y desventajas en las condiciones de operación en laboratorio.

Estas rutas se identificaron como \*

**RUTA QUIMICA** Definida como el procedimiento relacionado con la hidrólisis del bagacillo utilizando - agentes químicos.

**RUTA BIOLÓGICA** - Definida por todas las actividades que involucran la hidrólisis del bagacillo utilizando microorganismos de acción celulolítica.

CUADRO 3.2

CRONOGRAMA DE ACCIONES

ETAPAS	RUTA QUIMICA	RUTA BIOLÓGICA
1. Revisión Bibliográfica	X	X
2. Adquisición de cepas celulolíticas ( <u>T. reesei</u> ) y reactivos importados		X
3. Adquisición de materiales y reactivos (nacionales)	X	X
4. Búsqueda de normas estándares para determinación de componentes de materia prima.	X	
5. Análisis químicos de materia prima.	X	X
6. Estandarización de técnicas para la manipulación enzimática.		X
7. Adecuación de métodos de tratamiento de materia prima	X	X
8. Estandarización de técnicas para la determinación de glucosa, azúcares reductores y proteínas solubles.		
9. Determinación de parámetros de crecimiento de <u>T. reesei</u> .		X
10. Determinación de variables óptimas de hidrólisis (concentración de ácido, temperatura, tiempo de reacción, etc.)	X	X
11. Análisis del producto de hidrólisis	X	X
12. Conclusiones	X	X
13. Reportes	X	X

## CAPITULO 4 ESTUDIO Y PRETRATAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA

### 4.1 DEFINICION

El material celulósico de principal interés para este estudio ha sido el bagacillo. Sin embargo, como es conocido, cualquier sustancia de base celulósica como la madera, los residuos de cosecha agrícola y los desperdicios municipales pueden ser acondicionados y utilizados para hidrólisis.

El aprovechamiento de los recursos biomásicos para su conversión en productos de interés comercial encierra problemas de disponibilidad, cantidad y oportunidad que deben evaluarse - antes de decidirse el empleo de alguno en particular.

La consideración de estos hechos hizo posible la elección del bagacillo, un residuo de la agroindustria que satisface los requerimientos mencionados, como materia prima para el estudio.

## 4.2 ANALISIS QUIMICO

La determinación de la composición química del bagacillo es el primer y fundamental paso para definir el tratamiento posterior a darse a la materia prima.

Los detalles analíticos se dan en el Anexo I. En resumen se realizaron las siguientes determinaciones

### Preparación de las Muestras

Las muestras se recolectaron en las instalaciones de la Fábrica de Papel en Paramonga. Estas muestras fueron acondicionadas y preparadas según las normas TAPPI T-11 m.

### Determinación de la Humedad

Se utilizó el método gravimétrico a 105°C como temperatura de secado y por el tiempo necesario para llegar a peso constante. La humedad promedio fue de 9.35%.

### Determinación del Contenido de Extractivos

Se consideraron extractivos en etanol, etanol-benceno y agua con los siguientes resultados promedios : 4.42%, 1.62 % y - 3.91 % respectivamente.

### Determinación del contenido de Celulosa

Se utilizó la técnica del ácido nítrico y alcohol. El porcentaje promedio de celulosa fué 38.44%. En una muestra se determinó el contenido de alfa-celulosa (según TAPPI T203-0561) - siendo ésta de 40.65%.

### Determinación del Contenido de Cenizas y de Lignina

La lignina fué determinada según las normas TAPPI T-13 05-54. El contenido promedio de este componente fué de 18.455 y el de cenizas fué de 4.27%.

### Determinación de Pentosanos

Se utilizó el método del HCl (3.85N) y conversión de pentosas a furfural (según TAPPI T223 OS-71). La lectura se realizó en espectrofotómetro a 630 nm. Los resultados indican un contenido de pentosanos de 20.60%.

El Cuadro 4.2 muestra la composición química promedio del bagacillo.

CUADRO 4.2

COMPOSICION QUIMICA .PROMEDIO  
DEL BAGACILLO

		<u>% BASE SECA</u>
% Humedad de muestra	9.35	
Extractivos		
En Etanol		4.42
En Etanol-Benceno		1.62
En agua caliente		3.91
Celulosa		38.44
Lignina		18.45
Pentosanos		20.60
Cenizas		4.27
Indet. (por diferencia)		8.29
		100.00

### 4.3 PRETRATAMIENTO DEL BAGACILLO

La presencia de la capa de lignina y la celulosa cristalina en los materiales celulósicos, constituyen barreras para el proceso de hidrólisis. Los procesos de pretratamiento tienden hacia la eliminación de estas barreras y, consecuentemente, aumentar los niveles de glucosa en los hidrolizados resultantes.

Existen en general los procesos físicos y químicos o una combinación de ambos para el pretratamiento.

Para propósitos de nuestro estudio, se ensayaron dos métodos de pretratamiento tomando en cuenta los porcentajes de componentes presentes en la muestra : con NaOH y con ácidos diluidos.

En ambos casos las muestras de bagacillo fueron sometidas al agente químico a una determinada concentración, relación sólido/líquido, temperatura y tiempo de ataque. Después del tratamiento las muestras fueron filtradas al vacío, lavadas y neutralizadas. El residuo sólido fue analizado en su pérdida de lignina y holocelulosa (holocelulosa = hemicelulosa + celulosa).

En el Cuadro 4.3 se pueden apreciar los resultados de estas pruebas.

Como se puede observar, el uso de NaOH al 1% a 95° y por 90 minutos resultó ser el tratamiento con mayor pérdida de lignina y una menor pérdida de hemicelulosa. Lo contrario ocurre con los ácidos diluidos, en cuyo caso se puede decir que actúan como agentes pre-hidrolizantes.

CUADRO 4.3

EFFECTO DE DIFERENTES AGENTES QUIMICOS SOBRE LA LIGNINA Y  
LA HOLOCELULOSA DEL BAGACILLO

Agente.	Concentraci3n, %	S3lido L3quido	Temperatura °C	Tiempo, Minutos	Lignina P3rdida %	Lignina Final. %	Holocelulosa P3rdida %
NaOH	1	1:30	95	60	69.24	10.51	14.42
NaOH	1	1:30	95	90	75.31	8.75	17.86
NaOH	1	1:30	95	120	74.08	9.51	21.53
NaOH	1	1:30	120	60	76.82	9.67	33.37
NaOH	5	1:30	Amb.	360	45.52	19.29	28.05
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	1:15	95	50	4.79	31.60	35.75
HCl	5	1:15	95	50	7.26	67.19	43.86

## CAPITULO 5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL I : HIDROLISIS QUIMICA

### 5.1 HIDROLISIS DE HEMICELULOSAS

En esta fase del estudio se determinó los efectos de los ácidos inorgánicos diluïdos sobre la hemicelulosa del bagacillo. Los experimentos fueron planteados teniendo en cuenta :

- a) Agente químico : ácido sulfúrico y ácido clorhídrico al 5% (p/p).
- b) Tiempo de tratamiento.
- c) Presencia o ausencia de extractivos.
- d) Tamaño de partículas.

Como descripción, una cantidad de muestra es secada y sometida a la acción del agente químico a 100°C en baño térmico y durante 50 a 60 minutos. Posteriormente, el sistema es diluído y neutralizado con carbonato de calcio. La fase acuosa es sometida al análisis de azúcares reductores y glucosa. Para ello se usan las técnicas analíticas de Somagyi & Nelson y la de la glucosa-oxidasa respectivamente.

El Cuadro 5.1 muestra los resultados obtenidos en esta fase. Se observa que el tiempo de hidrólisis y el tamaño de partícula son factores importantes para obtener buenos rendimientos.

### CUADRO 5.1

#### RENDIMIENTO DE AZUCARES REDUCTORES DE LA HIDROLISIS DE HEMICELULOSA DE BAGACILLO

	AGENTE*	TIEMPO (Min.)	RENDIMIENTO %
<b>Bagacillo sin extractivos</b>			
Malla 18/35	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50	61.23
Malla 18/35	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	60	71.59
Malla 18/35	HCl	50	79.85
Malla 18/35**	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	60	43.84
<b>Bagacillo con extractivos</b>			
Malla 0.5 mm.	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	60	80.14
Malla 0.5 mm.	HCl	60	88.80
Malla 0.5 mm.**	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	60	40.89

(\*) La concentración del ácido fue de 5% a 100°C con una relación sólido a líquido de 1:15.

(\*\*) Muestras pretratadas con soda (NaOH, 1%).

## 5.2 HIDROLISIS DE CELULOSA

Se pueden definir básicamente dos tipos de hidrólisis de la celulosa con agentes químicos ácidos uno que utiliza ácido concentrado y otro, ácido diluido.

El Proceso MADISON, utiliza ácido sulfúrico diluido.

El Proceso UDIC-RHEINAU emplea ácido clorhídrico concentrado.

El Proceso HOKKAIDO emplea ácido sulfúrico concentrado.

### Proceso UDIC-RHEINAU

Según este método el material lignocelulósico - residuo de la hidrólisis de hemicelulosas - es tratado con HCl 41% en contracorriente y en sistema continuo. En este estudio no se pudo aplicar exactamente el método, teniéndose que realizar algunas modificaciones.

Se empleó HCl 34% a temperatura ambiente durante 3 horas; luego se diluyó a una concentración 10% de ácido y se hirvió a reflujo por 30 minutos. Se evaporó a vacío para separar el HCl. El ácido residual se neutralizó con NaOH.

Los resultados obtenidos fueron de muy bajo rendimiento. Así, para una relación sólido/líquido (S/L) de 1.5, el rendimiento fue de 8.86% y para S/L de 1.15, el rendimiento fue de 15.38%.

### Proceso HOKKAIDO

Se empleó este método con algunas variaciones.

La hidrólisis de la celulosa se realizó en dos etapas :

Hidrólisis Principal.- Impregnando el material ligno-celulósico con  $H_2SO_4$  80%. Se formarán polímeros de glucosa solubles en agua.

**Post-Hidrólisis.-** Se diluye con agua la concentración inicial del ácido hasta 8%. En seguida se le da un tratamiento calórico (100°C) durante 90 minutos.

En los ensayos se buscó determinar el tiempo óptimo en la hidrólisis principal.

Se tuvieron que restringir las muestras a poco peso por carecer de equipos adecuados para la separación de la mezcla ácido-azúcares formados.

El ácido se neutralizó con carbonato de calcio.

En el Cuadro 5.2 se resumen los resultados de este experimento. Los más altos rendimientos se obtuvieron en las muestras sin extractivos (malla 18/35).

El curso de la hidrólisis se presenta, para las diferentes muestras, en los gráficos 5.2 A y 5.2 B. Se puede observar que el tiempo para la hidrólisis principal es de 30 minutos.

CUADRO 5.2

RENDIMIENTO DE HIDROLISIS DE CELULOSA CON UNA VARIACION  
DEL PROCESO HOKKAIDO\*

MUESTRA	TIEMPO (min.)	RENDIMIENTO, %		
		I**	II**	III**
A: Bagacillo sin extractivos; malla 18/35; tratado con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 5%	15	74.47	58.91	86.64
	30	83.69	90.28	92.04
	45	74.58	N.D.	92.28
	60	70.20	N.D.	91.34
B: similar a muestra A; tratado con HCl, 5%	15	76.72	60.23	85.72
	30	82.61	86.19	93.33
	45	75.72	N.D.	92.94
	60	70.48	N.D.	92.19
AM: Bagacillo con extractivos; malla 0.5 mm., tratado con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 5%.	10	54.40	67.09	---
	20	58.85	72.58	---
	30	55.89	68.93	---
	40	55.75	68.76	---
BM: Similar a muestra AM; tratada con HCl, 5%	10	57.88	69.54	---
	20	61.88	73.90	---
	30	57.17	68.68	---
	40	58.06	69.75	---

(\*\*) I: Expresado en gr. azúcares reductores/100 de holocelulosa  
 II : Expresado en gr. glucosa/100 de celulosa  
 III : Expresado en gr. celulosa/hidrolizada/100 de celulosa de la muestra.

(\* ) Muestra lignocelulósica + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Conc.(80%) (20-23°C) + dilución del ácido a 8% (100°C x 90 minutos).

