

Universidad Nacional de Ingeniería

FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA
Y MANUFACTURERA



**“ Estudio Biotecnológico para la Obtención
de Alcohol Eílico a partir de los
Deshechos Celulósicos de Madera ”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO QUIMICO

DIONICIO ALLENDE CUPE

FREDDY RAMOS BUENO

LIMA • PERU • 1989

A NUESTROS PADRES :

MANUEL ALLENDE CALLE
ROSA CUPE DE ALLENDE

ALFREDO RAMOS CASTRO
MARTHA BUENO DE RAMOS

NUESTRO AGRADECIMIENTO A TODAS LAS PERSONAS QUE CONTRIBUYERON AL DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO, EN ESPECIAL AL DOCTOR SIMON PEREZ ALVA, DIRECTOR DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, A NUESTRO ASESOR, INGENIERO EDWIN DEXTRE J., AL INGENIERO JEFE Y PERSONAL DEL LABORATORIO DE OPERACIONES UNITARIAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA.

SUMARIO

El Estudio Biotecnológico para la obtención de alcohol etílico a partir de los desechos celulósicos de la madera, emplea aserrín de tornillo como materia prima, y combina la acción química y enzimática.

La acción química comprende tres etapas: prehidrólisis, hidrólisis y post-hidrólisis. La acción enzimática comprende básicamente la fermentación.

En la pre-hidrólisis, la materia prima es sometida a la acción del ácido sulfúrico de 14 % y una temperatura de 92 °C y una relación en peso de ácido a madera seca de 1.0, se sacarifican las hemicelulosas, quedando un residuo lignocelulósico más poroso. La hidrólisis se realiza con ácido sulfúrico de 75 %, por espacio de 20 minutos, y con una relación de ácido a muestra de 3.0; obteniéndose un residuo sólido impregnado con oligómeros. Para la post-hidrólisis, se diluye con 10 volúmenes de agua a peso de residuo sólido obtenido anteriormente, y se hierve por espacio de 60 minutos; transformándose en azúcares fermentables. Luego esta solución se neutraliza con hidróxido de calcio hasta un pH de 5. Para la fermentación se utilizó una cepa de SCHAROMYCES CEREVISEAE ATCC 4126, a la que previamente se le determinó su curva de crecimiento poblacional. La fermentación se llevo a cabo con una concentración inicial de azúcar de 4%, a un temperatura de 30 °C, pH inicial de 5, por espacio de 22 horas.

El presente estudio arroja los siguientes resultados: por cada 100 gr de madera seca, se obtienen 11.05 gr de pentosas 40.62 gr de hexosas, estas últimas se transforman en 16.88 gr de alcohol etílico.

INDICE

ESTUDIO BIOTECNOLOGICO PARA LA OBTENCION DEL ALCOHOL ETILICO A PARTIR DE LOS DESECHOS CELULOSICOS DE LA MADERA

OBSERVACIONES Y CONCLUSIONES

I.- INTRODUCCION

II.- ESTUDIO DE LA MATERIA PRIMA

- 2.1. Descripción de la materia prima
- 2.2. Disponibilidad de materia prima
- 2.3. Estructura morfológica
- 2.4. Constitución química básica
 - 2.4.1. Celulosa
 - 2.4.2. Hemicelulosa
 - 2.4.3. Lignina
 - 2.4.4. Análisis químico de la muestra
- 2.5. Acción de los Agentes Químicos
 - 2.5.1. Acción de los ácidos
 - 2.5.2. Acción de los álcalis

III.- ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

- 3.1. Factores que influyen en la sacarificación
- 3.2. Avances de estudios, e investigaciones anteriores
- 3.3. Alternativas de proceso
- 3.4. Selección de las alternativas

IV.- FERMENTACION

- 4.1. Definición
- 4.2. Clases de fermentación
 - 4.2.1. Fermentación aeróbica

- 4.2.2. Fermentación anaeróbica
- 4.3. Levaduras
 - 4.3.1. Definición
 - 4.3.2. Estructura de las levaduras
 - 4.3.3. Factores que regulan el crecimiento
 - 4.3.4. Clasificación de las levaduras
 - 4.3.5. Fases del crecimiento microbiano
- 4.4. Estudios e investigaciones en Fermentación
- 4.5. El Hidrolizado
 - 4.5.1. Composición del hidrolizado
 - 4.5.2. Tratamiento del hidrolizado
- 4.6. Factores que afectan la fermentación
- 4.7. Modalidades de fermentación

V.- CINETICA DE LA FERMENTACION

- 5.1. Introducción
- 5.2. Cinética de las Reacciones Enzimáticas
- 5.3. Inhibición competitiva
- 5.4. Inhibición no competitiva
- 5.5. Modelos de velocidad de fermentación con crecimiento asociado y sin crecimiento asociado.
- 5.6. Modelos cinéticos de la fermentación
 - 5.6.1. Modelo cinético del crecimiento celular
 - 5.6.2. Modelo cinético del consumo de sustrato
 - 5.6.3. Modelo cinético de la formación de producto
 - 5.6.4. Determinación de la velocidad específica de crecimiento medio μ_M y de la constante K_s .

VI.- PRUEBAS EXPERIMENTALES

- 6.1. Ensayos de laboratorio

- 6.2. Prehidrólisis
 - 6.2.1. Estudio teórico de la prehidrólisis
 - 6.2.2. Influencia de la temperatura
 - 6.2.3. Influencia de la concentración de ácido sulfúrico
 - 6.2.4. Influencia de la relación en peso de Acido a Madera
 - 6.2.5. Influencia del tamaño de partícula
 - 6.2.6. Lavado de sólidos
- 6.3. Hidrólisis
 - 6.3.1. Estudio teórico de la hidrólisis
 - 6.3.2. Efecto de la temperatura
 - 6.3.3. Influencia de la concentración de ácido sulfúrico
 - 6.3.4. Influencia de la relación en peso de ácido-madera
- 6.4. Post-hidrólisis
 - 6.4.1. Estudio teórico de la post-hidrólisis
 - 6.4.2. Efecto de la dilución
 - 6.4.3. Efecto del tiempo de hervido.
- 6.5. Neutralización
- 6.6. Estudio experimental de la fermentación
 - 6.6.1. Estudio teórico
 - 6.6.2. Curva de crecimiento celular
 - 6.6.2.1. En el medio "Saburaud"
 - 6.6.2.2. En el medio similar al hidrolizado JUFFY
 - 6.6.2.3. En el medio hidrolizado
 - 6.6.2.4. Observaciones
 - 6.6.3. Cálculo de las velocidades específicas
 - 6.6.4. Cinética del crecimiento celular
 - 6.6.5. Cinética del consumo de sustrato
 - 6.6.6. Cinética de la formación del producto

6.6.7. Determinación gráfica de la presencia de agentes
inhibidores en el hidrolizado

VII.- RESIDUOS Y SUBPRODUCTOS DEL PROCESO Y SU APROVECHAMIENTO

VIII.- BALANCE DE INSUMOS Y PRODUCTO

IX.- ALCANCES Y PROYECCIONES DE LA PRESENTE INVESTIGACION

APENDICE

BIBLIOGRAFIA

OBSERVACIONES Y CONCLUSIONES

- 1.- La etapa de prehidrólisis es la etapa que permitirá fermentar los azúcares provenientes de la hidrólisis principal en condiciones más favorables, al haber sido retiradas en su mayor parte los elementos inhibidores y nocivos para la fermentación, tales como el furfural, flavones, taninos, gomas, etc.
- 2.- La prehidrólisis por otro lado permite una hidrólisis más eficiente, al haber retirado las hemicelulosas dejando en su lugar huecos y debilitando los enlaces químicos entre la lignina y la celulosa. La prehidrólisis basa su eficiencia en una buena humectación del material celulósico, permitiendo la hidrólisis de mayor cantidad de hemicelulosas.
- 3.- El agua empleada para extraer las pentosas resultantes de la prehidrólisis podría ser reciclada con la finalidad de aumentar su concentración y facilitar su tratamiento posterior. Estos concentrados se fermentarían con una enzima llamada glucosa-isomerasa a xilulosa, la cual es fermentable por la *Sacharomyces Cerevisae*.
- 4.- La hidrólisis se llevó a cabo a la temperatura normal de la reacción, de 35°C a los 20 min., un control externo de la temperatura mediante refrigeración permitirá controlar la degradación de la glucosa y por ende aumentar el rendimiento del proceso.
- 5.- Las condiciones de operación óptimas para las diferentes etapas fueron las siguientes:

A.- Pre-hidrólisis

Granulometría	-20 +50 mallas ASTM
Temperatura	90 - 92°C
Conc. de ácido sulfúrico	14% en peso
Peso de Acido/Peso de Madera Seca	1
Tiempo de Reacción	2.12 horas

B.- Hidrólisis

Temperatura	T°de la reacción al cabo de 20'
Conc. de ácido sulfúrico :	75%
Peso de Acido/Peso de Madera Seca	3
Tiempo de hidrólisis	20 min.

C.- Post-Hidrólisis

Tiempo	1 hora
Temperatura	97°C
Volumen de dilución	: 10 veces el peso del material hidrolizado

D.- Fermentación

pH inicial	5
Temperatura	30°C
Concentración inicial de sustrato	4% (gr. de azúcar/100 ml. de solución)
Cepa empleada	Sacharomyces Cereviseae ATTC 4126
Conc. de células inicial promedio	1×10^7 células/ml
Tiempo de la fermentac.	22 horas
Conc. final de alcohol	1.6 gr/100 ml

Relación de medio a inóculo , 6 a 1 en volumen

Número de trasvases 4

- 6.- La levadura seleccionada nos permitió obtener una eficiencia para la etapa de fermentación de: 78.43%
- 7.- Concluimos que a pesar de la pre-hidrólisis no se logra anular totalmente el efecto de los agentes inhibidores de la fermentación, como se muestra en el gráfico correspondiente (Fig. 6.7) donde se comparan la fermentación de los medios Juffy e hidrolizado.
- 8.- Del balance de materia se obtiene al final de la fermentación 0.5 gr de azúcar/100 ml de solución, esto se debe probablemente a que la mayor parte se encuentra formando el complejo enzima-sustrato y la otra parte se encuentra asociada a los compuestos inhibidores formando el complejo sustrato-inhibidor.
- 9.- La cantidad de azúcar fermentable inicial es transformada en alcohol, anhídrido carbónico y masa celular muerta. De acuerdo a esta apreciación la reacción guarda una relación estequiométrica.
10. El rendimiento en cuanto a consumo de sustrato, concentración final de alcohol y tiempo de fermentación se podría mejorar utilizando cepas más adaptables al medio hidrolizado y a sus agentes inhibidores, elevando la concentración inicial de azúcar, elevando la concentración inicial de levadura durante la fermentación para así vencer la fase de latencia.
11. Se han probado durante la fermentación, concentraciones de urea = 0.08% y fosfato disódico = 0.02%, notándose un crecimiento poblacional nulo.
12. El pH inicial ajustado a 5.0 y la temperatura de 30°C, son condi-

ciones inherentes a la cepa empleada durante la fermentación y son las recomendadas por el Departamento de Microbiología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para este tipo de levaduras.

I N T R O D U C C I O N

El uso del alcohol etílico como combustible en motores de combustión no es un concepto nuevo, su uso fué extenso en Europa en el período anterior y durante la Segunda Guerra Mundial. (3) (19)

En Norteamérica sólo ha tenido usos limitados, por ejemplo en la combustión de máquinas de alta relación de compresión, y con fines de investigación. (1) (2)

Los costos relativamente bajos y la disponibilidad del petróleo o hicieron caro el uso extensivo del alcohol. (3)

Sin embargo, los depósitos naturales de combustibles fósiles (petróleo, carbón), tienden a agotarse. Además el continuo y creciente uso de éstos ha ocasionado problemas de contaminación ambiental de difícil solución. (3) (2) A pesar de los altibajos en el precio del petróleo que actualmente se registra, la tendencia muestra un incremento cada vez mucho mayor. (3)

Es por estas razones que se ha propuesto como solución práctica la sustitución parcial o total del petróleo por combustibles provenientes del tratamiento de materia vegetal, que constituye en sí una fuente de recursos energéticos renovable. (2) (3)

Como se sabe el empleo de la hidrólisis de madera a nivel industrial data desde comienzos de la Segunda Guerra Mundial, por lo que se podría pensar que las investigaciones en este campo ya están agotadas, pero esto no es totalmente cierto. En los últimos años, muchas Instituciones a nivel mundial se han avocado a la investigación de nuevos procesos más sencillos, de mayor rendimiento, de mayor rentabilidad y con perspectivas a su pronta implementación a nivel industrial. Así podemos mencionar las investigaciones llevadas a cabo por el Comité de Investigación y Desarrollo Energético de Nueva Zelandia (1981) (18), los de la Fundación Centro Tecnológico de Minas Gerais de Brasil (7), que fué auspiciado por el Ministerio de Industria y Comercio Brasileño (1978); los del Laboratorio de Ingeniería de Recursos Renovables (LORRE) de la Universidad de Purdue (1980) (2).

Por estas razones se desea investigar un nuevo proceso de hidrólisis de madera empleando ácido sulfúrico concentrado.

El proceso consta de cuatro etapas, pre-hidrólisis, hidrólisis, post-hidrólisis y fermentación.

La pre-hidrólisis se realiza con ácido sulfúrico diluído (14%), a una temperatura inferior a 100°C, con una relación de líquido/sólido baja. Este proceso de tostado sacrifica las hemicelulosas en casi su totalidad, así como también ataca parte de la celulosa amorfa. Como resultado de este tratamiento se obtiene un producto sólido mas poroso; en que el ácido concentrado tendrá un mejor acceso hacia la celulosa cristalina, a través de la barrera de lignina que resultó degradada

La segunda etapa, la hidrólisis principal, consiste en un ataque con ácido sulfúrico concentrado (75%), el que ataca relativamente en forma fácil a la celulosa. El ataque se lleva a cabo sin calentamiento, ya que la reacción en su comienzo es bastante exotérmica y permite una velocidad de reacción bastante aceptable. Al cabo de 20 minutos se obtienen como productos azúcares polímeros de glucosa (de cuatro o más unidades) llamados oligómeros; los que se encuentran impregnados en los sólidos de lignina residual.