GRAFICO 5.2 A

RENDIMIENTO DE HIDROLISIS - MUESTRA A (BAGACILLO LIBRE DE EXTRACTIVOS, TRATADO CON H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5%)

TEMPERATURA: 20-23°C, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 80%

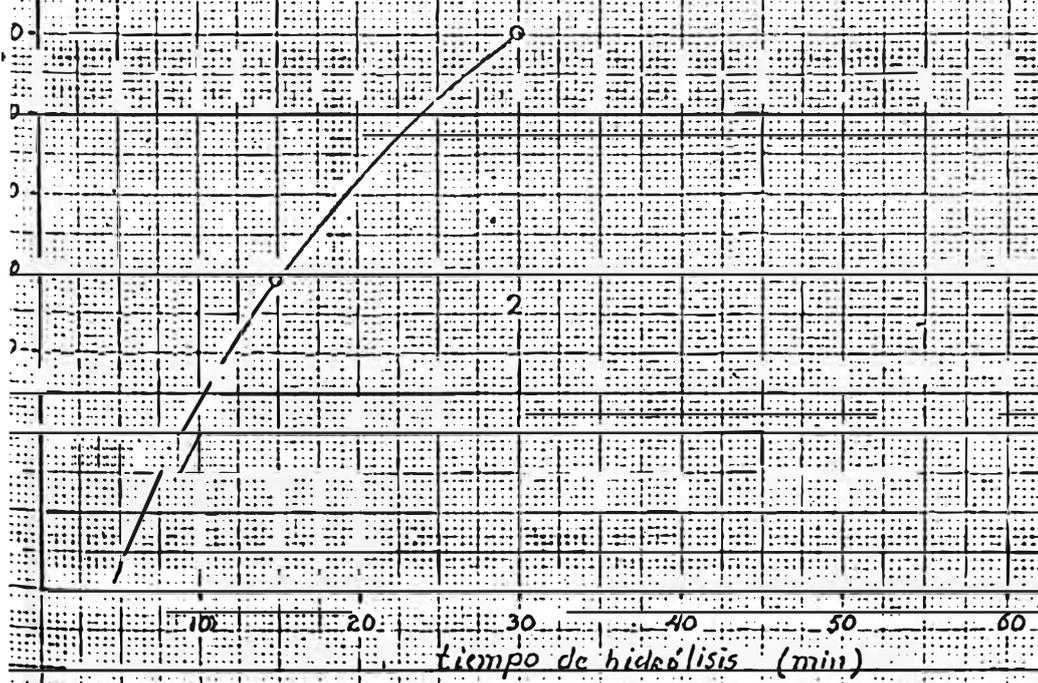
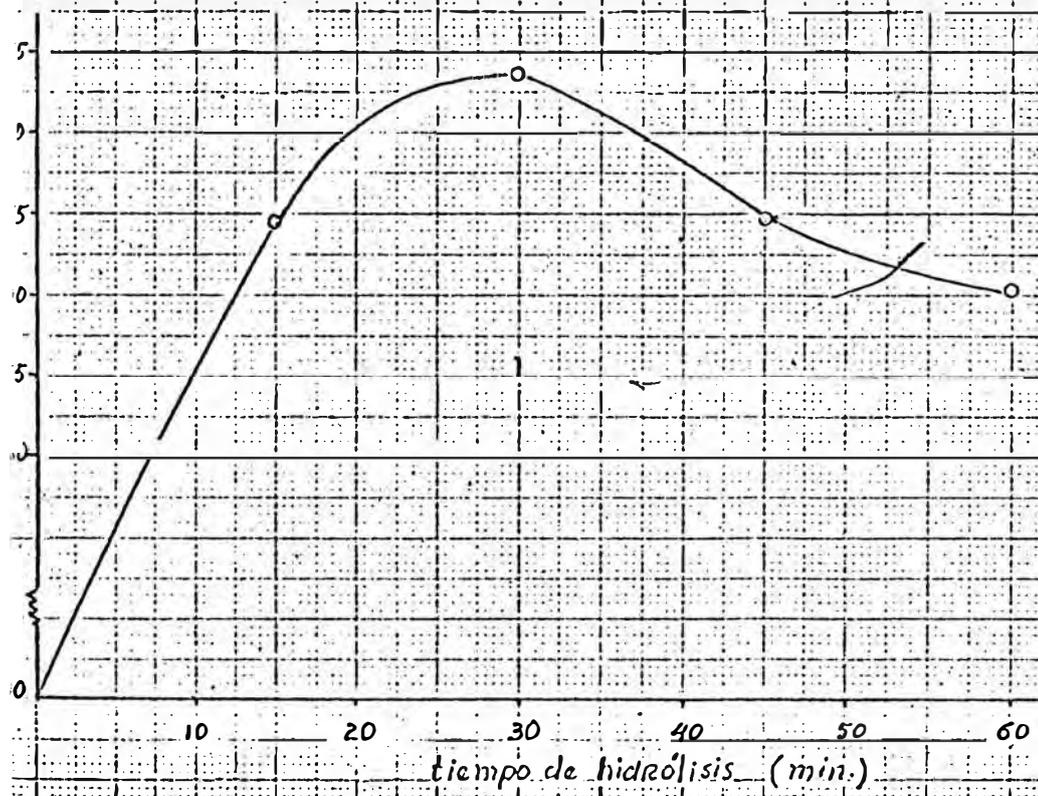


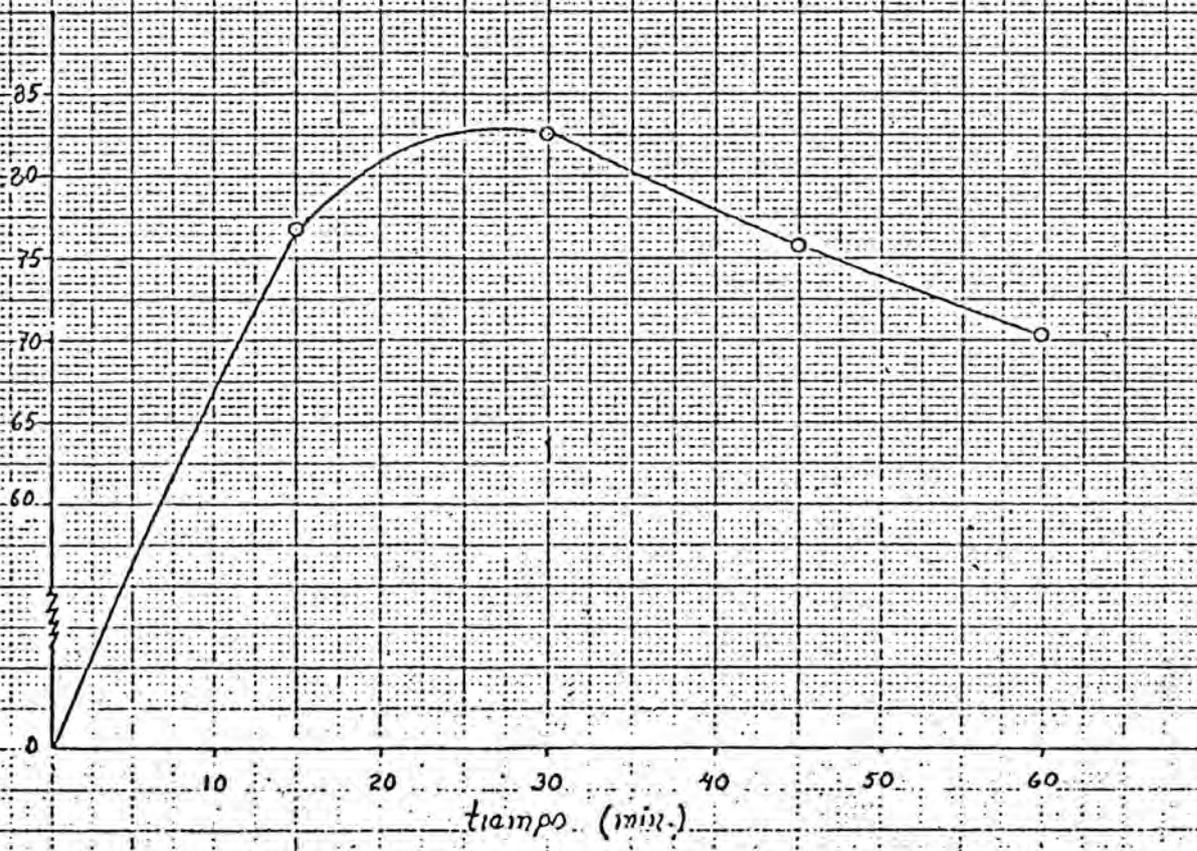
GRÁFICO 5.2.B

RENDIMIENTO DE HIDROLISIS MUESTRA B (BAGACILLO LIBRE DE  
EXTRACTIVOS, TRATADO CON HCl 5%)

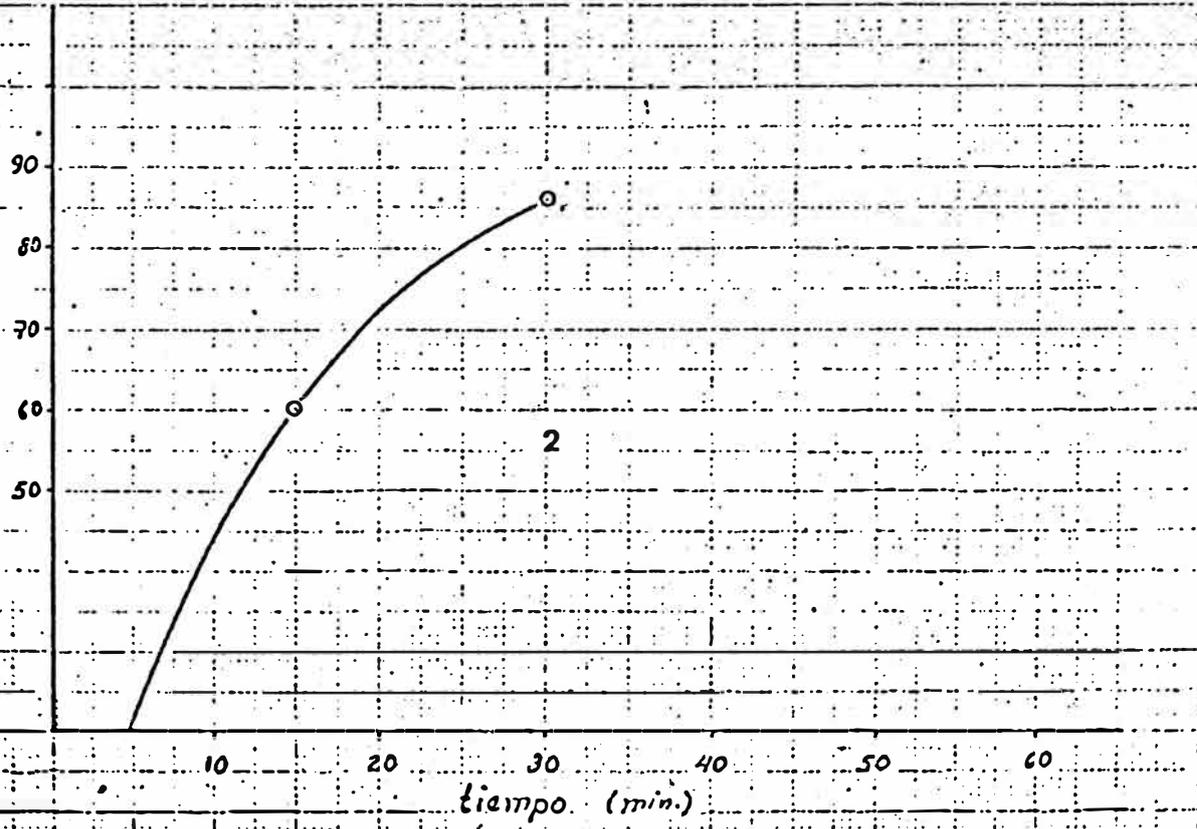
TEMPERATURA: 20-23°C, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 80%

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA  
UNIDAD DE PROCESOS INDUSTRIALES  
FACULTAD DE INGENIERÍA

% Rendimiento (Azúcares Reduct./100. Halacl.)



% Rendimiento (Glucosa/100 Celulosa)



## CAPITULO 6 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL II : HIDROLISIS ENZIMATICA

### 6.1 ENZIMAS UTILIZADAS : ORIGEN Y DEFINICION

#### Origen

Cuatro son las fuentes principales de las enzimas de acción - celulólitica (degradación de la celulosa) hongos, bacterias, organismos marinos y mamíferos rumiantes.

Numerosos hongos degradan derivados solubles de la celulosa, pero comparativamente pocos de ellos pueden producir altos niveles de enzimas extracelulares capaces de degradar extensivamente la celulosa a azúcares. Estos hongos incluyen al género Trichoderma reesei.

Las especies utilizadas en este estudio fueron hongos del género Trichoderma reesei. Se probaron dos cepas :

T. reesei ATCC 26921 adquirida de la American Type Culture Collection.

T. reesei RUT-NG14 suministrada por la Rutgers University. Esta cepa es un mutante que tiene un origen común con la ATCC 26921.

Las cepas fueron revitalizadas en diferentes medios de cultivo y luego transferidas a tubos conjuntamente con el medio (replique). T. reesei presentó crecimiento a los cuatro días, lo cual está dentro de lo normal para este hongo.

#### Definición de las Enzimas del Complejo Celulasa

La composición del complejo celulasa (complejo enzimático) en términos de su contenido relativo de componentes celulóliticos varía grandemente de una fuente biológica a otra.

Las cepas de Trichoderma reesei producen enzimas del com-

plejo celulasa los cuales son inducibles; es decir, su síntesis está condicionada a la presencia de un inductor en el medio de cultivo.

El complejo está constituido fundamentalmente por tres enzimas, nombradas según prioridad en la acción celulolítica

a) Endoglucanasa = Carboximetil celulasa =  $C_x$

b) Celobiohidrolasa =  $C_1$

c) Celobiasa

Una unidad de enzima es definida como la cantidad de enzima que libera un micromol de glucosa por minuto (generalmente por ml.) en las condiciones de prueba (pH 4.8; 50°C).

La actividad específica de la enzima es el número de unidades por miligramo de proteína.

## 6.2 MEDIOS DE INDUCCION Y ACTIVIDAD ENZIMATICA

### Medios de Inducción

Como se menciona en la Sección 6.1, las celulasas son enzimas extracelulares inducibles. Generalmente el inductor es el substrato sobre el cual actúan (celulosa), también sub-productos de hidrólisis (celobiosa) o sustancias que presenten algún radical o enlace en común con el substrato (v.gr. lactosa).

Se han probado varios medios de inducción, los cuales responden a variaciones de reportes bibliográficos. En el Cuadro 6.2 A se muestra la composición de los medios empleados para probar T. reesei ATCC 26921 en su capacidad de producir celulasas.

### Selección de los Mejores Medios de Inducción

Después de pruebas preliminares, se ensayaron medios con inductores simples y mezcla de los mismos para determinar la actividad enzimática. La mezcla de inductores resultó más apropiada.

Los medios se dispusieron en frascos de 250 ml. y se esterilizan a 125°C por 15 minutos. La inoculación se realiza con suspensiones de esporas.

La composición general de los mejores medios de inducción se muestra en el Cuadro 6.2 B.

### Inoculación de los Medios

Se utilizó la técnica de hacer crecer T. reesei en 10 ml. de PDA (Agar Papa Dextrosa DIFCO) contenido en un erlenmeyer de 250 ml. durante siete días a 28°C. Luego del período

do de incubación se le agrega al frasco 10 ml. de agua destilada estéril y se agita suavemente. Se recoge la suspensión de esporas en un tubo de prueba estéril. Después de homogeneizar se toma 1 ml. por cada frasco de inducción.

#### Actividad Enzimática y Comparación Entre las dos Cepas Probadas (ATCC 26921 y RUT-NG14)

Como se mencionó antes, la mezcla de inductores dió los mejores resultados. La cepa RUT-NG14 presentó siempre los mejores niveles enzimáticos poniendo de manifiesto sus altas cualidades de acción celulolítica producto de la selección genética.

En el Cuadro 6.2 C se presentan los resultados de estos experimentos. La cepa RUT-NG14 produjo altos niveles de todas las enzimas cuando se utilizó como inductor una mezcla de salicilina y celobiosa (MEDIO ESC.)

En los últimos 20 años, el microorganismo *T. reesei* ha sido reconocido como la mejor fuente de "celulasa integral", esto es, celulasa que contiene todos los componentes necesarios para la hidrólisis de celulosa cristalina. Debido a esto, se decidió su utilización en este estudio.

CUADRO 6.2-A

Composición de los diferentes medios de inducción para *T. reesei*\*

Componente (mg)	MI	MI-M	MI-L	MI-C	MA	TC	GC	TC2	BAL	BA2	PF	AA	BP	BS	L
Papel de Filtro (Whatman No. 1)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	500	--	--	--	--
Avicel	--	500	--	--	500	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Algodón Absorbente	--	--	--	--	--	--	--	--	500	1000	--	500	--	--	--
Bagacillo bruto	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Bagacillo sin extract.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	500	--
Bagacillo pretratado NaOH	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	500	--	--
C/MC	500	--	--	--	--	--	500	--	--	--	--	--	--	--	--
Celcbiosa	--	--	--	500	--	500	--	1000	--	--	--	--	--	--	--
Lactosa	--	--	500	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	500
CaCl <sub>2</sub>	--	--	--	--	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	--	--	--	--	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	--	--	--	--	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
KCl	80	80	80	80	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
KNO <sub>3</sub>	275	275	275	275	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50	50	50	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	20	20	20	20	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10	10	10	10	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	20	20	20	20	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
Peptona	--	--	--	--	--	--	100	--	--	--	--	--	--	--	--
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	--	--	--	--	120	120	--	120	120	120	120	120	120	120	120
Agua desionizada (ml)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

\* El pH es ajustado 5.5 antes de esterilización a 15 p s i x 15 min. Los medios son envasados en Erlenmeyer de 250 ml.

## CUADRO 6.2 B

### COMPOSICION GENERAL DE LOS MEJORES MEDIOS DE INDUCCION

Peptona	0.05 gr.
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.05 gr.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.10 gr.
Tween 80	0.10 ml.
Solución ME*	1.00 ml.
Agua deionizada	49.00 ml.

\* La solución mineral (ME) tuvo la siguiente composición:

	mg/ 100 ml.
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	25.0
CaCl <sub>2</sub>	10.0
Zn Cl <sub>2</sub>	8.5
Mn SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	7.0

#### INDUCTORES ENSAYADOS:

	CANTIDAD DE INDUCTORES, GR.			
	CMC	Salicilina	Inulina	Celobiosa
EGS	0.25	0.25	--	--
EIS	--	0.25	0.25	--
ESC	--	0.25	--	0.25
ES2	--	1.00	--	--

### CUADRO 6.2 C

ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DEL COMPLEJO CELULASA DE DOS  
CEPAS DE T. REESEI FRENTE A MEZCLAS DE INDUCTORES

CEPA/MEDIO	C <sub>1</sub> u/ml/min	C <sub>x</sub> u/ml/min	B-Glucosidasa u/ml/min	PF Celulasa u/ml/min
<b>ATCC 26921</b>				
EGS	0.029	0.015	0.014	0.030
EIS	0.058	0.033	0.032	0.034
ESC	0.098	0.094	0.091	0.038
ES2	0.014	0.002	0.003	0.013
<b>RUT-NG14</b>				
EGS	0.074	0.021	0.022	0.058
EIS	0.100	0.045	0.046	0.101
ESC	0.101	0.131	0.138	0.101
ES2	0.023	0.011	0.011	0.024

### 6.3 SACARIFICACION (HIDROLISIS) ENZIMATICA DEL BAGACILLO

Los filtrados enzimáticos obtenidos en los experimentos anteriores fueron utilizados para determinar el grado de sacarificación de bagacillo sometido a pretratamiento con ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o sosa cáustica.

Se probaron dos formas de hidrólisis :

#### Sacarificación en Reacción Estática

Los mejores resultados para sacarificación en reacción estática se presentan en los Cuadros 6.3 A, 6.3 B y 6.3 C.

Se puede observar que los más altos rendimientos se obtienen con filtrados de RUT-NG14 procedente del medio de inducción ESC. El mejor tiempo fue de 6 horas y la mejor concentración de sustrato fue de 5 mg. El más alto rendimiento obtenido fue de 85.21%.

#### Sacarificación en Reacción con Agitación

Aunque los resultados obtenidos en reacción estática son altos, es indudable que se obtiene mejores y/o mas reales rendimientos si se procura mantener un mayor contacto entre las enzimas y las partículas.

También se han comparado los rendimientos de sacarificación del bagacillo empleando, además de agitación, un agente - surfactante que aumente el contacto (Tween 80). Por no disponer de un baño térmico con agitación continua sólo se consiguió mantener la reacción en régimen discontinuo de agitación (8 horas/día) a unos 140 movimientos por minuto.

En los experimentos de reacción con agitación y adición Tween

80, se tuvo el inconveniente de la escasez de filtrados enzimáticos por lo que se optó utilizar mezcla de ellos.

En los Cuadros 6.3 D y 6.3 E se presentan los resultados obtenidos para la sacarificación con agitación del bagacillo pretratado con soda. Se puede observar que la adición de Tween 80 al 0.1% aumenta sensiblemente el rendimiento.

El curso de sacarificación puede observarse en los Gráficos 6.3 A y 6.3 B. Se puede notar que los filtrados provenientes de la Cepa RUT-NG14 son mas resistentes a tiempos prolongados. Esto en proyección significaría que pueden ser reutilizados.

CUADRO 6.3 A

SACARIFICACION DE BAGACILLO PRETRATADO CON H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>\* UTILIZAN-  
DO FILTRADOS DE T.REESEI INDUCIDOS CON SALICINA-CELOBIOSA

(FILTRADO ESC.)

<i>Cepa</i>	<i>Sustrato</i> <i>mg</i>	<i>Tiempo</i> <i>h</i>	<i>Azúcares reductores</i> <i>(como glucosa)</i> <i>mg/mg bagacillo</i>	<i>Y<sub>holocelulosa</sub></i> <i>%</i>	<i>Y<sub>α-celulosa</sub></i> <i>%</i>	
<i>Cepa</i>	<i>5</i>	<i>1</i>	<i>0.14</i>	<i>20.15</i>	<i>24.85</i>	
		<i>6</i>	<i>0.27</i>	<i>38.86</i>	<i>47.93</i>	
		<i>24</i>	<i>0.33</i>	<i>47.50</i>	<i>58.58</i>	
	<i>ATCC</i>	<i>25</i>	<i>1</i>	<i>0.02</i>	<i>2.88</i>	<i>3.55</i>
			<i>6</i>	<i>0.06</i>	<i>8.64</i>	<i>10.65</i>
			<i>24</i>	<i>0.06</i>	<i>8.64</i>	<i>10.65</i>
	<i>50</i>	<i>50</i>	<i>1</i>	<i>0.02</i>	<i>2.88</i>	<i>3.55</i>
			<i>6</i>	<i>0.05</i>	<i>7.20</i>	<i>8.88</i>
			<i>24</i>	<i>0.05</i>	<i>7.20</i>	<i>8.88</i>
<i>Rut-NG14</i>	<i>5</i>	<i>1</i>	<i>0.20</i>	<i>28.79</i>	<i>35.51</i>	
		<i>6</i>	<i>0.43</i>	<i>61.89</i>	<i>76.34</i>	
		<i>24</i>	<i>0.48</i>	<i>69.10</i>	<i>85.21</i>	
	<i>25</i>	<i>25</i>	<i>1</i>	<i>0.04</i>	<i>5.76</i>	<i>7.10</i>
			<i>6</i>	<i>0.09</i>	<i>12.95</i>	<i>15.98</i>
			<i>24</i>	<i>0.09</i>	<i>12.95</i>	<i>15.98</i>
	<i>50</i>	<i>50</i>	<i>1</i>	<i>0.02</i>	<i>2.88</i>	<i>3.55</i>
			<i>6</i>	<i>0.04</i>	<i>5.76</i>	<i>7.10</i>
			<i>24</i>	<i>0.05</i>	<i>7.20</i>	<i>8.88</i>

*5%, 1:15, 1:16*

CUADRO 6.3 B

SACARIFICACION DE BAGACILLO PRETRATADO CON ACIDO CLOR-  
HIDRICO\* UTILIZANDO FILTRADOS DE T. REESEI INDUCIDOS CON  
SALICINA-CELOBIOSA (FILTRADOS ESC.)

Cepa	Sustrato mg	Tiempo h	Azúcares reductores (como glucosa) mg/mg bagacillo	Yholocelulosa %	Yα-celulosa %
	5	1	0.14	20.84	25.03
		6	0.26	38.70	46.49
		24	0.33	49.12	59.00
ATCC	25	1	0.02	2.98	3.58
		6	0.06	8.93	10.73
		24	0.09	13.40	16.09
	50	1	0.02	2.98	3.58
		6	0.04	5.95	7.15
		24	0.05	7.44	8.94
	5	1	0.17	25.30	30.40
		6	0.44	65.49	78.67
		24	0.43	64.00	76.88
Ref-NG14	25	1	0.04	5.95	7.15
		6	0.09	13.40	16.09
		24	0.09	13.40	16.09
	50	1	0.02	2.98	3.58
		6	0.04	5.95	7.15
		24	0.04	5.95	7.15

\* 5%, 1:15 ; 1/2

CUADRO 6.3 C

SACARIFICACION DE BAGACILLO PRETRATADO CON SODA\* UTILIZANDO FILTRADOS DE T. REESEI INDUCIDOS CON SALICINA CELOBIOSA (FILTRADOS ESC.)

Cepa	Sustrato mg	Tiempo h	Azúcares reductivos (como glucosa) mg/mg bagacillo	Y-holocelulosa %	Y-a-celulosa %
ATCC	5	1	0.12	12.96	18.89
		6	0.29	31.31	45.64
		24	0.27	29.16	42.49
	25	1	0.04	4.32	6.30
		6	0.06	6.48	9.44
		24	0.06	6.48	9.44
	50	1	0.02	2.16	3.15
		6	0.04	4.32	6.30
		24	0.02	2.16	3.15
Ret-NG14	5	1	0.22	23.76	34.62
		6	0.47	50.75	73.97
		24	0.45	48.59	70.82
	25	1	0.04	4.32	6.30
		6	0.09	9.72	14.16
		24	0.09	9.72	14.16
	50	1	0.02	2.16	3.15
		6	0.04	4.32	6.30
		24	0.05	5.40	7.87

\* 1%, 1:15, 1h

CUADRO 6.3 D

SACARIFICACION DE BAGACILLO PRETRATADO CON SODA\* CON  
MEZCLAS DE FILTRADOS DE T. REESEI Y TWEEN 80 (0.1%) EN AGI-  
TACION A 50°C

Cepa	Tiempo h	Azúcares reductores (como glucosa) mg/mg bagacillo	Y <sub>holocelulosa</sub> %	Y <sub>α-celulosa</sub> %
ATCC**	1	.400	43.19	62.90
	4	.389	42.00	61.17
	24	.465	50.21	73.13
	28	.452	48.81	71.08
	30	.559	60.36	87.91
	96	.161	17.39	25.32
Rut-NG14***	1	.486	52.48	76.43
	4	.545	55.61	80.36
	24	.593	64.03	93.25
	28	.652	70.40	~100.00
	30	.679	73.32	~100.00
	96	.790	85.30	> 100.00

1% ; 1:15 ; 1.5h

\*\* ES 5ml, ESC 5ml

\*\*\* EI 1.5ml, ES 4.0 ml, ESC 4.5 ml

Sistema : 10ml E + 10 ml buffer pH 4.8 + 0.02 ml Tween 80 + 50mg bag.