La tercera etapa consiste en una post-hidrólisis de los oligómeros, para lo cual se agrega agua a la masa proveniente de la etapa anterior, alcanzándose una concentración de ácido sulfúrico de 5-6 %, y es llevado a ebullición durante 120 minutos, al cabo de los cuales los oligómeros se han convertido en glucosa. El líquido es filtrado y neutralizado con cal mineral y está listo para su fermentación.

La última etapa, la fermentación se lleva a cabo gracias a la acción de la levadura *sacharomyces cerevisiae* que fermenta la glucosa mediante un proceso bioquímico complejo hasta llegar a la obtención de alcohol etílico y CO_2 como productos finales. La fermentación se lleva a cabo a un pH de 4-5, la temperatura es mantenida en 30°C , y la concentración de azúcares inicial es de 4 g/100 ml. obteniéndose una concentración final de alcohol 1.7% en 24 horas de fermentación.

CAPITULO II

2.- ESTUDIO DE LA MATERIA PRIMA

2.1. Descripción de la materia prima.

La madera se encuentra disponible en dos formas, una de ellas conformando los bosques en su estado original; la otra forma es aserrada, ya sea como madera utilizable en carpintería o como desecho (aserrín). La madera aserrada utilizable en carpintería no puede ser destinada a hidrólisis debido a su alto costo. Si se deseara emplear la madera en su forma original de los bosques tienen que incluirse operaciones adicionales que incluyan el talado y la reducción de tamaño. El tamaño de partícula del aserrín es el más adecuado para la hidrólisis, posee un costo relativamente bajo, y se obtiene en cantidades relativamente grandes en el conglomerado de aserraderos de Pucallpa.

La muestra fué obtenida mediante una recolección en distintos aserraderos. El Cuadro 2.1 muestra la distribución por tamaño de partícula, vemos que predomina el tamaño comprendido entre -20, +50 mallas ASTM, por esta razón se elige este tamaño para el estudio de la hidrólisis.

2.2. Disponibilidad de materia prima.

Se puede afirmar que la producción de aserrín es directamente proporcional a la producción de madera aserrada, tal es así que por cada m^3 de madera rolliza se obtiene aproximadamente $0.4m^3$ de aserrín de distintos tamaños.

CUADRO N° 2.1

DISTRIBUCION POR TAMAÑO DE PARTICULA
(SEGUN NORMA DE LA ASTM)

MALLA ASTM	% PESO	% ACUMULADO
+ 10	0.65	0.65
+ 20	8.20	8.85
+ 50	58.59	67.44
+ 100	26.05	93.49
- 100	6.51	100.00

Interesa conseguir una materia prima homogénea en cuanto a especie y tamaño de partícula, además nos interesaría que exista una alta concentración de aserraderos de modo que el costo de transporte sea el mínimo.

De los cuadros estadísticos adjuntos se extrae que:

Del cuadro de producción de madera aserrada por departamentos (Cuadro N° 2.2) Ucayali tiene la mayor producción con 185,101 m³ (31.45%), seguido por Junín con 151,966 m³ (28.95%), San Martín con 67,248 m (12.81%) y otros.

Del cuadro de producción de madera aserrada en el departamento de Junín (Cuadro N° 2.3), la mayor proporción de madera aserrada es de eucalipto con 57,443 m³ (36.14%), seguido por el roble corriente con 24,249 m³ (15.26%). Se sabe también que la mayor parte de madera de eucalipto se emplea en la construcción de estructuras sin ser aserrada, por este motivo no debe ser considerada a efectos de nuestro estudio.

Del cuadro de producción de madera aserrada en el departamento de Ucayali (Cuadro N° 2.4), del tornillo que es procesado casi en su totalidad en la zona de Pucallpa, se extraen 44,427 m³ (22.00%), de catahua 42,671 m³ (21.12%) de cedro 28,518 m³ (14.12%).

Del cuadro de producción de madera aserrada por especies (Cuadro N° 2.5), vemos que globalmente la producción total se mantiene estable alrededor de 500,000 m³

CUADRO N° 2.2. PRODUCCION DE MADERA ASERRADA POR DEPARTAMENTOS EN M³

AÑO	1981	1982	1983	1984	1985	1986	PROMEDIO
AMAZONAS	9,537	4,475	2,287	3,725	6,380	7,994	5,733
ANCASH	175	624	7,835	221	533	34	1,570
APURIMAC	3			1,590	853		408
AREQUIPA	-	-	-	-	-	-	0
AYACUCHO	1,476	1,269	1,220	320	374	243	817
CAJAMARCA	2,392	1,136	1,444	1,272	5,162	5,064	2,745
CUZCO	30,245	18,901	20,595	25,634	20,806	24,336	23,419
HUANCAVELICA	-	-	-	-	391	338	121.5
HUANUCO	44,474	18,568	6,078	6,140	3,552	6,418	14,205
ICA	-	-	-	-	-	-	0
JUNIN	211,474	185,827	83,609	152,995	118,954	158,939	151,966
LA LIBERTAD	19	64	-	-	-	8	15.17
LAMBAYEQUE	-	-	-	-	-	-	0
LORETO	39,986	33,281	21,320	30,398	19,041	40,522	30,758
MADRE DE DIOS	16,944	14,220	13,160	19,041	24,804	37,871	21,007
PASCO	46,520	29,401	26,517	22,275	23,309	53,913	33,656
PIURA	-	-	-	-	-	-	0
PUNO	4,366	5,515	5,743	6,235	5,964	9,436	6,210
SAN MARTIN	87,465	65,770	68,830	57,173	64,626	59,592	67,243
TACNA	-	-	-	-	-	-	0
TUMBES	-	-	-	-	-	-	0
UCAYALI	147,994	144,926	121,443	147,315	229,982	201,948	165,101

FUENTE: ANUARIO DE ESTADISTICA FORESTAL Y DE FAUNA, AÑOS 1982,1983,1984,1985,1986,1987(MINISTERIO DE AGRICULTURA).

CUADRO N° 2.3

PRODUCCION DE MADERA ASERRADA POR ESPECIES EN EL
DEPARTAMENTO DE JUNIN - AÑO 1986

ESPECIE	VOLUMEN EN M ³	PORCENTAJE
CAOBA	507	0.32
CEDRO	3,770	2.37
NOGAL NEGRO	915	0.58
ISHIPINGO	599	0.38
TORNILLO	18,320	11.53
MOENA	18,575	11.69
DIABLOFUERTE	120	0.08
ALCANFOR	6,256	3.94
CEDRO HUASCA	841	0.53
ULCUMANO	265	0.17
ROBLE AMARILLO	203	0.13
COPAL	472	0.30
CONGONA	6,204	3.90
TULPAY	1,842	1.16
CHONTAQUIRO	6,452	4.06
LAGARTO CASPI	408	0.26
MATAPALO	204	0.13
ROBLE CORRIENTE	24,249	15.26
COPAIBA	17	0.01
CUMALA	133	0.08
EUCALIPTO	57,443	36.14
OTRAS MADERAS	11,144	7.01
TOTAL	158,939	100.00

CUADRO N° 2.4

PRODUCCION DE MADERA ASERRADA EN EL
DEPARTAMENTO DE UCAYALI - AÑO 1986

ESPECIE	PRODUCCION M ³	PORCENTAJE
MARUPA	272	0.13
SHIHUAHUACO	344	0.17
ESTORAQUE	107	0.05
AGUANO MASHA	637	0.32
HUAYRURO	3,757	1.86
CAOBA	16,975	8.41
CEDRO	28,518	14.12
ISHIPINGO	13,668	6.77
TORNILLO	44,427	22.00
COPAIBA	20,372	10.09
MOENA	6,132	3.04
LAGARTO CASPI	1,139	0.56
CATAHUA	42,671	21.13
PASHACO	2,666	1.32
BOLAINA	235	0.12
CUMALA	15,190	7.52
LUPUNA	542	0.27
CACHIMBO	1,733	0.86
OTRAS MADERAS	2.563	1.27
TOTAL	201,948	100.00

CUADRO N° 2.5

PRODUCCION DE MADERA ASERRADA POR ESPECIES PARA LOS AÑOS DE 1981 A 1986 (M³)

AÑOS	1981	1982	1983	1984	1985	1986
<u>ESPECIES</u>						
CAOBA	57,101	30,789	20,686	28,603	39,670	32,901
CATAHUA	0	9,393	11,375	19,942	25,501	45,917
CEDRO	84,633	76,441	53,674	54,322	56,715	73,234
COPAIBA	20,076	15,222	8,716	10,251	19,442	22,742
CUMALA	20,987	15,610	11,820	22,502	39,078	26,390
EUCALIPTO	94,585	87,473	23,784	33,899	58,082	70,211
ISHIPINGO	11,304	8,236	9,507	7,659	11,426	17,044
MOENA	38,643	40,988	29,221	41,323	28,349	34,091
ROBLE CORRIENTE	72,227	67,956	19,755	15,686	12,330	52,405
TORNILLO	131,731	121,078	101,994	93,430	118,497	112,372
OTRAS ESPECIES	112,057	82,834	69,093	146,731	115,646	119,349
TOTAL	643,343	523,979	380,083	474,348	524,736	606,656

FUENTE: ANUARIO DE ESTADISTICA FORESTAL Y DE FAUNA AÑOS 1982, 1983, 1984, 1985, 1986, 1987

por año, asimismo vemos que la proporción de tornillo se mantiene estable (120,000 m³ aproximadamente). No ocurre lo mismo con las especies caoba o cedro, muy apreciadas en carpintería, las que se encuentran cada vez más alejadas de las vías de transporte, que origina una disminución paulatina en la extracción de estas especies. Esto no sucede con el tornillo, que tiene buena aceptación aunque no lo es tanto como el cedro y la caoba, tiene un crecimiento rápido y se le puede encontrar cerca de las vías de transporte, puede suponerse además que conforme pase el tiempo constituirá un porcentaje cada vez mayor del total de madera aserrada.

Podemos considerar por lo tanto a la zona de Pucallpa como fuente de materia prima.

2.3. Estructura morfológica de la madera.

Considerada en conjunto la madera es anisótropa y heterogénea. Puede observarse que está constituida por sustancias de sostén y cementación. (5)

Dentro de las sustancias de sostén, la principal es la celulosa, que da resistencia y tenacidad, la otra sustancia de sostén está conformada por hidratos de carbono coligados afines (hemicelulosas, pentosas, pectinas, etc.) que sirven como sustancias de reserva. (2)

Dentro de las sustancias de cementación tenemos a la lignina, además de gomas, colas, resinas, grasas, ceras,

colorantes y componentes minerales. Muchas investigaciones confirman que los hidratos de carbono coligados se encuentran químicamente unidos a la lignina. (5) (2).

En cuanto a la fibra de madera, vemos que se compone de: (5)

- a) La sustancia intercelular primaria (básicamente lignina).
- b) La pared celular primaria, o capa media, hinchable (constituída por celulosa, pentosas y lignina). Los cordones micelares se encuentran orientados transversalmente a la longitud de la fibra conformando una estructura tubular.
- c) La pared celular secundaria (constituída por celulosa, pentosas, hidratos de carbono, lignina y otros), da la resistencia mecánica, a su vez tiene tres capas:
 - Capa externa, con fibras de menor inclinación.
 - Capa media, forma la mayor parte de la estructura, en líneas helicoidales, de mayor inclinación.
 - Capa interna, que posee micelas tendidas.

2.4. Constitución química de la madera.

Como hemos visto la madera está constituída químicamente, por celulosa, hemicelulosas y lignina en su mayor parte.

2.4.1. LA CELULOSA.

Es el componente principal de las fibras de madera

y de las plantas. Es polisacárido mas abundante en la naturaleza, es insoluble en agua e insípido (6), es un carbohidrato no reductor.

Se ha determinado que la celulosa está constituida por cadenas de unidades D-glucosa, unidas entre sí por enlaces β -glucosídicos al C-4 de la siguiente unidad.

La longitud media de las cadenas polímeras es muy variable, así como el ancho y la orientación de los cristalitos, dependiendo de la procedencia de la celulosa. El grado de polimerización puede variar entre 10 y 2000 unidades. La parte cristalina de la celulosa contiene cuatro restos de glucosa que son difíciles de separar.

2.4.2. HEMICELULOSA

Se llaman también hidratos de carbono coligados, son polisacáridos que sirven como sustancia de sostén y de reserva. Casi todos se hidrolizan mucho más fácilmente que la celulosa por cocción con ácidos minerales diluídos.

Entre los polisacáridos pentosanos tenemos el xilano (la mayor parte) y el arabano, cuyos monosacáridos respectivos son la d-xilosa y la l-arabinosa.

También encontraremos Hexosanos, constituidos en su mayor parte por mananos cuyo monosacárido es la manosa.

Los investigadores también han detectado la presencia de poliurónidos, que tienen su origen en la hidrólisis de las hexosas. Entre éstos podemos mencionar al ácido d-galacturónico, ácido d-glucorónico. (5).

2.4.3. LIGNINA

Es el componente característico de la pared celular de las plantas. El encadenamiento macromolecular de la lignina se verifica en todas direcciones de modo que se originan moléculas gigantescas tridimensionales que pueden reaccionar con otras moléculas próximas y unirse químicamente a ellas.