CUADRO 6.3 E

SACARIFICACION DE BAGACILLO PRETRATADO CON SODA\* CON

MEZCLAS DE FILTRADOS DE T. REESEI EN AGITACION A 50°C (± 2C)

Cepe	Tiempo h	Azúcares reductores (como glucosa) mg/mg bagacillo	Yholocelulosa %	Yd-celulosa %
ATCC ***	1	.378	40.81	59.44
	4	.422	54.96	66.36
	24	.432	46.65	67.94
	28	.465	50.21	73.13
	30	.493	53.23	77.53
	96	.153	16.52	24.06
Rot-NG14 ***	1	.452	48.81	71.08
	4	.417	45.03	65.58
	24	.432	46.65	67.94
	28	.515	55.61	80.99
	30	.568	61.33	89.32
	96	.661	71.38	> 100.00

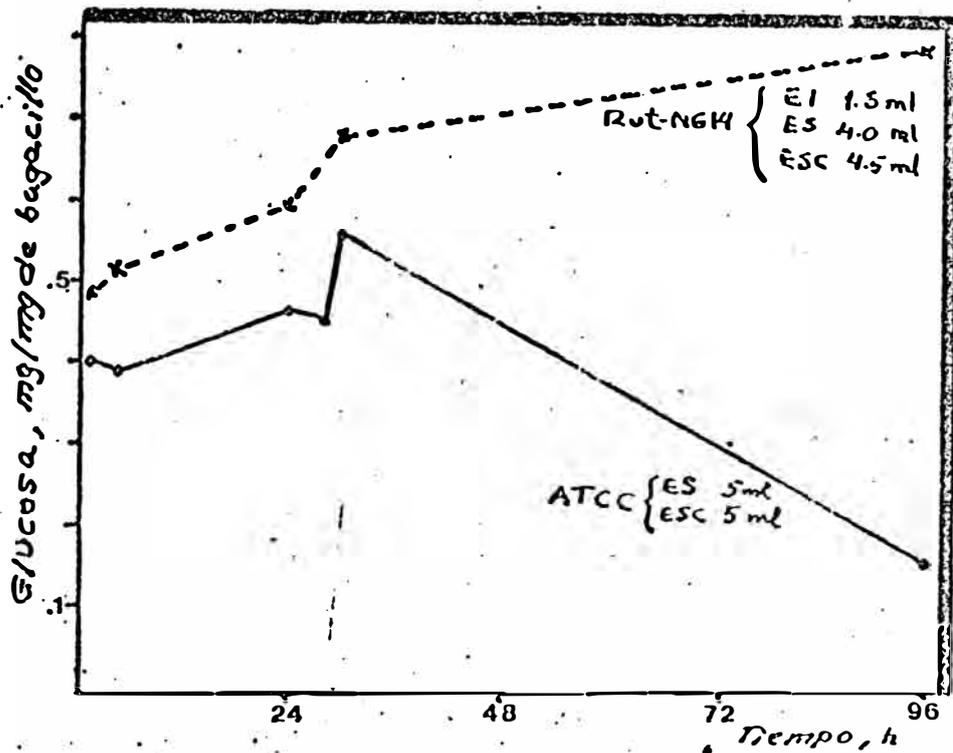
\* 1%, 1:15; 1.5 h

\*\* ES 4.5 ml, ESC 5.5 ml

\*\*\* EI 1.5 ml, ES 4.0 ml, ESC 4.5 ml

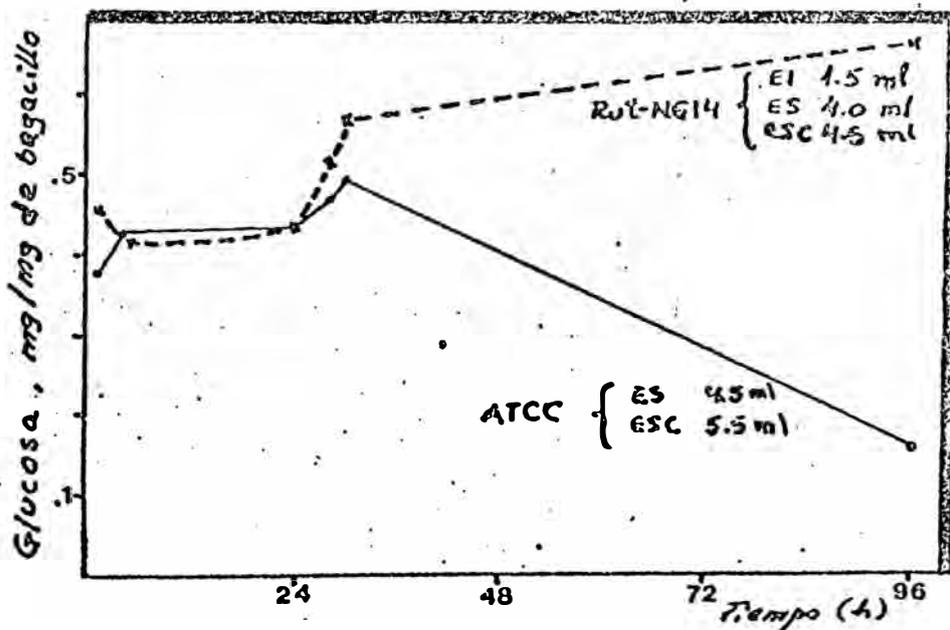
Sistema: 10ml E + 10 ml buffer pH 4.8 + 50 mg bag.

GRAFICO 6.3 A



Sacarificación de bagacillo pretratado con soda (1%, 1:15, 1.5 h) con filtros de T. reesei (10ml E + 10ml buffer pH 4.8 + 50mg bagac. + 0.02 ml Tween 80) a 50°C en agitación parcial (8 h/d).

GRAFICO 6.3 B



Sacarificación de bagacillo pretratado con soda (1%, 1:15, 1.5 h) con filtros de T. reesei (10ml E + 10ml buffer pH 4.8 + 50 mg bagac.) a 50°C en agitación parcial (8 h/d).

## CAPITULO 7 PROYECCION DEL ESTUDIO A ESCALA PRE - PILOTO

### 7.1 ESCALAMIENTO

Por su carácter experimental a pequeña escala (Laboratorio) este proyecto analizó condiciones de operación y determinó parámetros de proceso en relación con su ámbito reducido.

Como consta en las tablas y gráficos experimentales mostrados en las secciones pertinentes de este estudio, los volúmenes de operación han estado en el orden de los micro y mililitros.

Los resultados de esta etapa requieren ser evaluados y depurados en una fase subsiguiente o ETAPA PRE-PILOTO, que retomé la investigación iniciada vía este programa y amplíe el horizonte del proyecto.

El escalamiento a PRE-PILOTO supondría el manejo de volúmenes mayores a la fase de Laboratorio en una magnitud diez veces mayor. Esto quiere decir que, de un volumen promedio de 500 ml. de sustrato (solución de azúcares fermentables) producidos en la fase de Laboratorio, se estaría escalando a cantidades volumétricas de cinco litros como mínimo.

La etapa PRE-PILOTO involucraría actividades de investigación para obtener, con mayor precisión, parámetros de proceso que sirvan de base para el escalamiento a nivel de Planta Piloto. Como se muestra en el Cuadro 7.1 esta etapa cubre en términos genéricos, aspectos de investigación bien definidos.

CUÁDR O 7.1

CRONOGRAMA DE ACCIONES

PROYECTO : "INVESTIGACION TECNOLOGICA PARA LA CONVERSION DEL BAGACILLO EN SUSTRATO FERMENTABLE"

FASE : PRE-PILOTO

ETAPAS	MESES										
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	
1.- OPTIMIZACION DE PARAMETROS DE PROCESO A NIVEL DE LABORATORIO	[Barra horizontal]										
2.- EVALUACION DE RECURSOS CELULOSICOS DISPONIBLES DISTINTOS AL BAGAZO	[Barra horizontal]										
3.- EST. Y EMPLEO DE MICROORGANISMOS DE ACCION CELULOLITICA GENETICAMENTE MEJORADOS	[Barra horizontal]										
4.- ELECCION DEL PROCESO DE HIDROLISIS : QUIM. O ENZIMATICA O COMBINACION	[Barra horizontal]										
5.- DISEÑO DE LAS VARIABLES DE OPERACION EN LA OBTENCION DE DERIVADOS LIGNO-CELULOSICOS	[Barra horizontal]										
6.- ESTUDIOS DE ESCALAMIENTO A NIVEL DE PLANTA PILOTO	[Barra horizontal]										
7.- REVISION BIBLIOGRAFICA, ANALISIS QUIMICOS Y BIOQUIMICOS	[Barra horizontal]										

## 7.2 PROGRAMA DE ACTIVIDADES

Esta Sección del estudio pretende dar los lineamientos preliminares para la elaboración de un programa técnico-económico en relación con la conversión de materiales celulósicos en substratos fermentables proyectado a escala PRE-PILOTO.

En forma similar a la Sección 3.1 de este estudio, esta nueva etapa requiere definir :

### Entidad Proponente/Ejecutora del Estudio

Empresa, Institución o Ente económico interesado en desarrollo biotecnológico para aplicación académica o comercial.

### Personal

El Equipo de Trabajo estaría conformado por tres personas con funciones propias e interrelacionadas de acuerdo a sus especialidades. Se propone el siguiente personal

- Investigador I - Ingeniero Químico
- Investigador II - Biólogo o Microbiólogo
- Laboratorista - Analista Químico / Operador.

### Tiempo de Ejecución del Estudio

Se puede estimar un período de 10 meses de actividad efectiva. La coincidencia con el tiempo de ejecución que tuvo la fase de laboratorio se debe más que nada a la naturaleza del estudio. Los ensayos repetitivos, las condiciones de asepsia en la manipulación microbiana, entre otras actividades, insuñen gran cantidad de tiempo.

### 7.3 PRESUPUESTO

El monto presupuestal se puede estimar con bastante aproximación considerando partidas específicas y enmarcando éstas en rubros económicos definidos.

Esta forma de cuantificar los montos de los estudios está normado por ITINTEC y sirve de guía para sustentar la parte económica de la ETAPA PRE-PILOTO.

El Cuadro 7.3 resume la estructura y monto presupuestal.

Como puede apreciarse, el monto total asciende a S/.165'000,000 (Ciento Sesenticinco Millones de Soles).

Los detalles de estructuración y otros aspectos específicos relacionados con la formulación presupuestal, se presentan en el ANEXO III de este mismo trabajo.

C U A D R O 7.3

ESTRUCTURA Y MONTOS DEL PRESUPUESTO PARA LA ETAPA  
PRE-PILOTO DEL PROYECTO

CODIGO	ASIGNACIONES	IMPORTE	
		S/.	U/.
01.00	<u>REMUNERACIONES</u>	55'000	55,000
01.01	Sueldos	20'000	20,000
01.02	Servicio de Contratados	35'000	35,000
<u>02.00</u>	<u>BIENES</u>	<u>18'000</u>	<u>18,000</u>
02.01	Materias Primas	3'500	3,500
02.02	Materiales de Laboratorio	12'000	12,000
02.03	Información Técnica y Bibliografía	2'500	2,500
03.00	SERVICIOS	22'000	<u>22,000</u>
03.01	Montaje y Adecuaciones	3'500	3,500
03.02	Alquiler de Instalaciones	12'000	12,000
03.03	Laboratorio y Talleres de Terceros	3'000	3,000
03.04	Viáticos y Gastos de Viaje	3'500	3,500
04.00	SEGURO Y PREVISION SOCIAL	5'000	5,000
04.01	Aportaciones al Seguro Social	4'000	4,000
04.02	Al Gobierno Central	1'000	1,000
05.00	EQUIPOS E INSTRUMENTOS	<u>20'000</u>	<u>20,000</u>
05.01	Adquisición de Equipos e Instrum.	20'000	20,000
05.02	Deprec. de Equipos e Instrum.	- -	- -
06.00	GASTOS DE ADMINISTRACION	12'000	12,000
06.01	Apoyo Administrativo	10'000	10,000
06.02	Formulación del Proyecto	2'000	2,000
07.00	IMPREVISTOS	33'000	33,000
		<u>=====</u> 165'000	<u>=====</u> 165,000

## CAPITULO 8 RESUMEN DEL ESTUDIO

### 8.1 RESULTADOS

Después de haber desarrollado el estudio a escala de Laboratorio se pueden precisar los siguientes aspectos :

#### Composición

El contenido total de holocelulosa es de 61.25% del peso de bagacillo seco. (40.65% alfa-celulosa y 20.60% pentosanos).

#### Pretratamiento

El hidróxido de sodio es el agente de delignificación más efectivo. 76.82% del contenido de lignina en el bagacillo seco se extrae (elimina) por este método de pre-tratamiento.

#### Hidrólisis Química

En hidrólisis de hemicelulosas el rendimiento efectivo fue de 20% como azúcares  $C_5$  (xilosa) sobre la base de bagacillo seco.

En hidrólisis de celulosa, se obtiene un rendimiento de 31% como azúcares  $C_6$  (glucosa) sobre bagacillo seco. Esta hidrólisis se realiza después de extraer la hemicelulosa.

#### Hidrólisis Enzimática

El hongo T. reesei produce en buena proporción todos los componentes enzimáticos del complejo celulasas. Su acción celulolítica se orienta sólo a la celulosa del bagacillo.

El rendimiento de hidrólisis de la celulosa del bagacillo fué de 31% como azúcares  $C_6$  (glucosa) sobre la base de bagacillo seco.

## 8.2 DISCUSION

Las pruebas experimentales se efectuaron con bagacillo proveniente de las instalaciones de Soc. Paramonga Ltda. S.A., pudiendo hacerse más estudios sobre otras fuentes celulósicas susceptibles de ser hidrolizadas.