La composición química de la lignina aun no está bien determinada debido a la complejidad de su estructura, pero existen dos hechos esenciales: 1º Por lo menos una parte de la lignina tiene naturaleza aromática, y 2º Sus distintos sillares no son idénticos entre sí (heteropolímero), a diferencia de lo que ocurre con la celulosa. Se caracteriza por presentar un elevado número de grupos $-OCH_3$ metoxilo, y de grupos $-OH$, algunos de los cua-

les de naturaleza fenólica. (7).

2.4.4. Análisis químico de la muestra.

De acuerdo al análisis químico de la muestra hecho según el método Kurschmer y Hoffner para celulosa, Bromuro-bromato para hemicelulosas , Norma Afnor PrT12-014 para lignina, Norma-TAPPI T 6 05-59 para extractivos en alcohol benceno, se han obtenido los siguientes resultados:

Celulosa	51.7%
Hemicelulosa	11.8%
Lignina	32.8%
Extractivos en alcohol-benceno	3.3
Cenizas	<u>0.4</u>
TOTAL	100.0%

Los procedimientos para el análisis se encuentran explicados en el Apéndice A.

2.5. Acción de los Agentes Químicos

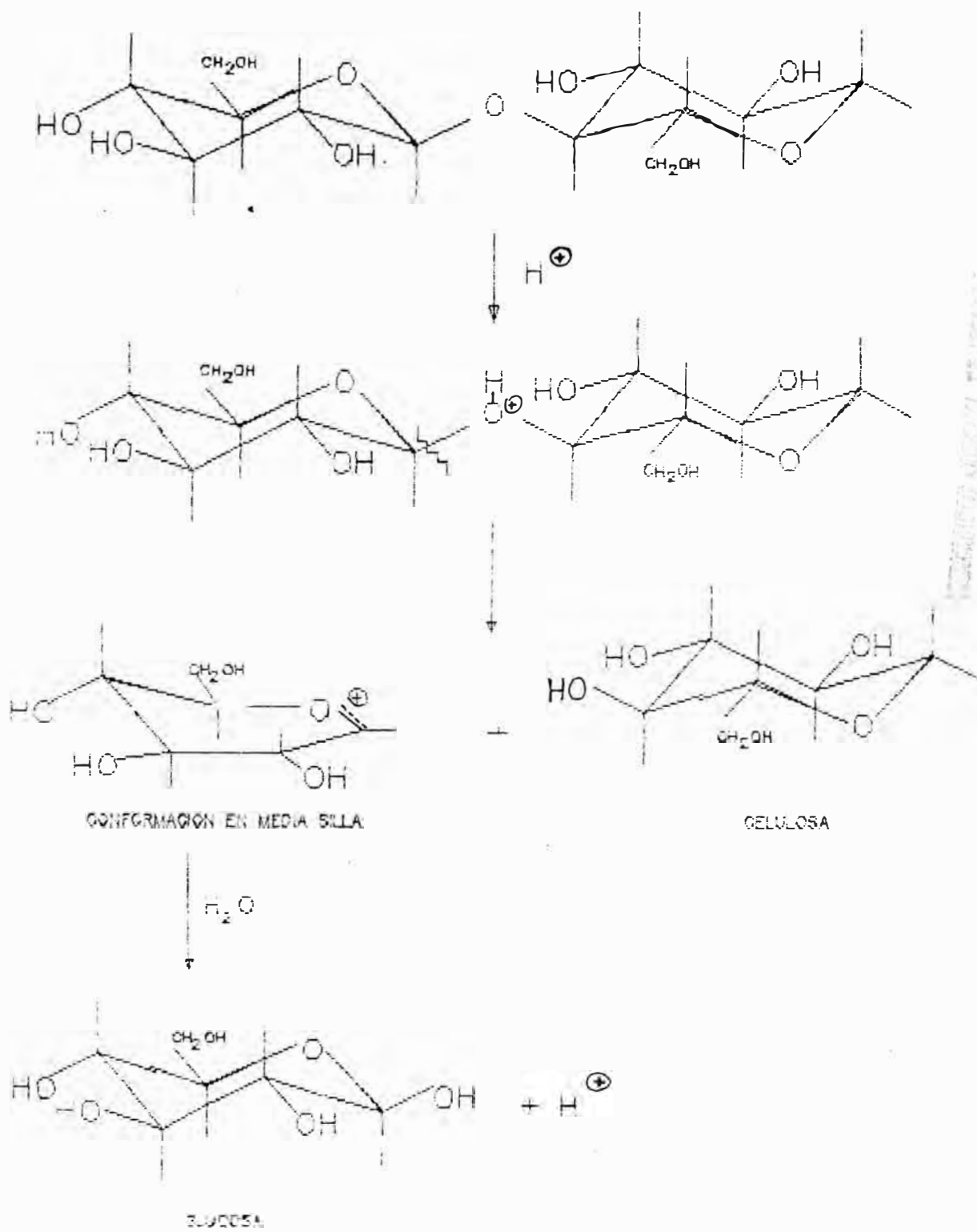
2.5.1. La Influencia del Acido.- (5)

La hidrólisis ácida de los enlaces glucosídicos es de importancia en muchos procesos técnicos que emplean madera como materia prima. En la figura N°2.1 ilustramos el mecanismo de ruptura ácida de los enlaces glucosídicos.

La reacción comienza con una adición rápida de un protón al átomo de oxígeno de la aglicona, seguida de una ruptura lenta del ácido conjugado protonizado hacia el ión carbonio cíclico, el cual adopta una conformación de media silla. Después de una rápida adición de agua, el azúcar es liberado. Debido a que el azúcar compite por el solvente (agua); pequeñas cantidades de disacáridos se forman como productos de reversión.

La velocidad de hidrólisis de los polisacáridos se ve afectada por muchos factores. Debido a los efectos de interacción de los sustituyentes, los furános se hidrolizan más rápidamente que los piranosidos análogos. Existen diferencias significativas en las velocidades de hidrólisis de glucósidos diastómeros (diastereoisómeros). Por ejemplo, las velocidades relativas de hidrólisis de metil - α - D-glucó-, manno-, y galactopiranósidos son 1.0/2.9/5.0. Esto puede relacionarse a las estabilidades de los a

CELULOSA



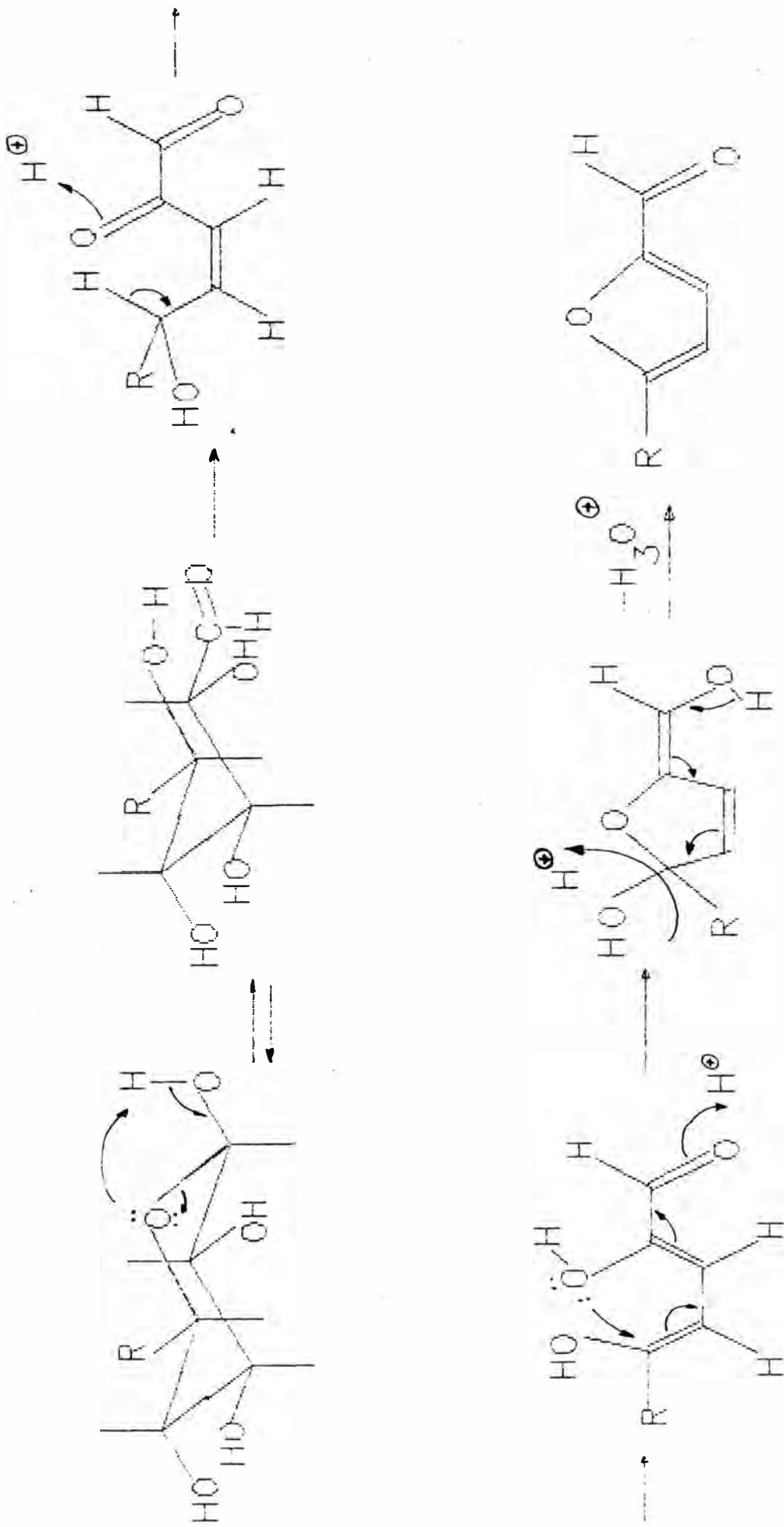
HIDROLISIS ACIDA DE CELULOSA
FIG. 2.1

cidos conjugados respectivos, los cuales son transformados en los iones carbonio de conformación de media silla a diferentes velocidades. También los sustituyentes que se encuentran en la posición del carbono 2, obviamente desfavorecen la conformación de media silla.

Los grupos carboxílicos unidos a las cadenas de polisacáridos tienen una considerable influencia en las velocidades de hidrólisis, debido principalmente a la interacción estérica (efecto estérico o de posición), debiendo considerarse también los efectos inductivos. Por ejemplo, los glucorónidos se hidrolizan más lentamente que los glucósidos. Se puede asumir que la formación del ión carbonio intermedio toma lugar en las posiciones terminales que en las posiciones medias de la cadena polisacárida. De acuerdo con esto el rendimiento en monosacáridos después de una hidrólisis parcial o pulpeo al sulfito, es mayor que el calculado en base a una ruptura de enlace probabilística.

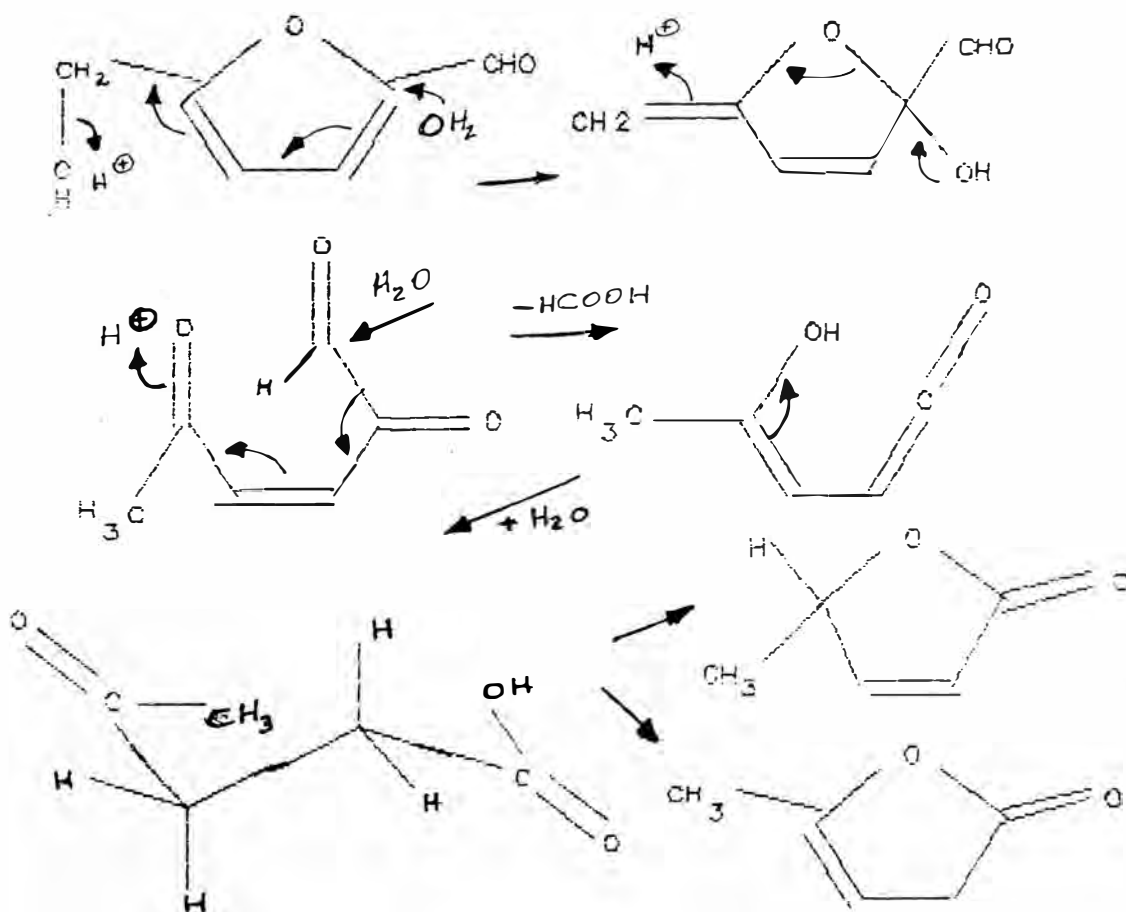
Una reacción que se opone a la hidrólisis ácida catalizada es la reversión antes mencionada. Los ácidos también catalizan la formación de azúcares anhidros; la reversión da lugar a la formación de enlaces glucosídicos (en números de 1 a 6). La degradación de las pentosas y los ácidos urónicos a furfural, así

como las hexosas a hidroximetilfurfural, ácidos levulínicos y fórmico, también son reacciones importantes catalizadas por ácidos, los cuales sin embargo requieren ácido concentrado y altas temperaturas. Véase la figura N° 2.2. (5)



Reacciones de los azúcares en presencia de ácidos minerales concentrados; Los pentosas (R=H) dan furfural, las hexosas (R=CH₂OH) dan hidroximetilfurfural

FIG. 2.2 a



La degradación de hidroximetilfurfural, libera ácido fórmico. Luego sufre rearrreglo hacia ác. levulínico, el que es lactonizado

FIG. 2.2 b

2.5.2. La Influencia de los Alcalis (5)

En soluciones débilmente alcalinas las aldosas y cetosas sufren rearrreglos. Un ejemplo de esto es la transformación de Lobry de Bruyn - Alberda Van Ekenstein, de las aldosas (fig. 2.3). Esta reacción comienza con la enolización de la aldosa a un 1,2 enodiol, el cual puede ser convertido a una de las dos aldosas c-2 epímeras o a una cetosa, la cual puede sufrir epimerización. Los ácidos aldónicos también son epimerizados por álcalis especialmente en soluciones de piridina.