- Los resultados obtenidos en los métodos planteados a nivel de laboratorio son susceptibles de ser mejorados. Para ello se requiere de más pruebas exhaustivas a escala de laboratorio y más adelante a escala pre-piloto.
- La delignificación del bagacillo se ha realizado por métodos químicos solamente. El desarrollo de microorganismos capaces de degradar selectivamente a la lignina podría facilitar el proceso enzimático de conversión de celulosa, así como también abrir el camino para el pulpeo por métodos biológicos en la industria del papel.
- La hidrólisis (sacarificación) del material celulósico ensayado en este estudio ya sea por métodos químicos o biológicos siempre produce hidrolizados (substratos azucarados) muy diluidos. Se deja abierta la posibilidad de mejorar la concentración de estos substratos hasta su uso directo para fermentación. Esto puede lograrse variando las condiciones de operación que son críticas como : relación sólido/líquido, cantidad de inóculo, tiempo de tratamiento, presencia de agentes tensoactivos.

### 8.3 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conforme a los resultados obtenidos en la etapa de Laboratorio, la porción celulósica del bagacillo se hidroliza (sacarifica) a azúcares fermentables por dos procedimientos : Químico y Biológico (enzimático).

Ninguno de los dos procedimientos se pueden descartar ya que son necesarios mayores y más profundos estudios sobre sus ventajas e inconvenientes.

Sobre la base de un contenido de 61.25% de porción celulósica (holocelulosa) es posible el aprovechamiento del 51% del peso de bagacillo seco como azúcares fermentables.

Los substratos azucarados, denominados hidrolizados, obtenidos en este estudio son muy diluïdos y requieren ser concentrados a alrededor de 10% (p/v) para que puedan ser fermentados o por levaduras o por bacterias.

En las diferentes etapas que han tenido que cubrirse en el desarrollo de este estudio, se han encontrado valores propios y característicos que pueden considerarse satisfactorios teniendo en cuenta las limitaciones con que se han trabajado. Estos valores encontrados pueden servir de base para futuros estudios en este campo. Por ello, se plantean dos procesos tentativos mostrados en los Gráficos 8.3 A y 8.3 B, los cuales pueden servir de partida para profundizar en su optimización. El Gráfico 8.3 A esté referido al procedimiento químico y el Gráfico 8.3 B al procedimiento biológico.

DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO

"UNA/SPL-1" DE HIDROLISIS QUIMICA DEL BAGACILLO  
(Resultados no publicados)

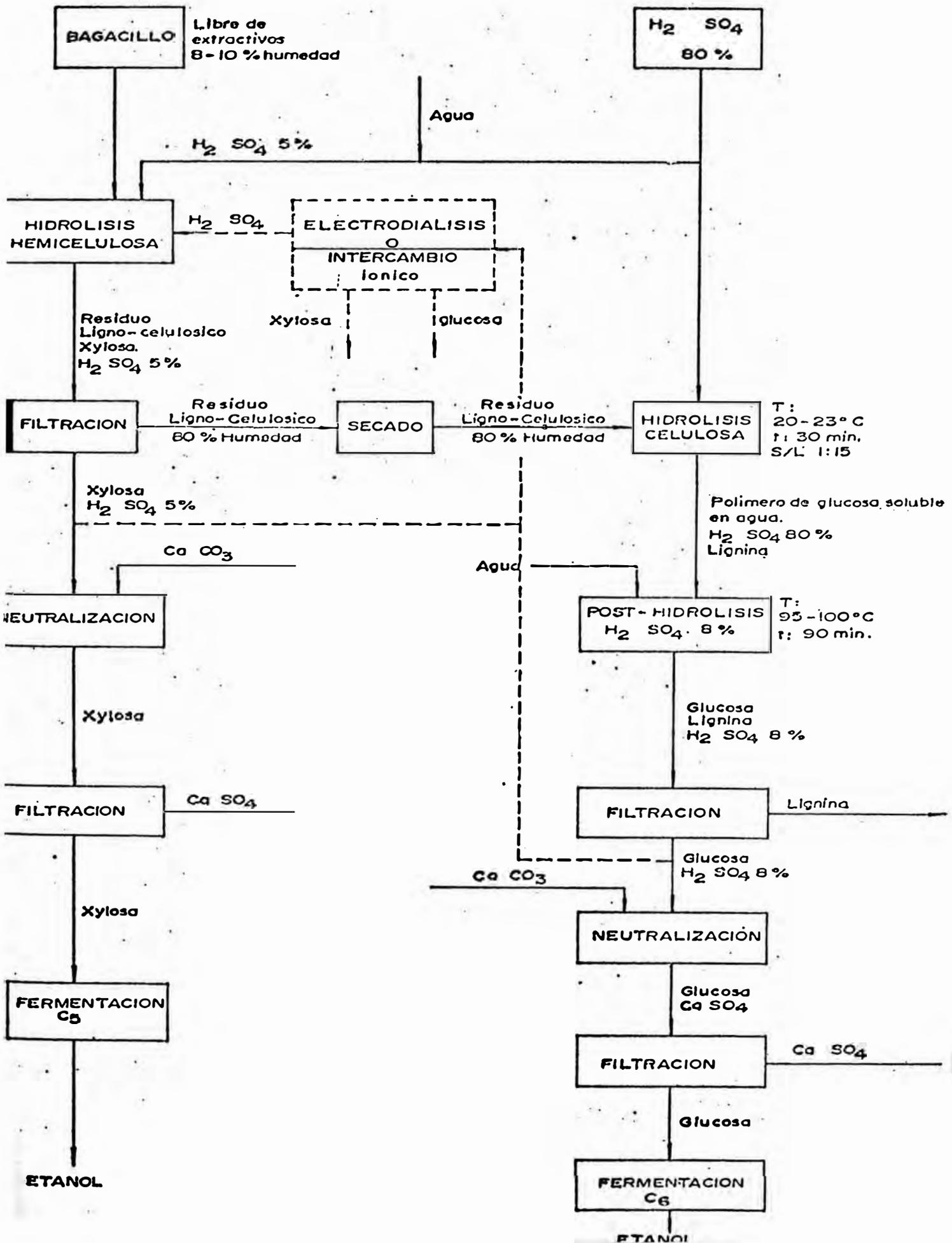


GRAFICO 8.3 B

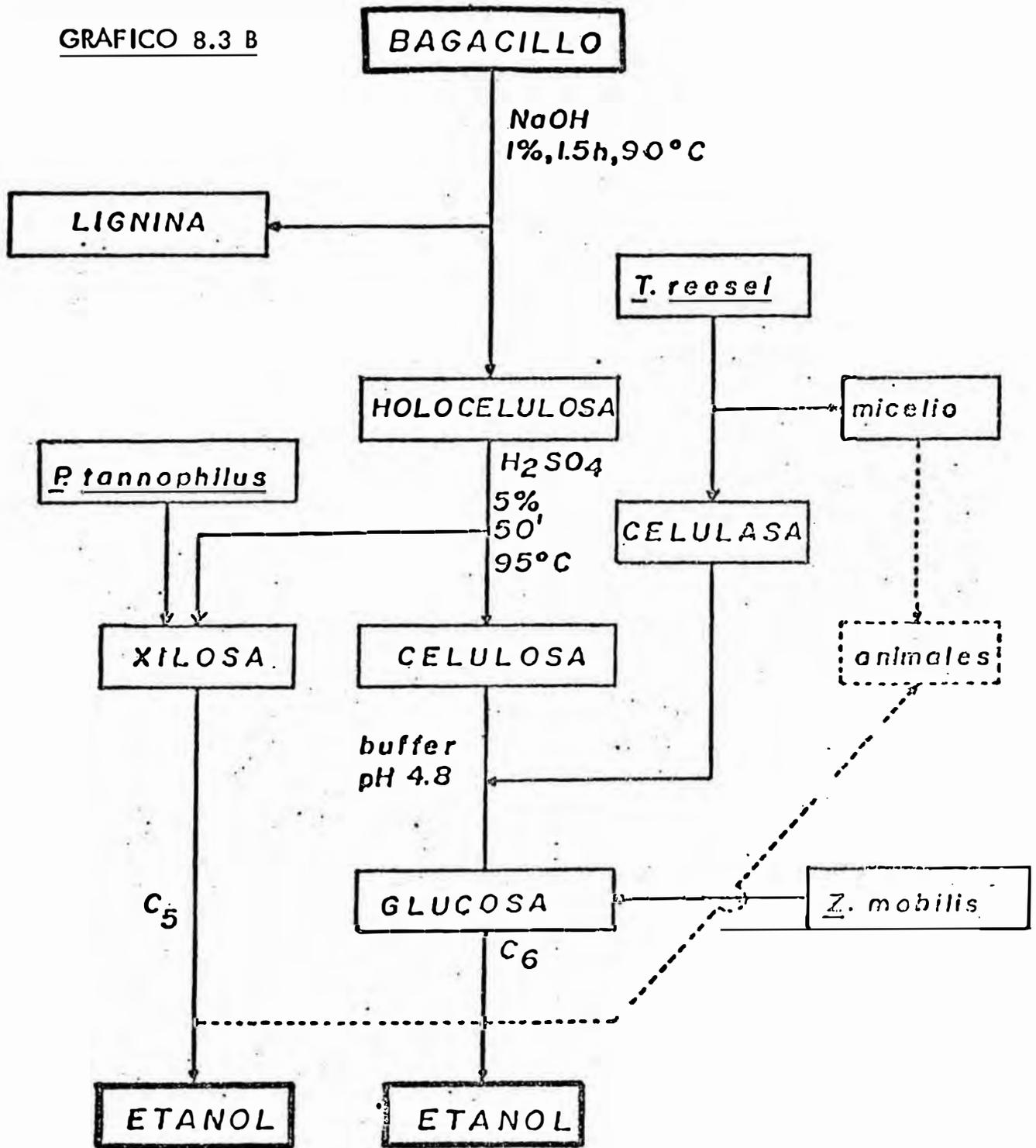
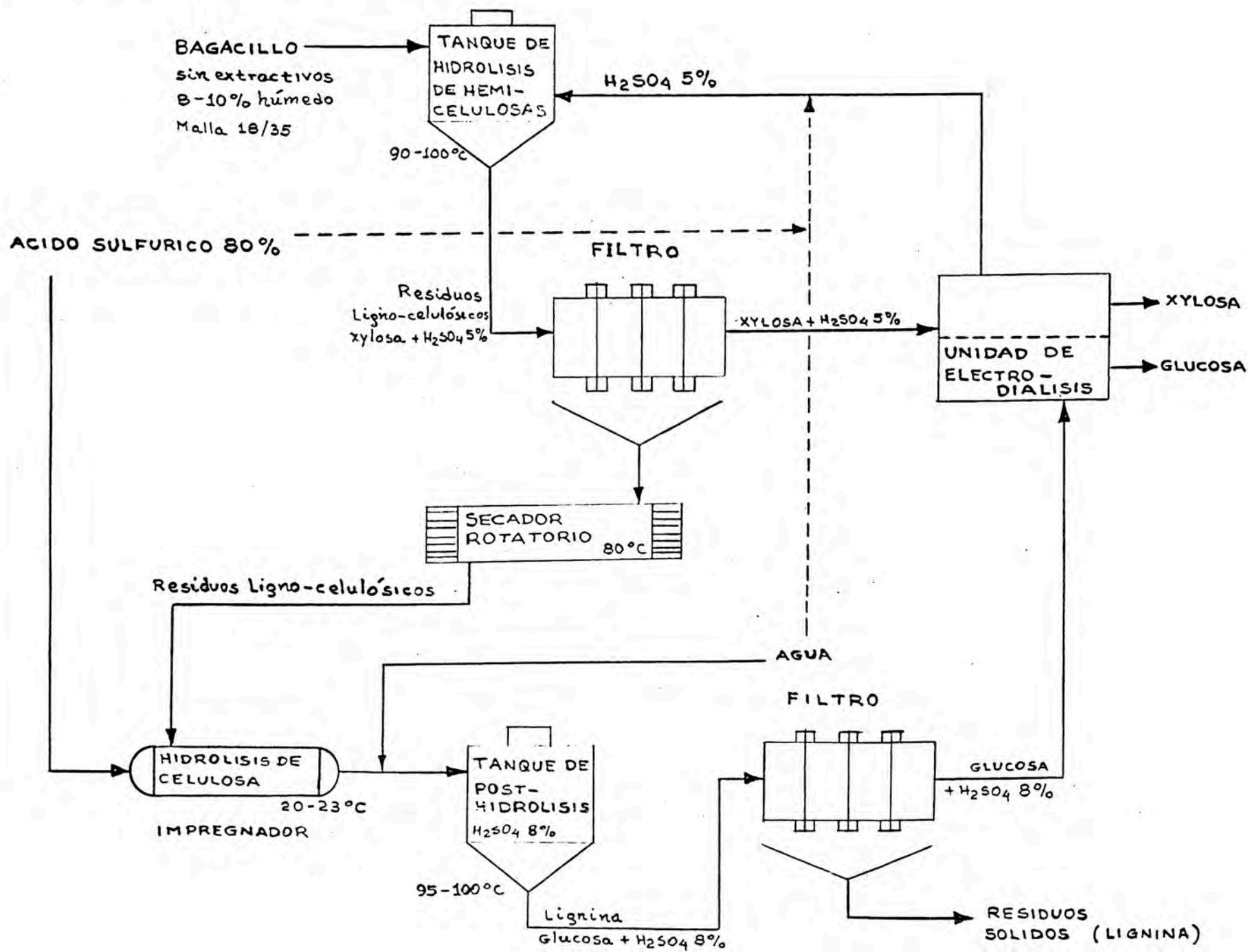


DIAGRAMA SIMPLIFICADO DEL PROCESO "UNA/SPL-2"  
(Resultados no publicados).