Los álcalis fuertes convierten los monosacáridos, así como los grupos terminales en los polisacáridos, a varios ácidos carboxílicos. Los polisacáridos constituídos de 1 a 4 unidades, incluyendo a la celulosa y la mayoría de las hemicelulosas, son degeneradas por un mecanismo de extremo libre, conocido como la reacción de "descascarado"(peeling). Esta reacción se presenta durante los procesos de pulpeo y blanqueo, por ejemplo en el pulpeo Kraft y blanqueo con oxígeno. El mecanismo de reacción es esquematizado en la figura N°2.4. La degradación comienza con la isomerización del grupo terminal a una cetosa en la cual el enlace glucosídico está en posición β con respecto al grupo carbonilo. Ya que tal estructura es débil en álcali, el enlace glucosídico es roto con la remoción del grupo terminal. Esto se denomina " β alcoxieliminación", el grupo terminal eliminado es tautomerizado dicarbonílico el cual sufre

un rearrreglo del tipo ácido bencílico a un ácido isosacarínico. Además una cierta cantidad de otros ácidos se forman mediante mecanismos de competencia. En el pulpeo Kraft las moléculas de celulosa están sujetas a este "pelado sin fin" (endwise peeling), del cual resulta una pérdida de acerca 50 unidades de glucosa de una molécula simple. El proceso de desmembramiento se termina por una reacción bastante comentada llamada reacción de paralización, que incluye a una β - hidroxieliminación directa de la posición del C-3. El grupo final sufre un rearrreglo tipo ácido benzílico hacia un grupo ácido terminal metasacarínico, estable en álcali. Sin embargo se forman también otros grupos terminales. fig.n 2.5.

La ruptura de los enlaces glucosídicos por lo general es extremadamente lenta en comparación con la hidrólisis catalizada por ácidos. Un mecanismo sugerido para esta reacción se muestra en la fig. N° 2.6. (5)

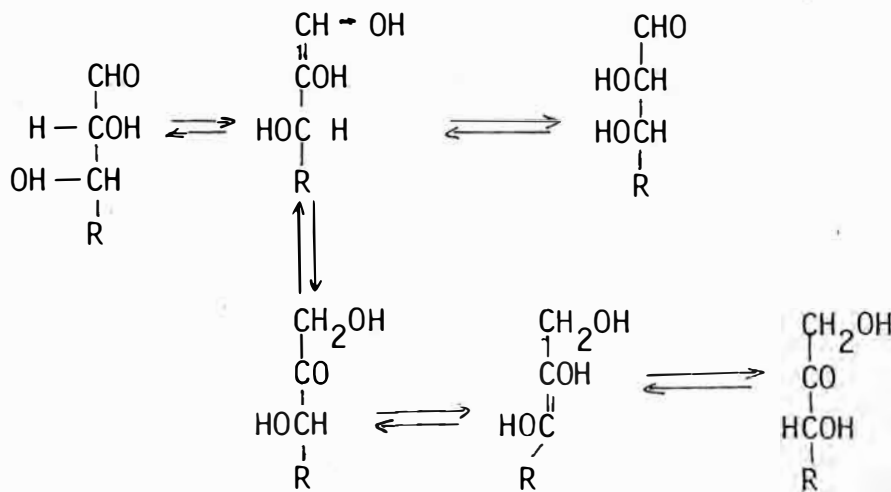


Fig. 2.3. Rearreglo de aldosas y cetosas en álcalis débiles

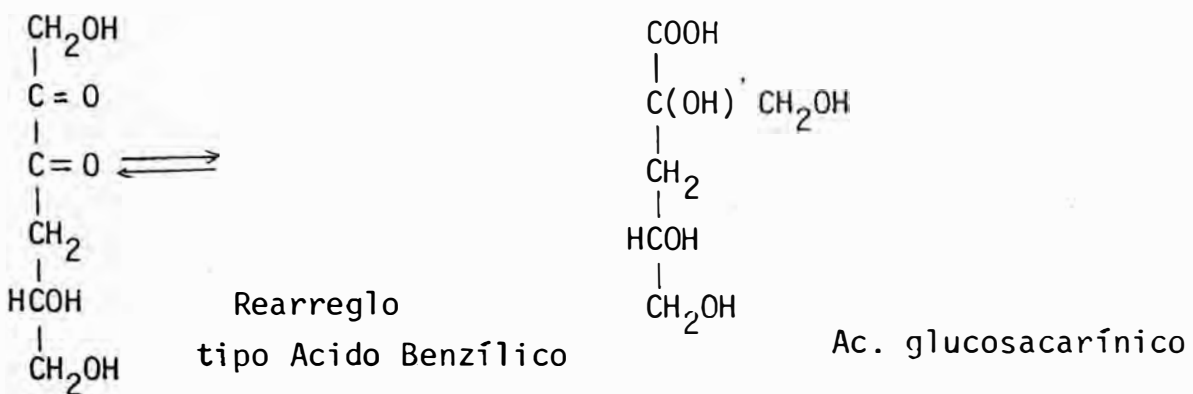
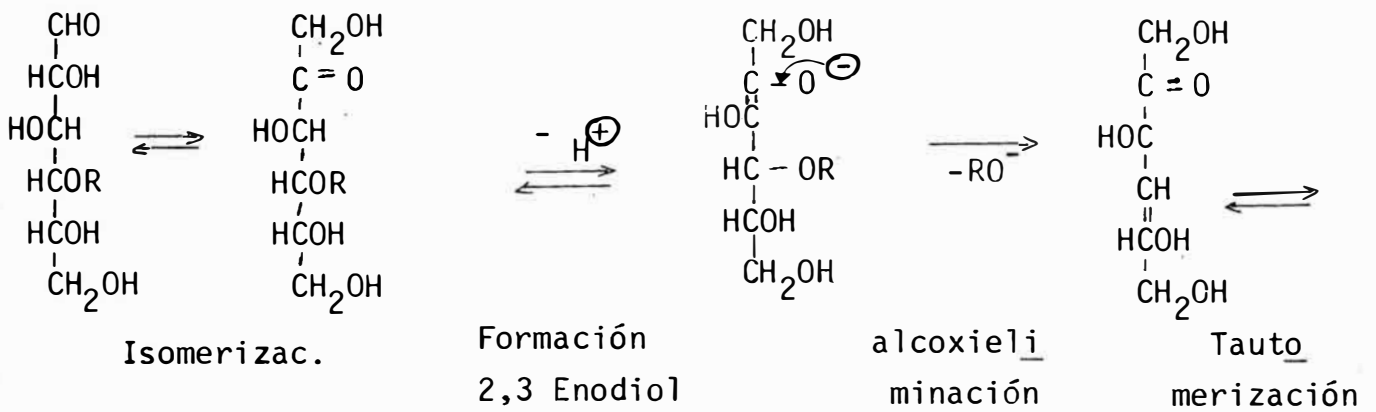


Fig. 2.4. Degradación de la celulosa durante el pulpeo

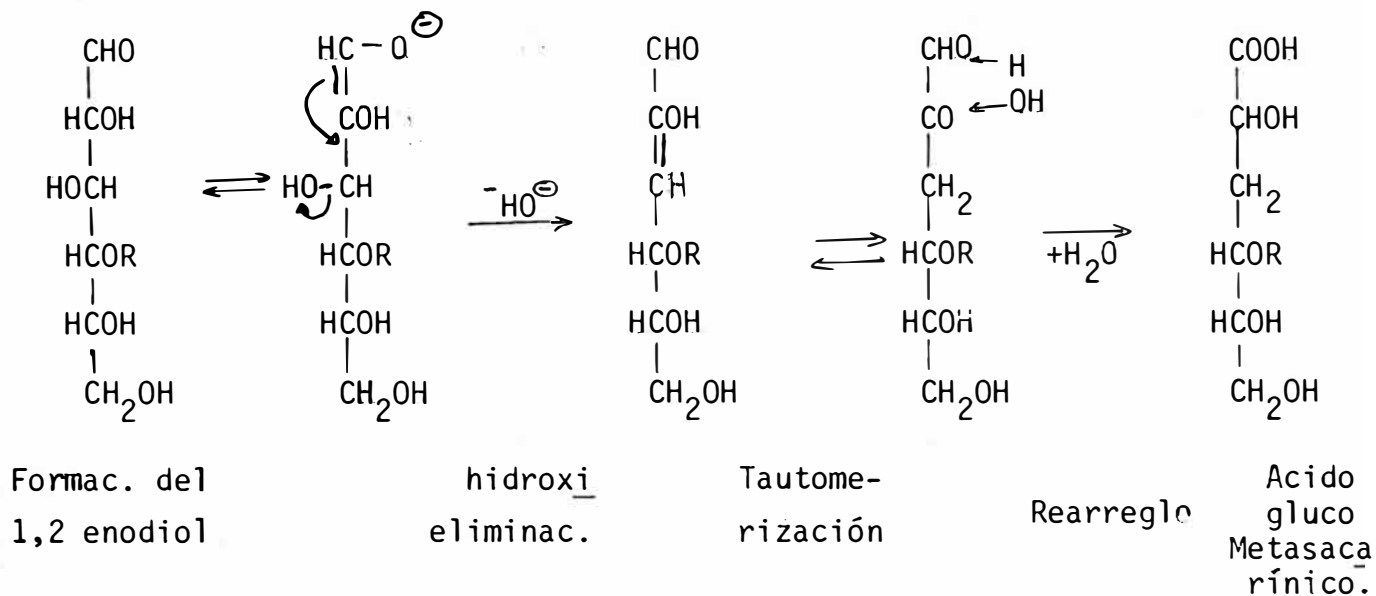


Fig. 2.5. Reacción de finalización de la degradación de celulosa.

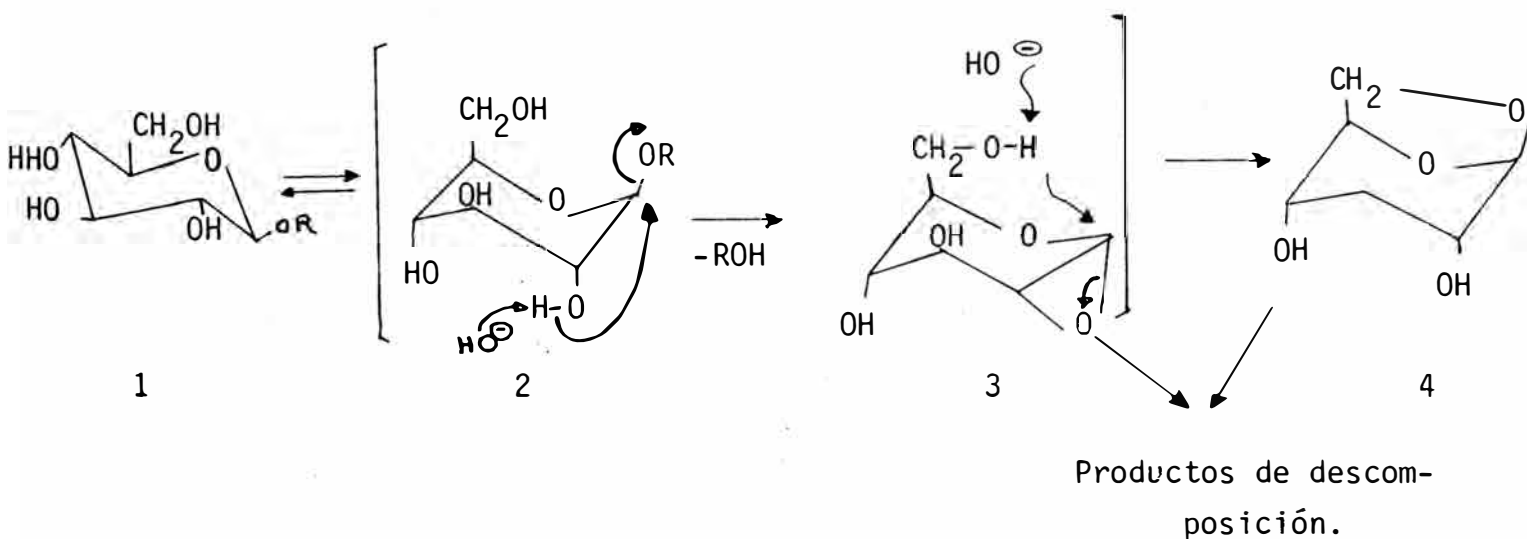


Fig. 2.6. La hidrólisis de B-D-glucopirano \acute{s} idos (R es un residuo carbohidrato u otro sustituyente). La reacción comienza con una reorientación de los grupos oxidrilos ecuatoriales, hacia posiciones axiales. Después de la formación de un anillo oxirano (3), el enlace glucosídico es roto, dando lugar a diferentes productos de descomposición, ya sea directamente o por la vía de un intermedio levoglucosano.

CAPITULO III

3.- ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

3.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA SACARIFICACION DE MADERA

Las dificultades encontradas en la hidrólisis de la madera se deben a dos razones fundamentales:

La estructura cristalina de la celulosa, que presenta estructuras secundaria y terciaria. (1) (2)

El sello de lignina alrededor de la fibra, que a su vez está químicamente unida a la celulosa por puentes etéricos.

(5).

En el proceso hidrolítico, la proporción relativa de celulosa, hemicelulosa, y la cantidad de lignina, determinarán el curso de la hidrólisis y el rendimiento en azúcares reductores.

La hidrólisis de la celulosa comprende dos reacciones, una reacción de primer orden que da lugar a una ruptura de los enlaces de celulosa para producir una serie de azúcares, seguida por otra reacción de primer orden en la cual los azúcares sufren degradación.

El rendimiento en azúcar, es por tanto, gobernado por las velocidades relativas de formación y descomposición de ésta. Siendo una molécula reactiva, el azúcar se descompone a medida que es formado. Bajo determinadas condiciones, estas velocidades son aproximadamente iguales para un carbohidrato cristalino como es la celulosa (no ocurre así para

el almidón y la celulosa amorfa). De este modo el rendimiento máximo de azúcares se ve limitado y el hidrolizado puede ser contaminado con cantidades apreciables de productos de degradación. Este efecto se constituye en el mayor problema para la producción de azúcares a partir de madera.

3.2. AVANCES DE ESTUDIOS E INVESTIGACIONES

Las condiciones de concentración de ácido y temperatura de reacción necesarias para realizar la reacción en un tiempo razonable, descomponen una buena parte de los azúcares resultantes, a esto se debe la existencia de pocas alternativas para realizar la hidrólisis:

Hidrólisis con ácido diluido, la que se realiza sin separación del producto, o con una separación continua a medida que es formado a través de un proceso de percolación, aumentando así el rendimiento.

Hidrólisis con ácido concentrado, en la cual la estructura cristalina de la celulosa es destruida, los carbohidratos son solubilizados y finalmente hidrolizados con ácidos diluidos.

Todos los procesos existentes caen en una de las categorías mencionadas.

Actualmente se desarrollan grandes esfuerzos para realizar industrialmente el proceso de la hidrólisis enzimática de la madera, el que se encuentra en la etapa de investigación básica a nivel de laboratorio. (7).

3.2.1. Procesos que emplean Acidos Diluidos

El proceso de hidrólisis de una sola etapa fue el primer método comercial para la producción de azúcares a partir de madera, pero su limitación es el bajo rendimiento en azúcares. (14) (18) (19)

En la sacarificación por percolación la madera es colocada en un recipiente resistente a los ácidos, bajo presión, e hidrolizado con ácido sulfúrico diluido (1%), introducido por la parte superior del digestor y retirado a través de un filtro en la parte inferior. De este modo la producción de azúcar y su extracción son realizados simultáneamente. La solución ácida de azúcares es retirada y enfriada lo más rápidamente posible para impedir su descomposición. La solución es neutralizada con CaO ó con Ca CO_3 , no habiendo recuperación del ácido utilizado. (17).

(Ver tabla N° 3.1. Características de las plantas que emplean procesos de ácidos diluidos). (7)

3.2.2. Procesos que emplean Acidos Concentrados

Estos procesos se caracterizan por el uso de cantidades relativamente grandes de ácido que solubilizan la celulosa por la ruptura de los enlaces que la mantienen en estado cristalino, que la tornan extremadamente resistente a la hidrólisis directa con ácidos diluidos.

Después de la solubilización e hidrólisis parcial,

TABLA N° 3.1. CARACTERISTICAS DE LAS PLANTAS QUE EMPLEAN PROCESOS DE ACIDOS DILUIDOS (20)

PROCESO	LOCALIZAC.	CAPACIDAD ANUAL 10 ⁶ l	CONDICIONES PRINCIPALES DE HIDROLISIS				CONC. DE LA SOLUC. DE AZUCAR	REND.PRAC. EN AZUCAR Kg/ madera seca	REND.PRAC. EN ALCOHOL ABSOLUTO 1/TON MAD.
			ACIDO	TIEMPO HORAS	TEMPERAT. °C	PRESION Kg./cm ²			
CLASSEN	HATIESBURG EUA - 1900	-	SO ₂ Sat.	4 a 6	140-150	7	-	175 - 225	75 - 83
CLASSEN MODIFICADO	CHICAGO EUA - 1900	-	SO ₂ gas.	1	140-150	7	5 - 6	242	81
AMERICANO	GEORGETOWN EUA - 1913	2.0	H ₂ SO ₄ a 0.5%	1	140-150	7	-	-	64
"	FULLERTON EUA - 1916	-	H ₂ SO ₄ a 0.5%	1	168	8.4	-	240-260	140-150
	TORNESCH ALEMANIA 1931	2.0	H ₂ SO ₄ a 0.8%	20	Inic.129 Final 190	Inic.2.5 Final 12.7	3 - 4	500	190-228
SCHOLLER	HOLZMINDEN ALEMANIA 1937	4.1	H ₂ SO ₄ a 0.5%	10-14	Inic. 130 Final 170	Inic. 2 Final 10	3.5 - 4	-	205
	EMS SUIZA 1937-1954	7.5	H ₂ SO ₄ a 0.5%	12	-	-	4	450-500	202-207
MADISON	SPRINGFIELD EUA - 1946	11.3	H ₂ SO ₄ 0.5%-0.6%	6	Inic. 153 Final 185	Inic. 4.2 Final 12	5	-	208-232
	WILSON-DAM EUA 1945 - 1947	PILOTO	H ₂ SO ₄ a 0.5%	4.75	Inic. 135-149 Final 191-193	Inic. 4.2 Final 15.8	5	430	-

se puede completar la hidrólisis con ácido diluido (post-hidrólisis).

Todos realizan una prehidrólisis para remover la fracción de hemicelulosa. En la etapa de hidrólisis principal operan a presión atmosférica y a temperatura por debajo de 100°C. La principal diferencia entre éstos está en el ácido y sistema empleados para su recuperación.

Con excepción de unos pocos, todos tenían como objetivo la producción de azúcar cristalizado (dextrosa y xilosa).

En el cuadro N° 3.2 están resumidas las principales características de los procesos que emplean ácidos concentrados.

3.3. ALTERNATIVAS DE PROCESO

Describiremos con más profundidad los métodos que emplean ácido sulfúrico concentrado. Ya no mencionaremos los procesos que emplean ácidos diluidos ya que tienen bajos rendimientos en alcohol y se llevan a cabo en condiciones energéticas de presión y temperatura, no reproducibles en pruebas sencillas de laboratorio. Así también ya no mencionaremos los procesos que emplean ácido clorhídrico ya que uno de los inconvenientes en éstos, es el manejo del HCl, que requiere de materiales muy resistentes a la corrosión del HCl gaseoso. Se necesitan también evaporadores y columnas de destilación especiales para este ácido, otra de las desventajas es su producción por electrólisis de Na Cl. (7)

Es necesario mencionar además que entre los procesos que se van a describir, algunos no han tenido un nivel industrial. En otros la información técnica presentada en la literatura es insuficiente para avalar las diversas etapas de la hidrólisis.

3.3.1. El Proceso Hokkaído Mokuzai-Kagaky (1962) (7).

Conocido como el proceso Hokkaído, se desarrolló a nivel de planta piloto en el Japón en el año de 1962, con la finalidad de aprovechar las grandes reservas forestales de maderas frondosas de pequeñas dimensiones y aserrín de coníferas existentes en la isla del mismo nombre.

La madera en forma de trozos es pre-hidrolizada con vapor a 180-185 °C, o con ácido sulfúrico de 1.2-1.5 % a 140 - 150 °C, dependiendo si se desea la producción de furfural o xilosá respectivamente. La madera pre-hidrolizada es seca da, finamente molida, y entonces hidrolizada con H_2SO_4 de 80% a temperatura ambiente, introduciendo una cantidad de madera y ácido juntos al reactor. La relación de madera: ácido debe ser de 1:0.9 y el tiempo de contacto de apenas 30 segundos. El producto es inmediatamente filtrado a presión y lavado.

En esta etapa, la concentración de ácido es de cerca de 30-40 %. La solución de azúcar es tratada por diálisis, mediante una membrana de intercambio iónico, recuperándose el 80% del H_2SO_4 . El ácido es concentrado hasta 80%, completado y reutilizado.

La solución de azúcar después de la diálisis, que contiene de 5 a 10% de azúcar y de 5 a 15% de H_2SO_4 , es neutralizada con cal, filtrándose el sulfato de calcio formado. Ajustado el pH a 2.5, la solución de azúcar es concentrada hasta 50-60% y entonces es separada en forma de una sal doble por la adición de NaCl en la cantidad teórica. La glucosa es obtenida en forma cristalina después de un lavado con agua fría.

El rendimiento es de 280-290 Kg de glucosa por tonelada de madera seca.

3.3.2. El Proceso Giordani - Leone (7)

Este fue empleado en Italia durante la II Guerra Mundial (1948). En la primera fase la madera es tratada con H_2SO_4 al 2%, a $135^{\circ}C$ durante media hora, en una autoclave recubierta de aislante. Debido al rápido tratamiento con ácido, solamente la pectina, pentosas y parte de las hemicelulosas son solubilizadas, dejando intacta toda la celulosa, lignina y hemicelulosa remanente. De cada 100 Kg de madera seca se obtienen de 2 a 3 lt de furfural y casi 500 l de una solución que contiene de 5 a 6% de azúcares reductores. El residuo contiene 30% de líquido ácido.

Una segunda fase deja seguir el residuo a $80-100^{\circ}C$ durante 12 horas con la finalidad que la celulosa se transforme en HIDROCELULOSA más fácilmente atacable.

En la tercera fase se trata la mezcla de lignina-hi-

TABLA N° 3.2 CARACTERISTICAS DE LAS PLANTAS QUE EMPLEAN PROCESOS DE ACIDOS CONCENTRADOS (20)

PROCESO	LOCALIZAC.	CAPACIDAD	CONDICIONES PRINCIPALES DE HIDROLISIS			CONC. DE AZUCAR %	REND. AZUCARES FERMENT. Kg/T	REND. PRACT. ALCOHOL Lt/T	RECUPERAC DEL ACIDO
			A C I D O	TIEMPO HORAS	TEMPERAT. °C				
GIORDANI LEONE	ITALIA II GUERRA M.	-	H ₂ SO ₄ a 77%	15	80-100	10	-	300	-
RHEINAU	ALEMANIA 1932 - 1938	400 t/mes Azúcar	HCl a 41%	40	20	10-15	595	310-350 (BERGIUS)	Dest. Vacío e Interc. Ionico
UDIO - RHEINAU	SUIZA 1950 - 1960	1,200 t/año madera S.	HCl a 41%	3	20	10	580-600	Solam. Produc. Azúcar	Dest. a vacío
HOKKAIDO	JAPON 1962 (PILOTO)	5 t/día de madera S.	H ₂ SO ₄ a 80%	1	20	5-20	550		Interc. Ionico (Diálisis)
MOKUSAI KASEI	JAPON 1962 (PILOTO)	-	HCl conc.	1.5-2.5	20	-	545		HCl gaseoso
NOGUCHI CHISSO	JAPON 1962 (PILOTO)	1 t/día de mad.seca	HCl gas.	1	40	30	590		Dest. a vacío

drocelulosa con ácido concentrado de 77%, adicionándosele en frío poco a poco sobre el material sólido. Terminada la operación que dura aproximadamente 3 horas, la solución es mezclada con la anteriormente obtenida, dando como resultado una solución que contiene 15 a 20% de ácido y 10% de dextrina y azúcares reductores.

En la cuarta etapa se hierve durante 2 horas a 100°C la solución obtenida. La dextrina obtenida de la hidrocélulosa se transforma en un monosacárido.

En una quinta fase se recupera eventualmente el ácido sulfúrico, precipitándolo en forma de sulfato cálcico, y un tratamiento posterior con carbonato de sodio, descomponiéndose el sulfato para obtener anhídrido sulfuroso. Se puede recuperar de este modo hasta el 97% del ácido.

La sexta fase consiste en la fermentación del líquido azucarado, obteniéndose un rendimiento de más de 30 l de etanol absoluto de cada 100 Kg de madera seca.

3.3.3. El Proceso de Nueva Zelanda (1981) (8)

Este proceso forma parte de una serie de experimentos llevados a cabo en la Universidad de Auckland, a nivel de laboratorio. Como materia prima emplearon aserrín de pino (*pinus radiata*), cuya granulometría corresponde a 86.8% de malla +20 ASTM (0.85 mm) y una humedad de 45 a 55%. El aserrín fué impregnado por un tiempo menor que una hora con ácido sulfúrico al 80%, teniendo una relación

ácido a madera de 6/1 (en base a madera seca). Luego es diluído a 10 veces el volumen y a continuación es hervido aproximadamente 1.5 horas. De este modo se obtienen aproximadamente un 90% del total de azúcares reductores obtenibles en la madera, que a su vez corresponde a un 53% del peso de madera seca.

Esta investigación no incluye la evaluación de la fermentabilidad de los productos de la hidrólisis.