# HIDROLISIS ACIDA DE BAGACILLO - DIAGRAMA DE FLUJO PROYECCION A PLANTA PILOTO



## CAPITULO 9 NOMENCLATURA Y REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

### 9.1 NOMENCLATURA

La redacción de este trabajo incluye las aclaraciones a la simbología utilizada. Sin embargo, podemos citar algunas de las más usadas:

#### Siglas Institucionales

SPL	Sociedad Paramonga Ltda. S.A.
UNA	Universidad Nacional Agraria
ITINTEC	Instituto Tecnológico de Investigación y Normas Técnicas
TAPPI	Technical Association of Pulp and Paper Industry

#### Simbología General

A.C.	: Antes de Cristo
ADN	Acido Desoxirribonucleico
BT	: Biotecnología
L	: Líquido
PVC	: Cloruro de polivinilo
S	: Sólido
T. reesei	Trichoderma reesei (hongo celulolítico termofílico)

#### Exponentes

°	: Grados Centígrados
*	: Llamada para notas al pie.

## 9.2 BIBLIOGRAFIA

### Publicaciones Generales (Revistas )

1. International Management, Mayo 1981
2. Chemical Week, September 30, 1981
3. Compressed Air, February 1983
4. Science, Vol 201, August 25, 1978
5. Scientific American, September 1981, Vol. 245 Number 3.
6. Chemical Engineering, October 5, 1981 p.75, 77, 79.  
July 12, 1982 p. 20E y 20G.

### Publicaciones Generales (Manuales y Libros)

1. Manual de Presentación de Proyectos del ITINTEC.
2. Project Evaluation in Chemical Process Industries, J.F. Valle Riestra. Ed McGraw-Hill, 1983.
3. Sucrose Chemicals, V. Kollonitsch-Sugar Research Foundation Inc., 1970.
4. Industrial Microbiology, Prescott & Dunn. Ed. McGraw-Hill.

### Publicaciones Específicas (Por Autores)

1. FAO Technical Panel on Wood Chemistry, Stockholm, 1953/  
Tokio, 1960.
2. Kirk, T.K. and H.M. Chang "Potential Application of  
Biolignolytic Systems", Enzyme Microbial Technology 1981  
Vol. 3, pp 189-196.
3. Klyosov, A.A. "The Biotechnology of the Enzymatic Con-  
version of Cellulose into Glucose : Fundamental and Applied  
Aspects", Proceedings, The First Finnish-Soviet Seminar on  
Bioconversion. Helsinki 1982.
4. Klyosov, A.A. "Enzymatic Conversion of Cellulosic Mate-  
rials to Sugars and Alcohol : The Technology and its Im-  
plications", UNIDO/IS 476, July 12, 1984.

A N E X O S

## ANEXO I

### MATERIA PRIMA BIOMASICA: DEFINICION Y ANALISIS QUIMICO

El material celulósico de interés principal para nuestro proyecto ha sido el bagacillo. Sin embargo, como es ya conocido, la madeta y los residuos celulósicos de cosecha agrícola pueden ser utilizados para hidrólisis.

#### ANALISIS QUIMICO DE LA MATERIA PRIMA

La determinación de la composición química del bagacillo es el primer y fundamental paso para definir el tratamiento posterior a darse a la materia prima.

#### PREPARACION DE LA MUESTRA

El bagacillo muestreado de los desmeduladores en seco en la fábrica de Papel de Paramonga se procedió a secarlo. Para efectuar los análisis químicos, el material se tamiza utilizando para los análisis la fracción que pasa por malla N° 40 y se retenga en malla N° 60, según las normas TAPPI T-11 m.

#### DETERMINACION DE LA HUMEDAD

Se pesan 3 muestras de bagacillo de aproximadamente 1 gr. cada una en recipientes de vidrio adecuados, previamente pesados.

Se seca en estufa a  $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante (aproximadamente 4 horas), se enfría en desecador y se pesa.

## DETERMINACION DE EXTRACTIVOS

### En Alcohol Etílico

Se realiza para extracción de taninos. El equipo consta de una batería de Soxhlets (con balones de 250 cc.), los cuales se disponen en serie sobre una plancha de calentamiento.

Se pesan 3 grs. + 0.1 gr. de muestra en estuches preparados con papel de filtro y se colocan en las unidades de extracción. Alcohol etílico al 95% en volumen es utilizado para la extracción durante 4 horas o hasta que el alcohol en el extractor esté claro.

El alcohol con los extractivos se evapora a sequedad (en vacío) y estos residuos se secan a 105°C, se enfrían y pesan.

### En Mezcla Alcohol/Benceno 1:2 (en Vol.)

Para remoción de ceras, resinas y grasas .

Las muestras que fueron extraídas en alcohol, son sometidas a la acción de la mezcla etanol/benceno durante 6-8 horas manteniendo el líquido a ebullición. Se utiliza un volumen de 250 cc. de mezcla etanol/benceno.

### En Agua Caliente

Esta extracción no se realiza en equipo soxhlet. El equipo consta de 1 balón de 1,000 cc. conectado a un refrigerante a reflujo.

Los estuches de muestra provenientes de la extracción alcohol/benceno se utilizan para esta determinación.

Se pesa la muestra y por cada 1.5 gr. se adiciona 100 cc. de agua destilada. Se somete a ebullición durante 6 horas.

Se evapora a sequedad, llevando luego a la estufa a 105°C  
Enfriar y pesar.

### DETERMINACION DE CELULOSA

Aunque la composición química de los recursos celulósicos es heterogénea, sus constituyentes principales son tres polímeros: Celulosa Hemicelulosa y Lignina.

El análisis químico de cada uno de estos componentes se hace difícil desde que el aislamiento de uno de ellos alterará significativamente la composición química de los otros constituyentes.

De entre los varios métodos para determinar la celulosa, se siguió

el de KURSCHNER y HOFFNER. El método es rápido aunque la celulosa aislada es degradada. Consiste en atacar a la lignina con una mezcla nitroalcohólica. Se forman compuestos nitrofenólicos solubles en agua. El ácido nítrico hidroliza la hemicelulosa y la celulosa es protegida por el alcohol.

Las determinaciones se hacen con muestras de 1 gr. con 0.1 mgr. de precisión. La celulosa se separa por filtrado a vacío, se lava y seca hasta peso constante.

#### DETERMINACION DE LIGNINA

La lignina es un polímero amorfo y heterogéneo que envuelve a los polisacáridos de los materiales celulósicos. Se caracteriza por su elevado número de grupos  $-OCH_3$  y  $-OH$ .

La determinación cuantitativa de la lignina (método KLASON, normas TAPPI, 13 05-54), se hace tratando al material celulósico con ácido sulfúrico concentrado. La fracción de carbohidratos es degradada y el residuo marrón así obtenido es la lignina, mas las denominadas cenizas.

Para determinar las cenizas, se calcinan las muestras en una mufla a  $500 - 600$  °C. Después de enfriar, se pesa y calcula la cantidad de cenizas.

#### DETERMINACION DE PENTOSANOS

Los carbohidratos no celulósicos contenidos en las maderas o resi -

dos celulósicos son conocidos como hemicelulosas. Los constituyentes principales de la hemicelulosa son los pentosanos (xilanos y arabinos) y hexosanos (mananos y galactanos).

Los pentosanos son los mayores constituyentes de las hemicelulosas en el bagacillo. Su determinación corresponde a las normas TAPPI 223-05-71 y se basa en la hidrólisis de estas hemicelulosas con ácido clorhídrico 3.85 N a ebullición para producir furfural. El furfural es destilado y determinado colorimétricamente con el reactivo orcinol (orcina).

En el Laboratory of Renewable Resources Engineering of Purdue University, George T. Tsao y colaboradores encontraron que la xylosa constituye aproximadamente el 80% del total de monosacáridos en el hidrolizado de hemicelulosas del bagazo de caña. Esta es una referencia importante para poder determinar el contenido de hemicelulosas en el bagacillo.

## ANEXO II

### ANALISIS DEL PRODUCTO DE HIDROLISIS

#### Determinación de glucosa

Puesto que la hidrólisis de la celulosa por acción química o enzimática tiene como uno de los productos finales a la glucosa, se buscó una técnica para su determinación específica. Se estableció que el método más adecuado es el de la glucosa oxidasa. La técnica utilizada es la recomendada por los Laboratorios Merck (Merckotest 3393). Una variante tuvo que ser empleada: el aumento de los volúmenes de reacción al doble, debido a que las cubetas del Spetronic necesitan más de 2 ml. de muestra para una lectura correcta.

#### Determinación de azúcares reductores

Se eligió el método de Somozyi modificado por Nelson (Nelson, 1944). Esta técnica fue modificada de tal forma de emplear menores volúmenes de muestra (0.2 ml.) y de reactivos (0.2 ml.). Con esta modificación se pueden determinar azúcares reductores hasta una concentración de 300 ug/ml. Se utiliza como patrón glucosa a diferentes concentraciones de tal forma de obtener una curva estándar.

#### Determinación de proteínas solubles

Debido a que en el trabajo enzimático es necesario referir la concentración

de enzima de un filtrado respecto a la concentración de proteínas en el mismo, se empleó el método de Lowry et al (1951). La concentración de proteínas se refiere a una curva estándar en base a albúmina de sangre (Carlo Erba) . Sin embargo, lo recomendable es comparar con Sero albúmina bovina (Sigma).

## A N E X O III

### DESCRIPCION DEL PRESUPUESTO DEL PROYECTO PARA LA ETAPA PRE-PILOTO

· Siguiendo las pautas dadas en la fase de Laboratorio del Proyecto, las siguientes suposiciones pueden considerarse válidas para estructurar en forma racional el presupuesto para la ETAPA PRE-PILOTO.

Entidad Proponente y Ejecutora : Sociedad Paramonga Ltda. S.A.

Centro de Operaciones : Laboratorio de Micología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (U.N.A.)

Financiamiento : El 2% de la Renta Neta de la Entidad Proponente dedicada por ley a investigación (ITINTEC)

Aspectos Legales : Convenio Entidad Proponente - ITINTEC para aprobación del Proyecto.

Contrato Entidad Proponente / Ejecutora - U.N.A. para locación de servicios.

ASIGNACION 01.00 - REMUNERACIONES S/.  
55'000,000

Comprende las compensaciones que se otorgan por servicios personales prestados en forma directa durante el desarrollo de la investigación, por personal profesional, técnico y obrero.

01.01 Sueldos

Comprende las remuneraciones otorgadas al personal estable de la Entidad Ejecutora por servicios personales prestados en el desarrollo del proyecto.

Un Ingeniero Químico responsable del proyecto, a tiempo parcial :

S/.2'000,000 por mes

En 10 meses del programa 20'000,000

01.02 Servicio de Contratados

Comprende las remuneraciones del personal profesional o técnico contratado a plazo fijo.

Un Biólogo o micro-biólogo; docente universitario con carga de investigación de acuerdo a reglamentos académicos, con 50% de participación en el proyecto S/.2'000,000 por mes

En 10 meses del programa 20'000,000

Un Analista Químico/Operador, en calidad de practicante universitario; egresado de ciencias químicas, a dedicación completa :

S/.1'500,000 por mes.

En 10 meses del programa 15'000,000

ASIGNACION 02.00 BIENES 18'000,000

Comprende los gastos por adquisición de bienes o materiales necesarios para el desarrollo de la investigación.

02.01 Materias Primas

Comprende los gastos por adquisición de materias primas para su

empleo en el proyecto. Incluye fletes y gastos de aduana.  
Adquisición de diferentes tipos de materiales ligno-celulósicos en cantidades suficientes para su procesamiento, ácidos inorgánicos grado Industrial, cepas de microorganismos celulolíticos. 3'500,000

02.02 Materiales de Laboratorio

Comprende los gastos por adquisición de bienes a ser utilizados en trabajos de laboratorio tales como material de vidrio, reactivos y productos similares. Incluye fletes y gastos de aduana.

Adquisición de material de vidrio, reactivos químicos y bio-químicos nacionales e importados. 12'000,000

02.03 Información Técnica y Bibliográfica

Comprende gastos por servicios de información, adquisición de libros, revistas y documentos relacionados con el tema de investigación.

Monto estimado 2'500,000

ASIGNACION 03.00 - SERVICIOS 22'000,000

Comprende los gastos por compensación de servicios no personales que son prestados por personas jurídicas, así como aquellos que son prestados por de terminadas personas naturales sin existir relación laboral directa.

03.01 Montaje y Adecuaciones

Comprende gastos por montaje de equipos y adecuación de instalaciones destinadas al proyecto exclusivamente.

Monto estimado 3'500,000

03.02 Alquiler de Instalaciones \*

Comprende los pagos a terceros por la utilización de instalaciones de Laboratorios y Servicios afines para el desarrollo del proyecto.

Pagos por uso de instalaciones y servicios de laboratorio incluyendo la merced conductiva de equipos e instrumentos por el tiempo que dure el proyecto. 12'000,000

**03.03 Laboratorios y Talleres de Terceros**

Comprende los gastos por la contratación de servicios en talleres y laboratorios de ensayo ajenos a la entidad ejecutora.

Pagos por fabricación de aditamentos y accesorios, ensayos de certificación 3'000,000

**03.04 Viáticos y Gastos de Viaje**

Comprende gastos de pasaje, alojamiento y alimentación; movilidad e instalación del personal comisionado a una localidad dentro del país y fuera de la sede en una función propia del proyecto.

Monto estimado 3'500,000

**ASIGNACION 04.00 - SEGURO Y PREVISION SOCIAL 5'000,000**

Comprende las aportaciones patronales al Seguro Social, Sistema Nacional de Pensiones, SENATI, FONAVI y al Gobierno Central.