3.3.4. El Proceso de la Universidad de Purdue (1980) (2)

Por muchos años los investigadores del laboratorio de Ingeniería de Recursos Renovables (LORRE) han investigado las técnicas de producción de alcohol combustible a partir de la biomasa en general, y el bagazo de caña de azúcar en particular.

El bagazo sin reducción de tamaño es alimentado en un horno cilíndrico horizontal, el que gira a baja velocidad. El ácido sulfúrico es adicionado en una cantidad tal que la concentración global sea del 1%. Así mismo, la humedad resultante debe ser de sólo el 50%, teniendo una apariencia seca. Los sólidos son calentados por aire caliente entre 90 y 100°C, sin adición de agua. Esta técnica de hidrólisis ha sido denominada "tostado" (roasting). Con un tiempo de residencia de dos horas, la hidrólisis se detiene al tener un rendimiento de alrededor de cuatro partes de azúcar soluble por cada parte de

H_2SO_4 adicionado, bajo estas condiciones no hay formación de furfural. Debido al bajo contenido de humedad puede obtenerse un hidrolizado acuoso con mas de 25% en peso de azúcares solubles si el lavado se realiza con la solución de glucosa reciclada de la hidrólisis de la celulosa.

Casi un 80% de los monosacáridos obtenidos de la hemicelulosa es xilosa, la cual no es fermentable por la levadura cervecera común. Después de un tratamiento por una enzima relativamente barata llamada xilosa isomerasa (conocida comercialmente como glucosa isomerasa), la xilosa es convertida en xilulosa, la que sí puede ser fermentada por la levadura cervecera para la producción de etanol. La mezcla de glucosa proveniente del reciclaje y xilosa de la hemicelulosa serían alimentadas en una columna inmobilizada de glucosa isomerasa, y luego en un fermentador con levaduras para la producción de etanol. Se ha calculado un rendimiento de 350 lt. de alcohol por tonelada de material alimentado.

El residuo lignocelulósico sólido es exprimido a presión hasta un 40% de humedad, la que es reducida mediante un secado a baja temperatura hasta un 35%. Este residuo es tratado con ácido sulfúrico al 82%, el que a modo de solvente disuelve la celulosa, superando las barreras de la estructura cristalina de la celulosa y el sello protector de lignina que rodea las fibras.

Después del tratamiento con el solvente, un 80% de la celulosa disponible es rápidamente hidrolizada (10 minutos) a baja temperatura (95 a 100°C). A la mezcla que ha reaccionado se le agrega agua, obteniéndose una solución ácida de glucosa diluída. (Nótese que no menciona una post-hidrólisis).

Aún no han propuesto un método práctico para la recuperación de H_2SO_4 a nivel industrial. Puede suponerse que la solución ácida de glucosa diluída, es reciclada y empleada en la extracción de xilosa por lavado, y luego neutralizada antes de su fermentación.

El alcohol proveniente de la fermentación es concentrado hasta un 92% a 95% mediante una destilación convencional. Ellos proponen una deshidratación convencional por destilación azeotrópica, una extracción mediante materiales celulósicos en columnas de absorción, o en una extracción de múltiples etapas en contracorriente con gasolina pura para la producción de gasohol (10% de alcohol).

CAPITULO IV

4.- FERMENTACION

4.1. Definición.- La fermentación es un proceso a través del cual los microorganismos, desencadenan cambios específicos, dependiendo ello de la solución para fermentación, identificación y pureza de la población microbiana y factores de incubación, T° y aire.

La fermentación como proceso unitario, comprende etapas que son semejante a los Procesos de Síntesis Química Corriente. Exceptuando la intervención de un sistema biológico, las materias primas necesarias para los diversos procesos de fermentación son similares y el producto particular es función de la selección efectuada por el propio microorganismo. (9)

4.2. Clases de Fermentación.- (9)

4.2.1. Fermentación Aeróbica

Tal como su nombre lo indica requieren el empleo de cantidades de oxígenos (del aire) substanciales los microorganismos aeróbicos no son capaces de proliferar en sistemas anaeróbicos y la solubilidad limitada del oxígeno en el agua (7PPm a 37°C) impide la absorción inicial de suficiente oxígeno disuelto para satisfacer las necesidades de los organismos. En la fermentación a gran escala las condiciones aeróbicas se consiguen inyectando aire estéril finamente dispersada de modo que exista una gran superficie para

transferencia de oxígeno. El aire estéril se consigue pasándolo a través de filtros estériles rellenos de lana de vidrio o carbón. Durante este proceso se genera, bióxido de carbono y agua, de acuerdo a la siguiente reacción:

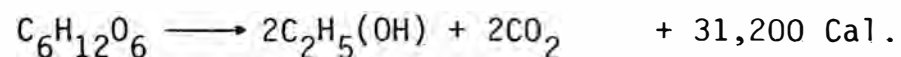


En este proceso la multiplicación de las levaduras es más rápida y la cosecha de células es mayor en condiciones aerobia que anaerobias (54,000 cal.) dado a que la elaboración de los constituyentes y estructuras protoplasmáticas, gemación y otras actividades vitales necesitan energía, es patente que las condiciones aerobias favorecen el crecimiento celular extenso y rápido.

4.2.2. Fermentación Anaeróbica.-

La fermentación anaeróbica se caracteriza por la ausencia o poca cantidad de oxígeno, presente durante el proceso fermentativo.

La fermentación anaeróbica es relativamente sencilla, el medio estéril contenido en un fermentado también estéril se inocula con el organismo apropiado, el organismo se multiplica rápidamente y la fermentación comienza de acuerdo a la siguiente reacción:



La cantidad de calor desprendida se disipa por enfriamiento adecuado mediante serpentines o rociadores en el fermentador. (9)

4.3. Levaduras.- (15)

4.3.1. Definición.- Son microorganismos eucarióticos simples que poseen núcleo organizado y la presencia de membrana nuclear; se les observa en forma ovoide esférica, elipsoide, apiculada, etc. y acusan dimensiones que varían en atención a la especie, a la edad de la célula y otros; por lo general las levaduras utilizadas en la industria de las fermentaciones tales como Cervecerías, Forraje, Alimentación, etc. presentan dimensiones que oscilan entre 3-6 μ de ancho y largo respectivamente.

4.3.2. Estructura de las Levaduras.-

Estructuralmente una levadura consta de las siguientes partes:

1) Membrana Celular o Pared Celular.- Desde el punto de vista bioquímico está constituido por 2 importantes polisacáridos: Glucan y Mannana, homopolímeros de la glucosa y la manosa respectivamente, su función es de regular el paso de alimentos nutricionales al citoplasma mediante la acción de enzimas tales como fosfatasas, proteasas, invertasas y otros sobre los polisacáridos del medio para convertirlos en disacáridos y mo-

nosacáridos capaces de atravesar la membrana citoplasmática.

2) Citoplasma.- Constituido por una membrana celular, que regula la entrada y salida de los solutos moleculares de la célula y presentan enzimas que metabolizan la lactosa y la furanosa como las permeasas transportándolas al formar complejos fácilmente dissociables con ellos, se hallan presente también los gránulos metacromáticos vacuolas, mitocondrias (sistema respiratorio) etc. Esta última es la que gobierna las condiciones de crecimiento principalmente el requerimiento de oxígeno y glucosa, una deficiencia de los mismos genera una baja concentración de enzimas mitocondriales y por ende una baja en la capacidad respiratoria.

3) Núcleo.- Se caracteriza por presentar una membrana nuclear, dentro del cual se encuentra el centrosoma y los centriolos; su forma puede ser ovoide, elipsoide, apiculada, etc.

4) Enzimas.- Son moléculas proteicas más numerosas y especializadas ya que catalizan las reacciones químicas que constituyen el metabolismo intermedio de las células e intervienen en el desdoblamiento y transporte de los alimentos tomados del medio.

Se caracterizan por su alto grado de especificidad, razón por las cuales actúan sobre un número muy limitado de sustancias; se encuentran en diferentes partes de la célula; las enzimas de la respiración están en las mitocondrias.

Se les designa añadiéndole el sufijo "asa" al nombre del sustrato, es decir de la molécula sobre la cual la enzima ejerce su acción catalítica. Ej. la fosfatasa cataliza la hidrólisis de los ésteres fosfóricos. Algunas enzimas dependen su actividad de "Cofactores" que bien pueden ser un ión metálico o una molécula orgánica compleja llamada "coenzima"; a veces son necesarios ambos. (11)

4.3.3. Factores de Crecimiento.- (12)

- 1) Vitaminas.- Son los factores determinantes en ciertas vías metabólicas para el crecimiento de las levaduras cerveceras. Estos factores de crecimiento son activos en concentración muy baja entre los cuales tenemos: Tiamina, Biotina, Inositol, Piridoxina, Acido Pantoténico y Niacina. La *Saccharomyces carlsbergensis* tiene al Inositol como un factor limitante del consumo de glucosa ya que este regula el consumo de oxígeno necesario para la combustión de glucosa, y por ende del crecimiento y de la fermentación. La Biotina, más activa que el Inositol, es un fac

tor limitante del crecimiento y fermentación anaeróbica; los requerimientos vitamínicos de las levaduras dependen de la temperatura a la cual el crecimiento y la fermentación se llevan a cabo.

- 2) Agua.- En términos generales las levaduras necesitan un poco más de agua que los "mohos" pero menos que las bacterias. Algunas especies crecen en medios que contienen incluso 40 x 100 de agua. Por ejemplo: Miel y Jalea. El agua es el vehículo por el cual las levaduras obtienen alimentos y eliminan productos de desecho.
- 3) P.H.- Crecen en límites amplios de P.H.; muchas especies se multiplican en soluciones con acidez de pH 3 y Alcalinidad a pH 7.5. La reacción óptima suele localizarse entre pH 4.0 - 5.8. Las enzimas ejercen su actividad máxima a un pH óptimo y desciende de ambos lados del óptimo, de este modo el control del pH, es importante para la función celular. El gradiente de concentración de iones hidrógeno intracelular junto con el potencial eléctrico de la membrana determina la fuerza motora de protones que dirigen las reacciones de la membrana. Un Δ pH puede afectar la composición de la membrana. (16).
- 4) Temperatura.- No hay crecimiento a T° inferiores a la de congelamiento ni tampoco a temperatura

superior a 47°C, la T° mas adecuada suele ser entre 20-30°C; la incubación a 30°C, suele ser satisfactoria dado que el efecto inhibitorio de los productos tóxicos de desecho que se acumulan al medio aumentan con la temperatura a la vez que se produce la desnaturalización proteínica disminuyendo la actividad enzimática. La velocidad específica de crecimiento varía con la temperatura de acuerdo a la Ecuación de Arrhenius con un rango de temperatura dado

5) Oxígeno.- Elemento vital para las reacciones de oxidación que generan la energía necesaria para la elaboración de los constituyentes y estructuras protoplasmáticas, gemación y otras actividades vitales. La cantidad de oxígeno determina el tiempo de fermentación, en condición aeróbica multiplicación de levaduras y anaeróbica mayor producción de alcohol.

6) Sustancias Orgánicas e Inorgánicas.- Para el crecimiento microbiano; indispensables para la regulación de la presión osmótica, para la acción enzimática y para mantener el equilibrio de la membrana. Los nucleos deberán contener sales de algunos de los siguientes metales:

Na, K, Fe, Cu, Cl, NH_4 , SO_4 , y PO_4 , así como huellas de algunos otros metales como: Zn, Co, Mo, V, etc.

Los materiales orgánicos pueden funcionar como fuen

te de Carbono o Nitrógeno o ambos y como fuentes de energía. Las fuentes de carbono más comúnmente utilizados son: glucosa, maltosa, sacarosa, ácidos grasos, etc.; de Nitrógeno; NH_3 , NH_2 , NO , NH_2OH y Aminó xidos.

4.3.4. Clasificación de Levaduras.- (15)

Desde un punto de vista práctico se dividen:

- a) Levaduras Superficiales.- Se extienden uniformemente en el mosto, no sedimentan, producen abundante gas desde el principio, son de fermentación alta, aparecen generalmente en mostos ricos en glúcidos. Ejem.: "SACCHAROMYCES CEREVISIAE".
- b) Levaduras de Fondo.- Sedimentan en el fondo, es decir, no desarrollan en la superficie, son de fermentación baja, crecen especialmente en mostos ricos en prótidos. Especie: "SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS".

4.3.5. Fases del Crecimiento Celular.- (12)

Las curvas de población bacteriana se precisan al inocular un número pequeño de microorganismos en un medio de cultivo y contar las bacterias en muestras obtenidas a intervalos de tiempo.

- 1) Fase de latencia.- Fase Lag o de aumento de tamaño de las células. Es una fase de adaptación de los microorganismos al nuevo medio de cultivo, la actividad metabólica a la acción nociva de los agentes fí-

sicos y químicos.

Esta fase se anula empleando un inóculo en fase logarítmica. Los factores que influyen en la duración de esta fase son: naturaleza del inóculo y medio de inoculación.

2) Fase Logarítmica o Fase de Crecimiento Exponencial.-

Durante este período la división celular ocurre rápidamente con velocidad constante; ésta varía entre los diferentes microorganismos debido a los siguientes factores:

- Temperatura de Incubación.- La velocidad de división **celular** está en relación con la actividad química de las células y la velocidad de las reacciones químicas, aumenta a medida que aumenta la temperatura, la multiplicación celular aumenta a medida que lo hace la temperatura pero dentro de ciertos límites.

- Concentración de Nutrientes.- En el medio de cultivo a veces rige el índice de multiplicación, esto sucede cuando se le añade fuentes de energía de fácil utilización. Ej.: carbohidratos fermentables.

- La acumulación de productos de desechos alcohólicos. Ej.: alcoholes y ácidos.

- El pH desfavorable .

3) Fase Estacionaria.- Al final de un cierto tiempo variable con la naturaleza del microorganismo y condiciones de cultivo, la velocidad de crecimiento dismi

nuye hasta llegar a la fase en que el número de ger^umenes que nacen es igual al número de gérmenes que mueren.

Las causas de estas "Paradas de crecimiento" pueden ser:

- El acúmulo de metabolitos tóxicos.
- El agotamiento de nutrientes.
- El agotamiento de oxígeno.

4) Fase de declinación o muerte logarítmica.- La muerte de las células en un cultivo frecuentemente tien^ude a seguir una curva exponencial y esto ocurre por:

- Desaparición de nutrientes.
- Acumulación de toxinas.
- Modificaciones del medio de cultivo. Ej.: el pH.

Lo descrito anteriormente se refiere a un crecimiento en cultivo discontinuo en el cual el medio no es renovado, en este medio de cultivo es fácil de observar que desde el momento en que el medio es inoculado las condiciones comienzan a variar en forma progresiva.

Las curvas de población son naturales en la figura 4.1.

4.4. Estudios e Investigaciones:

Los estudios realizados se han hecho comparativamente con las fermentaciones de caña de azúcar ya que una fermentación de solución sacarificada de celulosa no es muy diferente de la fermentación convencional debiendo usar los mismos tipos de equipos, una diferencia principal es tal vez la concentra

ción de azúcar del mosto que debiera ser menos. Algunos procesos consiguen una solución más concentrada como UDIC-RHEINAU y algunos procesos japoneses o como el proceso MADISON que da soluciones diluídas de 4-5%, menores a las usadas en la fermentación de caña de azúcar que son a veces superiores al 12%.

Cualquier proceso que produzca concentraciones de azúcar alta tendrá que ser diluída para disminuir el efecto de las sustancias tóxicas formadas durante el proceso y las que contiene la madera. **Muchas** de las investigaciones llevadas a cabo sobre hidrólisis de madera han sido conducidas con el propósito de obtener una máxima economía en el rendimiento de alcohol y que no son fácilmente fermentables, sin embargo, investigaciones realizadas en Estados Unidos se encaminan a desarrollar un pretratamiento que de un mosto más fácilmente fermentable y a un proceso de fermentación para dar una más rápida conversión de azúcar, esto es debido a que los hidrolizados de E.U. son más difíciles de fermentar que los de Alemania y otros, la mayor toxidez de las maderas y el proceso empleado contribuyen a acrecentar el problema.

El método de "tostado" minimiza la formación de sustancias tóxicas e inhibidores, usando un pretratamiento y parámetros de condiciones menos rígidas comparadas a la del proceso "MADISON" que usa temperatura de 140°C dando como resultado la descomposición de azúcares y formación de furfural, elementos tóxicos para la fermentación.

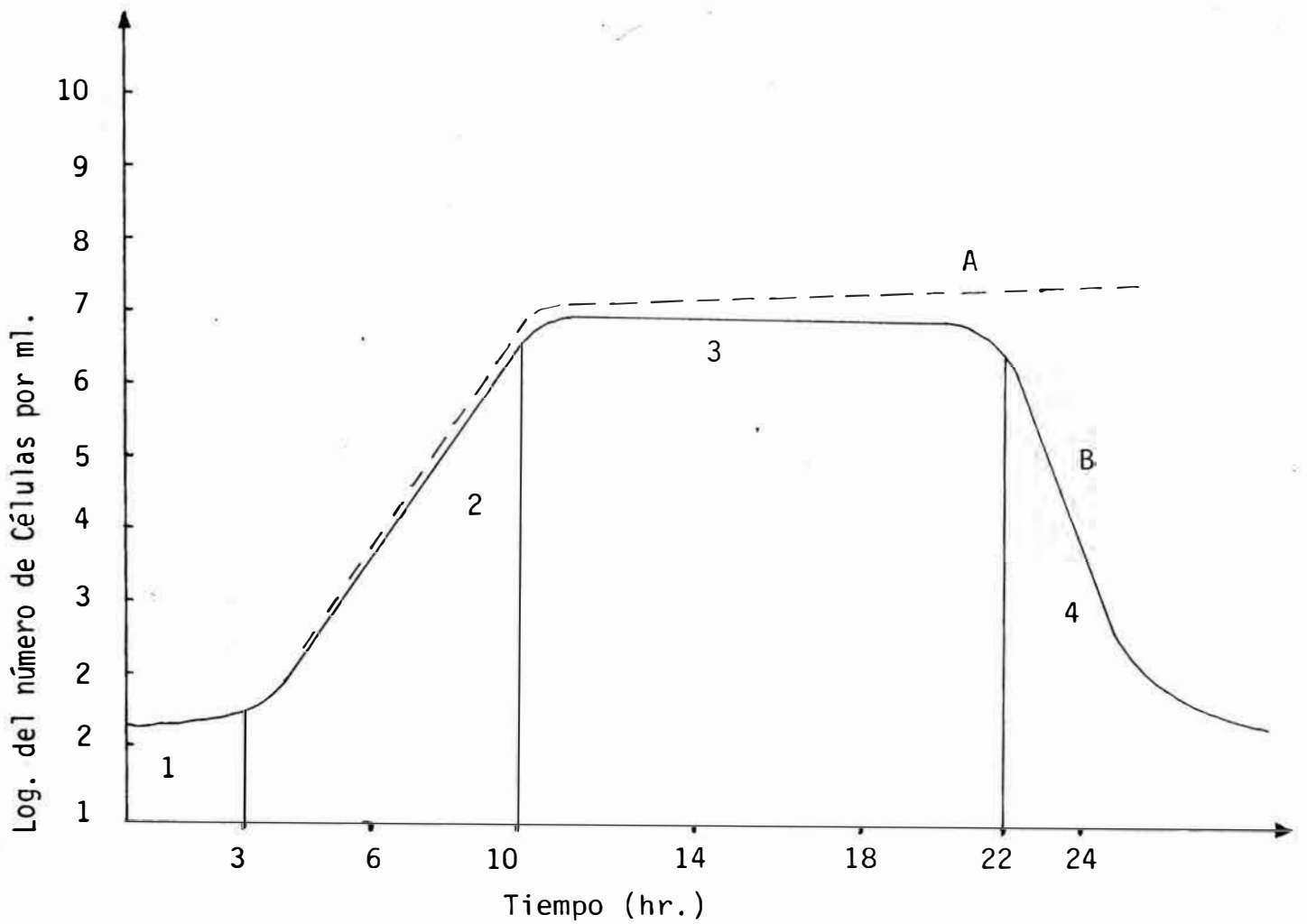


FIG. 4.1 Curvas de población obtenidas de recuento de bacterias en un cultivo a intervalos después de Inoculación.

Curva A (total de células vivas más muertas). Curva B solo Células vivas:

- 1.- Fase de aumento de tamaño de las células
- 2.- Fase de multiplicación Logarítmica
- 3.- Nivel estacionario máximo
- 4.- Fase de muerte Logarítmica

4.5. Hidrolisado: (7)

4.5.1. Composición del hidrolisado.-

Independientemente del procedimiento utilizado, las sustancias contenidas en el hidrolisado pueden ser clasificadas en sustancias minerales y orgánicas. Estas sustancias se originan de la materia prima y las condiciones de hidrólisis; el proceso utilizado modifica apenas sus proporciones. La proporción de sustancias minerales en la madera varía según la especie, la edad y el origen; la presencia constante de magnesio, potasio y de ión fosfórico no perjudican la fermentación, a veces se encuentran aniones de halógenos y selenio que son bastante nocivos para la fermentación.

Los substratos orgánicos pueden ser azúcares y no azúcares. Entre los azúcares tenemos: pentosas (arabinosa y xilosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa).

Las proporciones varían dependiendo de la naturaleza de la madera y de las condiciones de hidrólisis. Los no azúcares tienen dos orígenes distintos: la madera y los procesos de hidrólisis y neutralización.

Una madera da origen a numerosos compuestos como:
Nocivos.- aldehídos: aldehído fórmico y aldehído etílico, ácidos grasos superiores: a partir de butílico.

Inhibidores.- Fenoles, taninos, flavonas y antocianinas.

Activan.- ácido para-aminobenzoico, en pequeñas cantidades, mejora el desenvolvimiento de la levadura.

Los procesos de hidrólisis y neutralización originan:

Hidrólisis: aldehídos: aldehído etílico, fórmico, furfural y metil-furfural; ácido fórmico.

vanilina: de la acción del ácido sobre la lignina.

Neutralización.- La neutralización destruye una parte de los azúcares con la formación de nuevos aldehídos. Como el pirúvico, acetona, ácidos láctico, acético y fórmico.

4.5.2. Tratamiento del Hidrolisado (7)

Debido a la acidez elevada y a la existencia de productos tóxicos una fermentación del hidrolisado no podrá ser realizada sin un tratamiento químico anterior.

La producción de alcohol comprende 2 fases distintas:

- a) Una reacción de sacarificación puramente químico.
- b) Una fermentación, operación bioquímica.

Entre estas 2 fases se hace necesario realizar un tratamiento rápido y simple para evitar la descomposición de los azúcares. Un tratamiento rápido y simple consiste en alcalinizar, filtrar y el agregado de nutrientes necesarios para la levadura.

El tratamiento siguiente se ha utilizado en el presente trabajo:

- Neutralización con Hidróxido de Calcio a 100°C y pH = 4-5.
- Filtración a esta temperatura.
- Evaporación al vacío a T = 80°C.
- Filtración a esta temperatura.
- Ajustar el pH con carbonato de calcio.
- Agregar nutrientes.

Este tratamiento se hace en función de minimizar las pérdidas de azúcar y la eliminación de sustancias tóxicas para que se consiga una fermentación rápida y eficiente aumentando el rendimiento global del proceso de hidrólisis

4.6. Factores que afectan la fermentación: (10)

1. Sustancias tóxicas.

Cuatro fuentes potenciales de sustancias tóxicas han sido encontrados:

- Equipos: Concentraciones tóxicas de metales resultan de la corrosión de los equipos.
- Descomposición de los carbohidratos: Los materiales po

tencialmente tóxicos de las sustancias orgánicas han sido divididos en tres clases: Terpenos, aldehídos y polihidroxi-aromático. Generalmente los terpenos han sido los más activos fisiológicamente sobre las levaduras, seguidos por los aldehídos y finalmente los polihidroxiaromáticos.

- Descomposición de la lignina.
- Extractivos de la madera y los productos de su descomposición.

Todos estos se precipitan por calentamiento o adición de sulfito de sodio.

2. Neutralización: La neutralización a pH superior a 7.5, ha originado descomposición de azúcares causando pérdidas de hexosas y pentosas, los hidrolizados, neutralizados a temperatura cerca de 100°C fueron más fácilmente fermentables que los de temperatura ambiente. Un posterior calentamiento aumenta esta facilidad de fermentación.
3. Sustancias reductoras: Permiten condiciones favorables de fermentación, entre estos tenemos los sulfatos de sodio, persulfito, descomposición alcalina de azúcares, etc.
4. Nutrientes: La adición de pequeñas cantidades de compuestos de nitrógeno es necesario al igual que la úrea ya que permiten un mejor desarrollo del metabolismo ce

lular.

5. Concentración de levadura: concentración inicial alta de levadura permiten vencer los potenciales desfavorables de oxidación, reducción.
6. Calentamiento del Hidrolisado: el calentamiento a ebullición por un tiempo limitado del hidrolisado ya neutralizado facilita la fermentación del mismo; la acción favorable obtenida por calentamiento del hidrolisado se debe a que pequeñas cantidades de tipo alcalino de la descomposición de azúcares rinden sustancias reductoras; por otro lado el poder adsorptivo de la lignina en polvo, puede ser lo suficiente para remover las sustancias que inhiben la fermentación; aparte de estos factores consideramos dos más: cambio en la estructura del azúcar a una forma más fácilmente fermentable, polimerización de las sustancias tóxicas a formas inactivas.
7. Temperatura: es un factor inherente a la levadura y de terminativo para la producción de alcohol, ya que la función celular depende de la temperatura; las levaduras producen buen rendimiento de alcohol entre 25° y 35° C
8. pH: factor inherente a la levadura, cuyo valor óptimo permite una actividad enzimática máxima; las levaduras generalmente trabajan a un pH 4.5-5.5

4.7. Modalidades de Fermentación (9)

Para la operación básica de fermentación se han propuesto tres modalidades fundamentales:

- 1.- Fermentación Discontinua.
- 2.- Fermentación Continua (Sistema de recipiente único)
- 3.- Fermentación Continua (Sistema de recipiente múltiple).

En la práctica comercial solamente se utiliza operaciones discontinuas. La mayor parte de las ventajas teóricas de las fermentaciones continuas se hallan contrapesadas por las enormes dificultades inherentes al mantenimiento de un sistema de cultivo puro, cuando se manipulan grandes cantidades de caldos de cultivo.

Las fermentaciones continuas precisan también un cultivo microbiano que no se deteriore a medida que se producen nuevas generaciones de células, requerimientos que no son fáciles de cumplir. Por otro lado, una fermentación Batch nos permite tener un sistema más aséptico de tal forma que la fermentación no se inhiba o el medio se contamine con microorganismos indeseables.

CAPITULO V

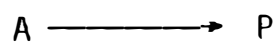
5.- CINETICA DE LA FERMENTACION

5.1. INTRODUCCION

Los estudios cinéticos son necesarios para ganar un entendimiento básico de la fermentación; como su nombre lo indica está relacionado con la velocidad de producción celular, productos de fermentación y el efecto del medio sobre estas velocidades. Los estudios cinéticos no están necesariamente limitados a sistemas en crecimiento, ellos también pueden incluir células muertas. (1)

Las mediciones de temperatura, pH y nutrientes durante el curso de la fermentación no están relacionadas a las reacciones básicas que implican procesos de fermentación, una razón para esto es la variedad de condiciones que ocurren en una fermentación Batch.