**04.01 Aportaciones al Seguro Social**

Comprende el aporte como empleador para la prestación de salud, beneficio de pensiones y maternidad. Incluye seguros contra accidentes. 4'000,000

**04.02 Al Gobierno Central**

Comprende la contribución patronal del impuesto a las remuneraciones. 1'000,000

**ASIGNACION 05.00 - EQUIPOS E INSTRUMENTOS 20'000,000**

Comprende los gastos en equipos e instrumentos a ser utilizados en el proyecto.

**05.01 Adquisición de Equipos e Instrumentos**

Comprende desembolsos por compra de equipos e instrumentos (bienes duraderos) cuyos costos de adquisición superen a dos sueldos mínimos vitales de la Provincia de Lima. Incluye pago de fletes y gastos de aduana.

Compra de equipos e instrumentos no disponibles en el Laboratorio cuya merced conductiva se paga mediante la partida 03.02.

Monto estimado. 20'000,000

**05.02 Depreciación de Equipos e Instrumentos**

Son los cargos para amortizar el valor de los equipos e instrumentos de la entidad ejecutora sujetos a desgaste. No se considera por estar incluido en la partida 03.02.

**ASIGNACION 06.00 - GASTOS DE ADMINISTRACION 12'000,000**

Incluye los gastos por el manejo administrativo del proyecto.

**06.01 Apoyo Administrativo**

Incluye los gastos por coordinación, manejo contable, secretariado, tramitaciones, artículos de escritorio, impresiones y otros similares de apoyo para la ejecución del proyecto.

Es una buena práctica presupuestar un 10% de la suma de las asignaciones 01.00, 02.00, 03.00 y 04.00 10'000,000

**06.02 Formulación del Proyecto**

Comprende los gastos por la elaboración de la propuesta de proyecto de investigación. Deberá indicarse el nombre, especialidad, cargo de la persona; así como el tiempo usado en la formulación

Monto presupuestal de la partida

2'000,000

ASIGNACION 07.00 - IMPREVISTOS

33'000,000

Monto destinado a cubrir gastos no considerados y mayores desembolsos por variación de precios.

Se considera un presupuesto del 20% del presupuesto total.

-----

- \* Por este rubro la U.N.A. cobra el 10% del monto presupuestal sin considerar la partida 01.00 REMUNERACIONES. Este gasto se asigna al denominado FONDO DE INVESTIGACION de la Universidad.

## ANEXO IV

### NORMAS TAPPI PARA ANALISIS QUIMICOS

En este estudio se menciona con regularidad las normas TAPPI para determinación de componentes del bagacillo.

La Technical Association of Pulp and Paper Industry (TAPPI) ha estandarizado los métodos analíticos en la industria celulósica y papelera.

A nivel mundial, la fabricación de papel a partir de bagazo de caña de azúcar representa una pequeña parte en comparación con la producción a partir de madera. En ese sentido no existen normas estándares para análisis químico de bagazo y bagacillo. Lo que se ha hecho es tomar las normas TAPPI para análisis de componentes de la madera y adaptarlas a las condiciones del estudio, pero, sin variar la identificación (código). Es así que cuando se hace referencia a un determinado código en los diferentes análisis químicos reportados en este estudio, estos son tomados textualmente de las normas TAPPI, como es el caso del código TAPPI T-11m, por ejemplo.

Sociedad Paramonga Ltda S.A. (SPL) como empresa involucrada en la industria de pulpa y papel tiene registrado en el ITINTEC, entre otras normas, las correspondientes a análisis químico de bagazo y bagacillo con arreglo (adaptación) a los estándares de TAPPI.

Para propósitos de consulta, SPL dispone de la bibliografía necesaria, en relación a los volúmenes que constituyen las normas TAPPI.

## ANEXO V

### DEFINICION DE TERMINOS QUIMICOS

#### 1. Celulosa

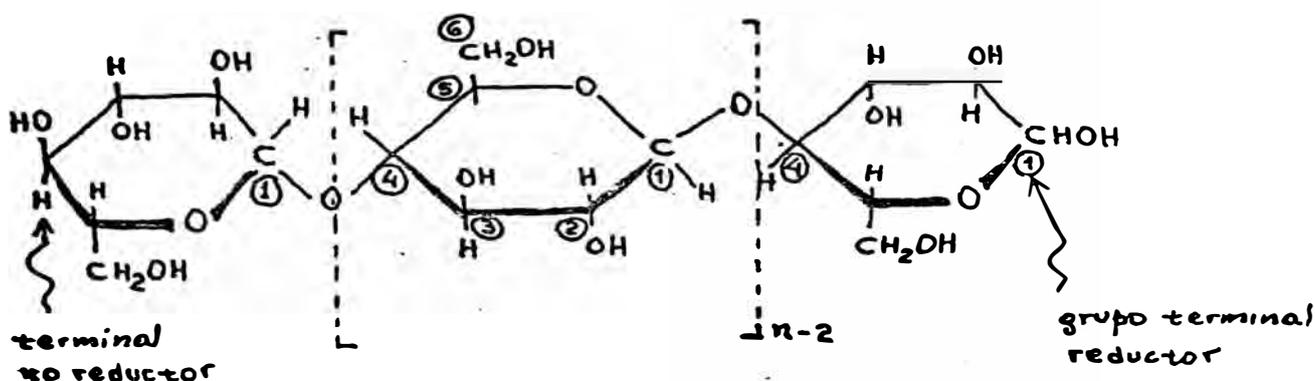
Fórmula Global  $(C_6H_{10}O_5)_n$

Principal constituyente de las plantas desde algas hasta árboles.

El algodón es la forma más pura de celulosa pues su contenido es cerca de 90%. Cada molécula de celulosa es una larga y no ramificada cadena de unidades de D-glucosa, con un peso molecular en el rango de 50,000 a encima de un millón.

Sustancia blanca. Insoluble en agua y otros solventes usuales, pero es disuelta por soluciones concentradas de cloruro de cinc, por hidróxido de cobre amoniacal; también por álcali cáustico con disulfuro de carbono.

La cadena glucosídica de la celulosa se puede representar así:

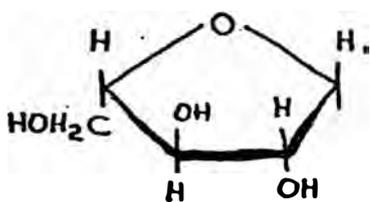


2. Hemicelulosas.- Históricamente, las hemicelulosas fueron definidas como la porción de carbohidratos de la madera que pueden ser más fácilmente hidrolizados por ácidos que la celulosa.

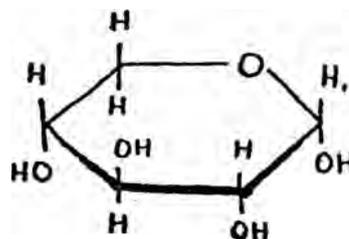
El término hemicelulosa está referido a mezclas de polímeros polisacáridos de bajo peso molecular, los cuales están estrechamente asociados con la celulosa en el tejido de las plantas. Estos polímeros son clasificados como no-celulósicos en naturaleza para diferenciar el sistema del de la celulosa, aunque la distinción no es tan clara como primero se pensó debido a que los polímeros de D-glucosa se encuentran en hemicelulosas como en celulosa.

De manera general, se ha establecido que la celulosa es un polímero cuyas unidades monoméricas no contienen sacáridos distintos de la D-glucosa. En contraste, los polímeros de hemicelulosa son compuestos de condensación de los siguientes principales unidades sacáridas: D-xilosa, D-manosa, D-glucosa, L-arabinosa, D-galactosa, ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico, algunos de los cuales se representan aquí:

Azúcares de cinco carbonos (pentosas):

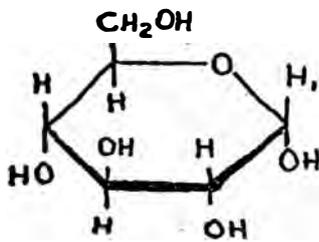


L-arabinosa

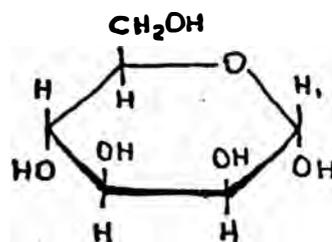


D-xilosa

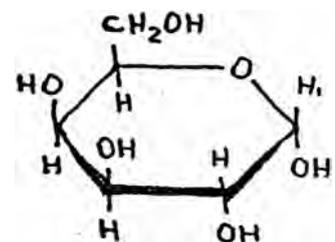
Azúcares de seis carbonos (hexosas) :



D-Glucosa



D-mannosa

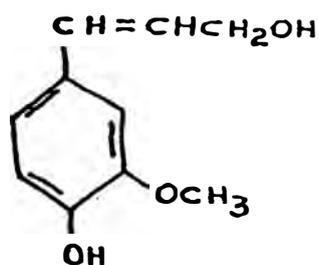
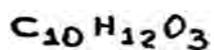


D-Galactosa

3. Lignina .- La lignina es la fracción no-carbohidrato de la madera de extrema complejidad y de difícil concentración. Básicamente es un polímero aromático heterogéneo y ramificado. La unidad repetitiva básica, parece ser el alcohol coniferílico. Constituye entre el 25 y 30% del peso de la madera.

El sistema parece ser totalmente amorfo y está posiblemente enlazado químicamente a las hemicelulosas.

Alcohol Coniferílico.- 3 -(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-2-propen-1-ol



Soluble en éter; moderadamente soluble en alcohol, casi insoluble en agua; soluble en álcalis. Los ácidos diluídos polimerizan el alcohol coniferílico convirtiéndolo en una goma amorfa.

#### 4. Sacarosa.-

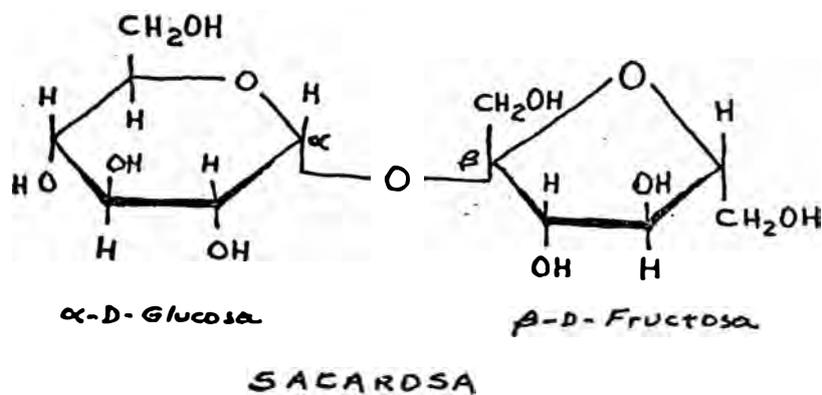
Se obtiene de caña de azúcar y remolacha azucarera.

Posee extensa bibliografía.

Cristales monoclínicos esferoidales. Sabor dulce. Estable a temperaturas ambiente.

De todos los disacáridos, la sacarosa es la más fácil de hidrolizar: el resultado es una mezcla de glucosa y fructosa la cual es llamada azúcar invertida.

Fórmula:



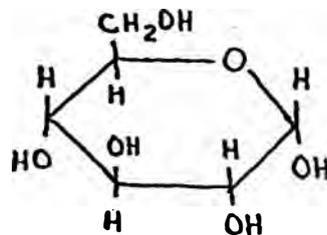
5. Glucosa: D-glucosa; Dextrosa, azúcar de uva, azúcar de maíz.



Principal fuente de energía de los organismos vivos. Ocurre naturalmente y en estado libre en los frutos y otras partes de la planta.

0.74 veces tan dulce como la sacarosa. Cristales monoclinicos planos. Posee amplia bibliografía.

Fórmula:



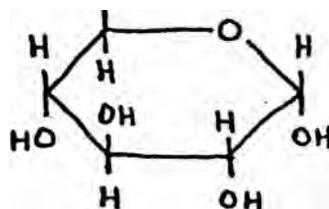
6. Xilosa.- D-xilosa; azúcar de madera.



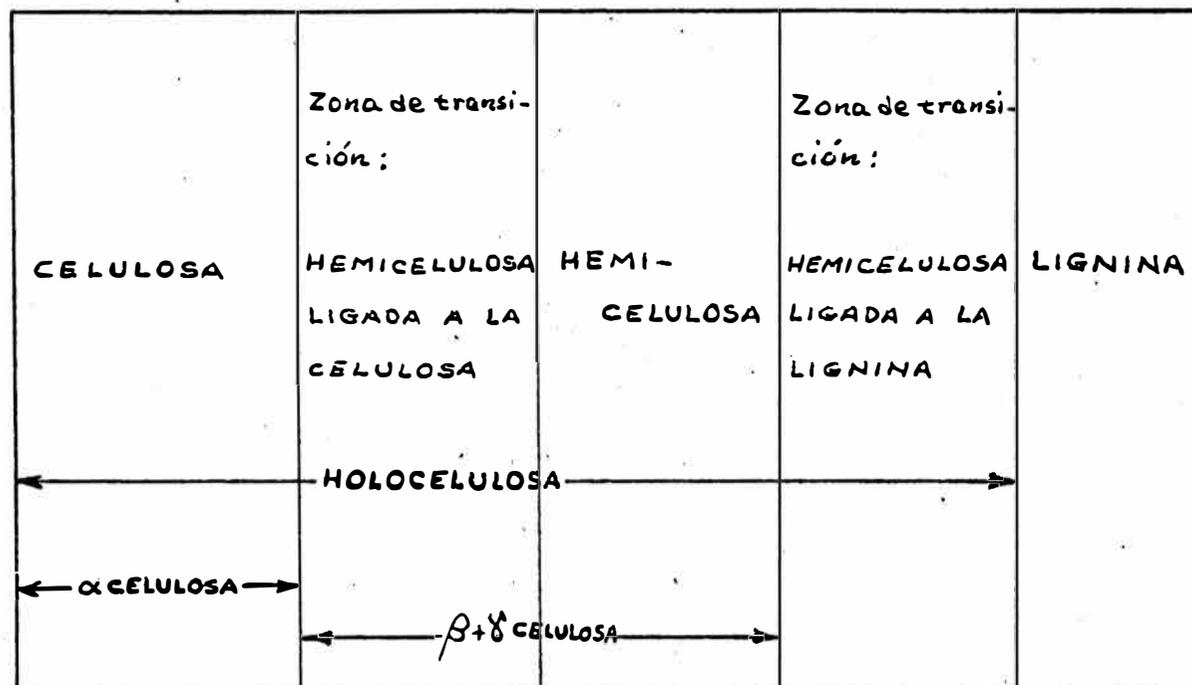
Ampliamente distribuida en las plantas, especialmente maderas. No se encuentra en estado libre, sino en forma de xilano, un polisacárido construido a partir de unidades de D-xilosa y en asociación con celulosa.

Cristales monoclinicos en forma de aguja o prisma. Sabor muy dulce. También posee abundante bibliografía.

Fórmula:



## COMPONENTES POLIMERICOS EN LOS RECURSOS LIGNO-CELULOSICOS



La  $\alpha$ -,  $\beta$ -y  $\delta$ - celulosa se definen arbitrariamente en función de la solub. en diferentes porcentajes de NaOH.

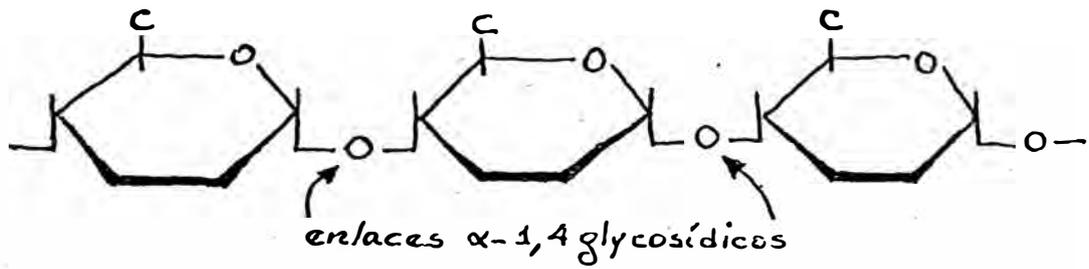
$\alpha$ - celulosa .- Insoluble en soluc. NaOH al 17.5% a  $t^{\circ}$  ambiente.

$\beta$ - celulosa.- Soluble en soluc. NaOH al 17.5% y precipita fácilmente cuando la soluc. se acidifica con ácido acético.

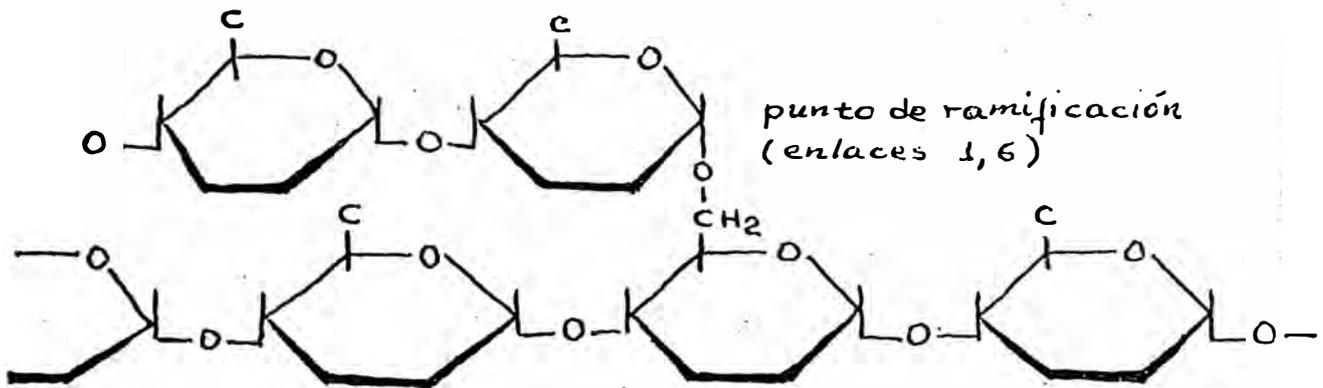
$\delta$ - celulosa.- Soluble en soluc. NaOH al 17.5%, no precipita en soluc. de ácido acético pero sí en etanol.

# DIFERENCIA EN ESTRUCTURA ENTRE EL ALMIDON Y LA CELULOSA

- **ALMIDON** El almidón está compuesto por **AMYLOSA** y **AMYLOPECTINA**

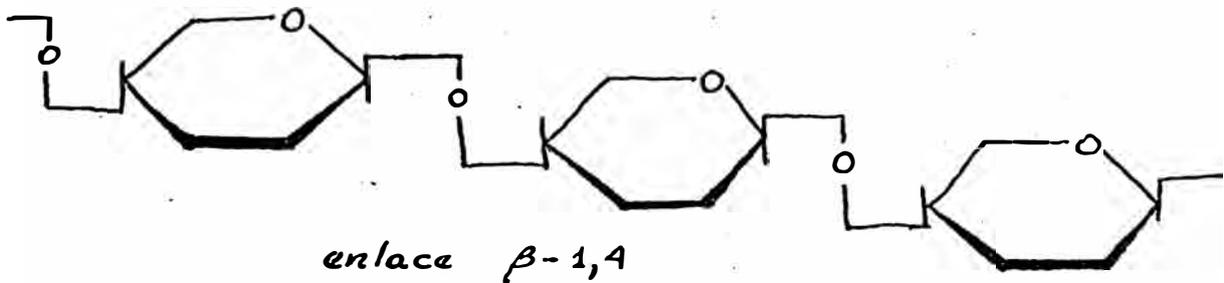


↑ **AMYLOSA** ↓



**AMYLOPECTINA**

- **CELULOSA**.-



**CADENA GLUCOSIDICA DE LA CELULOSA**

## ANEXO VI

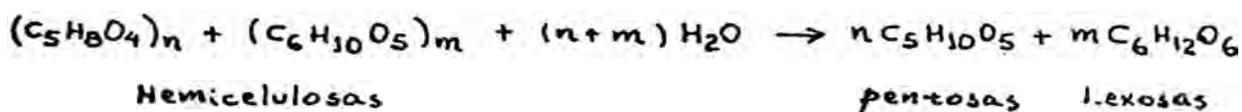
### REACCIONES QUÍMICAS DE HIDROLISIS

En los ensayos experimentales efectuados en este estudio, las reacciones químicas involucradas de manera principal son las relacionadas con hidrólisis. Dos son las reacciones químicas más importantes en la obtención de sustratos fermentables.

#### 1. Hidrólisis de Hemicelulosas

Como se ha visto en el Anexo V, las hemicelulosas están compuestas por unidades sacáridas (azúcares) de cinco y seis carbonos. Tratándose de materiales o recursos no-madera, la incidencia de pentosas ó azúcares de cinco carbonos, específicamente xilosa, son los más abundantes.

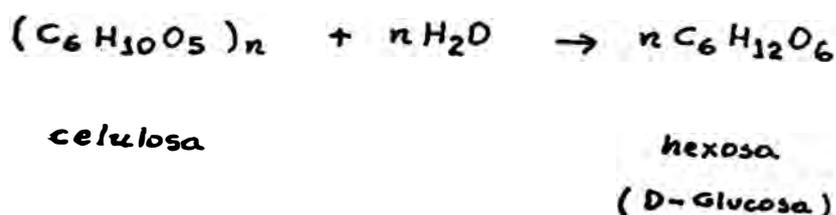
De modo general en nuestros ensayos de laboratorio se ha verificado la siguiente reacción global de hidrólisis ácida de hemicelulosas para producir sustratos azucarados, mayormente xilosas:



n y m son los números de unidades de repetición en una molécula dada y comúnmente son designados como Grado de Polimerización (GP)

#### 2. Hidrólisis de Celulosa

El polímero celulosa puede ser hidrolizado a D-glucosa según la reacción global:



Aquí, otra vez, n se refiere al grado de polimerización (GP) de las unidades simples de glucosa. El peso molecular de la celulosa es en consecuencia, para todo propósito práctico, igual a 162. GP. Valores aceptados para el GP de celulosa son de 1,000 a 15,000 (peso molecular de 162,000 a 2'430,000), dependiendo de la fuente y extensión de degradación del espécimen y también del método de determinación del GP.

## ANEXO VII

### DESCRIPCION DE LOS PROCESOS DE OBTENCION DE SUSTRATOS FERMENTABLES

En el Capítulo 8 de este trabajo se han propuesto, para su perfeccionamiento mediante estudios más profundos, dos procesos tentativos de hidrólisis de bagacillo, uno de los cuales se describe en este anexo con propósitos ilustrativos.

#### Hidrólisis Química del Bagacillo (Gráfico 8.3A)

El bagacillo es sometido a pretratamiento físico y químico. Físico, para reducirlo de tamaño a malla 18/35 y, químico para liberarlo de los denominados extractivos. En proporción de 8-10% de contenido de humedad, el bagacillo libre de extractivos es sometido a la acción del ácido sulfúrico al 5%.

A condiciones de operación definidas (90-100°C, 1 hr, relación S/L = 1/15), se verifica la reacción de hidrólisis de las hemicelulosas, liberándose los azúcares correspondientes, mayormente xilosa según determinación cromatográfica, que pasan al torrente líquido del sistema. En seguida, los residuos ligno-celulósicos no reaccionados (sólidos), son separados de la xilosa y el ácido sulfúrico mediante filtración. Los residuos ligno-celulósicos con 80% de humedad son llevados a secado para posterior hidrólisis de la celulosa.

La mezcla líquida xilosa-ácido diluido se neutraliza con carbonato de calcio formándose sulfato de calcio sólido que luego es separado por filtración. De este modo la xilosa está apta como sustrato fermentable.

Se necesitará un microorganismo ad-oc para fermentar xilosas. Por ejemplo, la levadura Pachysolen tannophilus fermenta xilosas a etanol, según referencias bibliográficas.

Para la hidrólisis propiamente dicha de la celulosa se utiliza ácido sulfúrico al 80%. Los residuos ligno-celulásicos secos son sometidos a la acción del ácido concentrado en condiciones apropiadas (20-23°C, 30 min, S/L = 1/15).

Como productos de hidrólisis en una primera etapa, se obtiene: pequeños polímeros de glucosa soluble en agua, el mismo ácido sulfúrico 80% ya que solo actúa para catalizar la reacción, y la lignina no afectada (sólida). Un proceso adicional denominado post-hidrólisis rompe estos pequeños polímeros para producir una solución diluida de glucosa simple. Las condiciones de post-hidrólisis son a alta temperatura (95-100°C), un tiempo de 90 minutos y se requiere que el ácido sulfúrico actúe a baja concentración para lo cual al inicio se añade la cantidad necesaria de agua hasta obtener un ácido sulfúrico al 8%.

Los productos de post-hidrólisis son llevados a filtración para separar la lignina sólida por un lado y la solución diluida de glucosa y ácido sulfúrico por otro lado.

La mezcla glucosa-ácido sulfúrico, en forma similar a como sucedió con la xilosa, se neutraliza con carbonato de calcio. El sulfato de calcio producido se separa luego de la glucosa por filtración. La solución neutralizada de glucosa, por las condiciones de operación, es muy diluida pero ya está apta como sustrato fermentable.

Para elevar la concentración de azúcares se requerirá evaporar la cantidad necesaria de agua.

En el caso de azúcares tipo glucosa, existen una gama de microorganismos que pueden fermentarla a etanol siendo la más familiar, la levadura del género *Saccharomyces*.

El uso de ácido sulfúrico (así como de cualquier otro agente químico catalizador) encierra un problema de separación en los productos de hidrólisis. En el caso de este estudio, por el uso de ácido sulfúrico concentrado se requería emplear gran cantidad de carbonato de calcio para neutralizar los azúcares y luego separar los productos no deseados.

Por esta razón en el Gráfico 8.3A se propone el uso de un equipo de electrodiálisis o de intercambio iónico que, según la literatura especializada, permiten una separación más selectiva de los azúcares, no existiendo además efluentes indeseables ya que el ácido sulfúrico se vuelve a usar en el proceso. Nuestro laboratorio carecía de estos equipos por lo cual no se ha experimentado en esos aspectos.

En cuanto a equipo utilizado en los procesos de hidrólisis, estos corresponden a los de un laboratorio convencional regularmente equipado. De acuerdo al proceso descrito se utilizaron principalmente los equipos citados a continuación:

Molino Wiley de cuchillas con tamiz incorporado - para reducción de tamaño (molienda)

Equipo soxhlet - para eliminar los extractivos del bagacillo.

Estufa con temperatura hasta 120°C - para secado de sólidos

Equipo de baño maría - para pre-hidrólisis y post-hidrólisis del material lignocelulósico que juntamente con el agente químico eran dispuestos en matraces de 1,000 ml.

Bomba de vacío, embudo buchner y quitasato - para filtración.

Adicionalmente, como equipos accesorios se utilizaron: recipiente auto-clave, cámara ascéptica con luz ultra-violeta, rotavapor, plancha de calentamiento eléctrico, mechero Bunsen, equipo ablandador de agua (Rovic), refrigeradora e incubadora.