Los principios generales de la cinética de las reacciones químicas son también aplicables a las reacciones catalizadas enzimáticamente; estas últimas muestran sin embargo rasgos distintos que no se observan en las reacciones químicas como es el fenómeno de "saturación" por el sustrato. En la figura 5.1 vemos el efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de la reacción enzimática:



A bajas concentraciones de sustrato la velocidad de la

reacción "v" es proporcional a la concentración del sustrato y la reacción es por tanto de primer orden con respecto al mismo, sin embargo a medida que el sustrato aumenta, la velocidad de la reacción disminuye y ya no es proporcional a la concentración del sustrato, en esta zona la reacción es de orden mixto; por un aumento ulterior de sustrato la velocidad es independiente de la concentración del sustrato, en este intervalo la reacción es de orden cero y la enzima se halla entonces saturado por su sustrato, en estas condiciones el factor limitante de la velocidad es sólo el grado de concentración de enzima. Todas las enzimas muestran este efecto de saturación variando unos a otros la concentración del sustrato de saturación. El efecto de saturación condujo a L. MICHAELIS y M.L. MENDEN a formular una teoría de la acción de las enzimas y su cinética. Esta ecuación de Michaelis-Menden nos sirve como una base para determinar la cinética del crecimiento celular de la formación del producto y del consumo del sustrato, a la vez que nos permite determinar la presencia de inhibidores en el medio hidrolisado y establecer el modelo de la reacción enzimática. Entendiéndose por inhibidores aquellas sustancias que son inherentes al sistema y que retardan el crecimiento celular.

Los modelos establecidos se han hecho en base a reacciones de enzimas puras, esto puede parecer lejos de las secuencias de las reacciones enzimáticas involucradas en la industria de la fermentación, pero esta asunción se aproxima notablemente debido a que el estudio de una reacción cinética de

una sola enzima es fundamental para la construcción de la cinética de la fermentación como un todo.

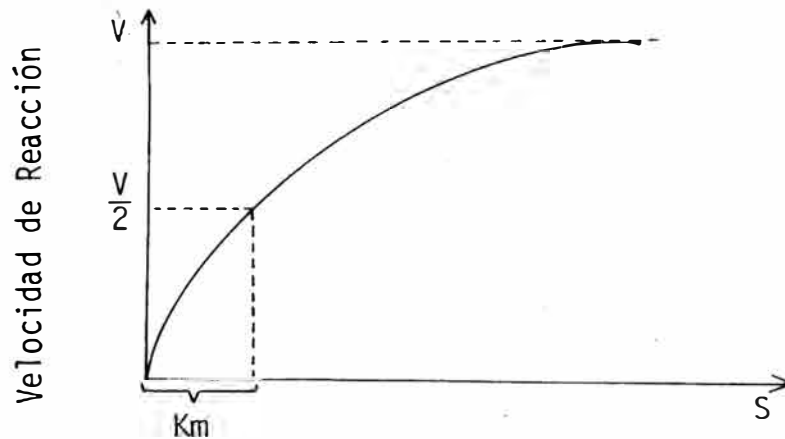
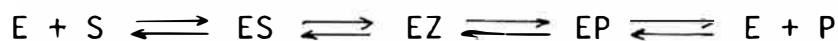


FIG. 5.1 Grafico del efecto del Sustrato en la Velocidad de reacción Enzimática.

Las ecuaciones mostradas son fundamentales para el tratamiento cuantitativo de la acción enzimática y para determinar si una reacción enzimática sigue un modelo de reacción sin inhibición, inhibición competitiva o inhibición no competitiva. Pero debe hacerse hincapié que muchas enzimas tienen un comportamiento cinético mucho más complejo que el caso ideal que acabamos de tratar, por una parte en la formulación anterior se ha supuesto que no existe sino un solo complejo enzima sustrato; sin embargo parece ahora probable que en la reacción enzimática intervengan 2 ó 3 complejos enzima-sustrato de acuerdo a lo siguiente:



En la que EZ es el verdadero complejo de estado de

transición y EP un complejo enzima producto. Debe señalarse además que puede haber más de una molécula sustrato y dos o más productos y el análisis cinético de dichas reacciones son complejos y quizás se necesite el uso de un computador, no obstante el punto de partida de las reacciones enzimáticas es la relación de MICHAELIS-MENDEN. (11)

Monod en su estudio del crecimiento bacteriano, donde la velocidad de crecimiento estuvo limitado por un solo sustrato encontró que sus datos concordaban con la Ecuación de Michaelis-Menden. El entonces sugirió la siguiente fórmula experimental: (13)

$$\mu = \mu_{\text{Max}} \left(\frac{S_0}{K_s + S_0} \right) \quad (5.1)$$

5.2. CINETICA DE LAS REACCIONES ENZIMATICAS

Uno de los modelos más ampliamente aceptados sobre cinética enzimática es el propuesto por Michaelis-Menden. (13) Ellos representaron la reacción de la enzima con el sustrato como sigue:



Donde:

E = Enzima.

S = Sustrato.

E. S = Complejo Enzima-sustrato.

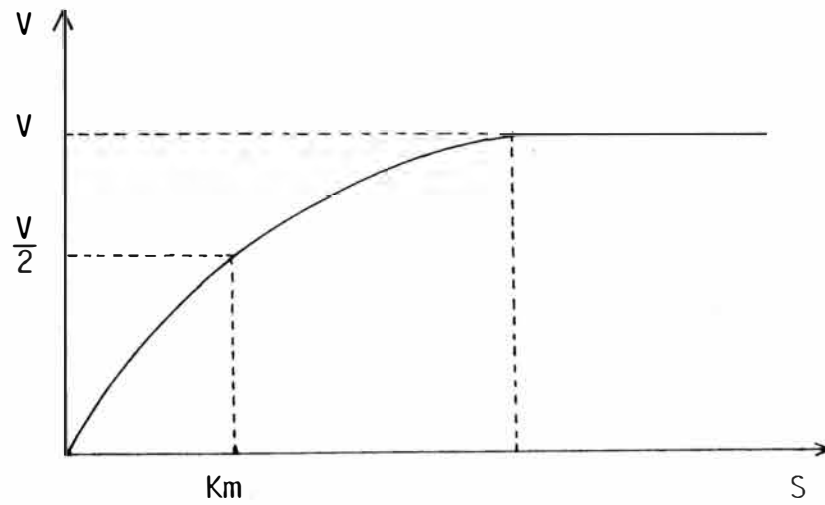


FIG. 5.2. Comportamiento típico de una reacción enzimática



FIG. 5.3. Comportamiento típico de una reacción enzimática donde podemos observar fácilmente los valores de V y K_m .

P = Producto y puede representar algunas moléculas.

Si denotamos como

e = la concentración total de enzima presente

S = la concentración total de sustrato.

c = la concentración de complejo enzima sustrato.

La velocidad de formación y/o descomposición del complejo - será:

$$\frac{dc}{dt} = k_{+1}(e-c)S - k_{-1}c - k_{+2}c \quad (5.3)$$

donde hemos asumido que $S \gg e$ (como casi siempre ocurre) como no existe consumo neto de enzima, podemos asumir también que en el estado estacionario la concentración de complejo c permanece constante, o sea $\frac{dc}{dt} = 0$

De la ecuación (5.3) obtenemos:

$$c = \frac{e \cdot S}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + S}$$

La velocidad de formación de producto de la ecuación 5.2.2. sería:

$$\frac{dP}{dt} = v = k_{+2}c = \frac{V \cdot S}{k_m + S} \quad (5.4)$$

Donde $V = k_{+2}c$ La máxima velocidad de producción, si toda la enzima presente formase el complejo enzima sustrato.

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \quad \text{Constante de equilibrio de disociación del complejo enzima sustrato.}$$

$$K_m = K_S - \frac{k_{+2}}{k_{+1}} \quad \text{Constante de Michaelis-Menden.}$$

En el caso de que $k_{+2} \ll k_{+1}$, entonces $K_m = K_S$

Vemos que el valor de K_m es inversamente proporcional a la afinidad química de la enzima por el sustrato.

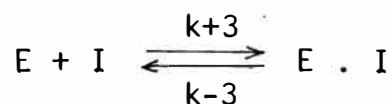
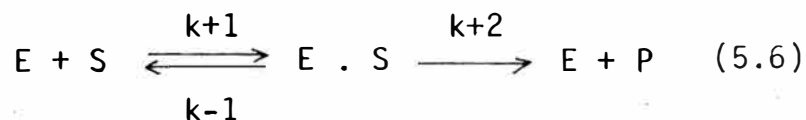
Como se puede observar en la gráfica es un poco difícil evaluar el valor de V , ya que la curva tiene un comportamiento asintótico, por esta razón la ecuación (5.4) se reescribe tomando el recíproco:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V} \quad (5.5)$$

Que graficada nos da una línea recta de donde se puede evaluar con facilidad los valores de V y K_m . (Fig. 5.3)

5.3. INHIBICION COMPETITIVA DE LAS ENZIMAS

Consideremos las siguientes Reacciones:



Podemos asumir que se establecerán dos equilibrios diferentes en las reacciones dadas; uno, entre la enzima, el sustrato, y el complejo enzima-sustrato; el otro entre la enzima, el inhibidor y el complejo enzima-inhibidor.

Existe una "competencia" entre el sustrato e inhibidor por la enzima. Ya que parte de la enzima forma el complejo inhibidor-enzima, ésta pierde parcialmente su capacidad de formar el producto P. Las constantes que gobiernan las reacciones mostradas arriba son las siguientes:

$$K_s = \frac{(e-c-d) S}{c} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$$

$$K_i = \frac{(e-c-d) i}{d} = \frac{k_{-3}}{k_{+3}}$$

Donde:

c = concentración de complejo enzima-sustrato

d = concentración de complejo enzima-inhibidor

e = concentración de enzima total

i = concentración de inhibidor

S = concentración de sustrato

k_{+1} constante de velocidad de reacción de avance entre la enzima y sustrato.

k_{-1} constante de velocidad de reacción inversa entre la enzima y sustrato.

k_{+3} constante de velocidad de reacción de avance entre la enzima e inhibidor.

k_{-3} constante de velocidad de reacción inversa entre la enzima e inhibidor.

Si suponemos que $S \gg e$ $i \gg d$

Obtenemos:

$$c = \frac{(e) (S) (k_i)}{(K_s)(K_i) + (K_s)i + (S)k_i} \quad (5.7)$$

La velocidad de formación de producto v será entonces:

$$v = k_{+2} c = \frac{(V)(S)}{K_m + S + \left(\frac{K_m}{K_i}\right) i} \quad (5.8)$$

Donde $V = k_{+2} e$ (velocidad máxima de reacción)

$$k_{+2} \ll k_{+1}$$

Reordenando la ecuación 5.8 obtenemos:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v} \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) \frac{1}{S} + \frac{1}{V} \quad (5.9)$$

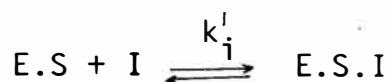
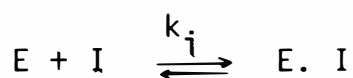
La gráfica de esta ecuación se muestra en la figura N° 5.4 .

Vemos que la pendiente es $\frac{K_m}{v} \left(1 + \frac{1}{K_i}\right)$, y el intercepto $1/V$

nótese que K_i es independiente de S . En cambio v es dependiente de S y de i (a diferencia del comportamiento sin inhibidor).

5.4. INHIBICION NO COMPETITIVA DE LAS ENZIMAS

Luego de mencionar los mecanismos anteriores, agregaremos un tercer mecanismo en el que está presente el complejo triple $E \cdot S \cdot I$. La concentración de este complejo está en equilibrio con $E \cdot S + I$ y $E \cdot I + S$ respectivamente como se muestra.



Las constantes de equilibrio en las reacciones enzimáticas serán:

$$K_S = \frac{(e-c-d-f)(S)}{c}$$

$$K_i = \frac{(e-c-d-f)(i)}{d}$$

$$K_i' = \frac{(c)(i)}{f}$$

$$K_S' = \frac{(d)(S)}{f}$$

- Donde:
- e Concentración de la enzima
 - d Concentración del complejo enzima-inhibidor E.I
 - c Concentración del complejo enzima-sustrato E.S
 - f Concentración del complejo enzima-sustrato-inhibidor E.S.I.
 - i Concentración del inhibidor.
 - S Concentración del sustrato
 - K_S Constante de reacción entre E+S y E.S
 - K_i' Constante de reacción entre E.S + I y E.S.I
 - K_i Constante de reacción entre E + I y E.I
 - K_S' Constante de reacción entre E.I + S y E.S.I

Además hemos considerado que: $S \gg e$ y $i \gg d, f$.

Si asumimos $K_S = K_S'$

$$K_i = K_i'$$

Esto sucede cuando ni el sustrato, ni el inhibidor afectan la afinidad de la enzima por el sustrato o el inhibidor (es decir que no es afectada por la presencia del complejo E.I)

Obtenemos:

$$c = \frac{(e)(S)(k_i)}{(K_S + S)(K_i + i)}$$

De donde

$$v = \frac{(V) (S)}{(K_m + S) \left(1 + \frac{i}{K_i}\right)} \quad (5.10)$$

donde:

$$K_m = K_s \quad \text{y} \quad V = k_{-2} \cdot e$$

Esta ecuación nos indica que la velocidad V en estas condiciones es menor que en el caso de una reacción sin inhibición, o cuando hay inhibición competitiva. Tomando recíprocos a la ecuación 5.10 obtenemos:

$$\frac{1}{v} = \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) \frac{K_m}{v} \cdot \frac{1}{S} + \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) \frac{1}{v} \quad (5.11)$$

Vemos que esta ecuación se puede graficar como una línea recta con pendiente $\left(1 + \frac{i}{K_i}\right) \frac{K_m}{v}$ y con un intercepto

$$\left(1 + \frac{i}{K_i}\right) \frac{1}{v}$$

Ver la figura N° 5.4

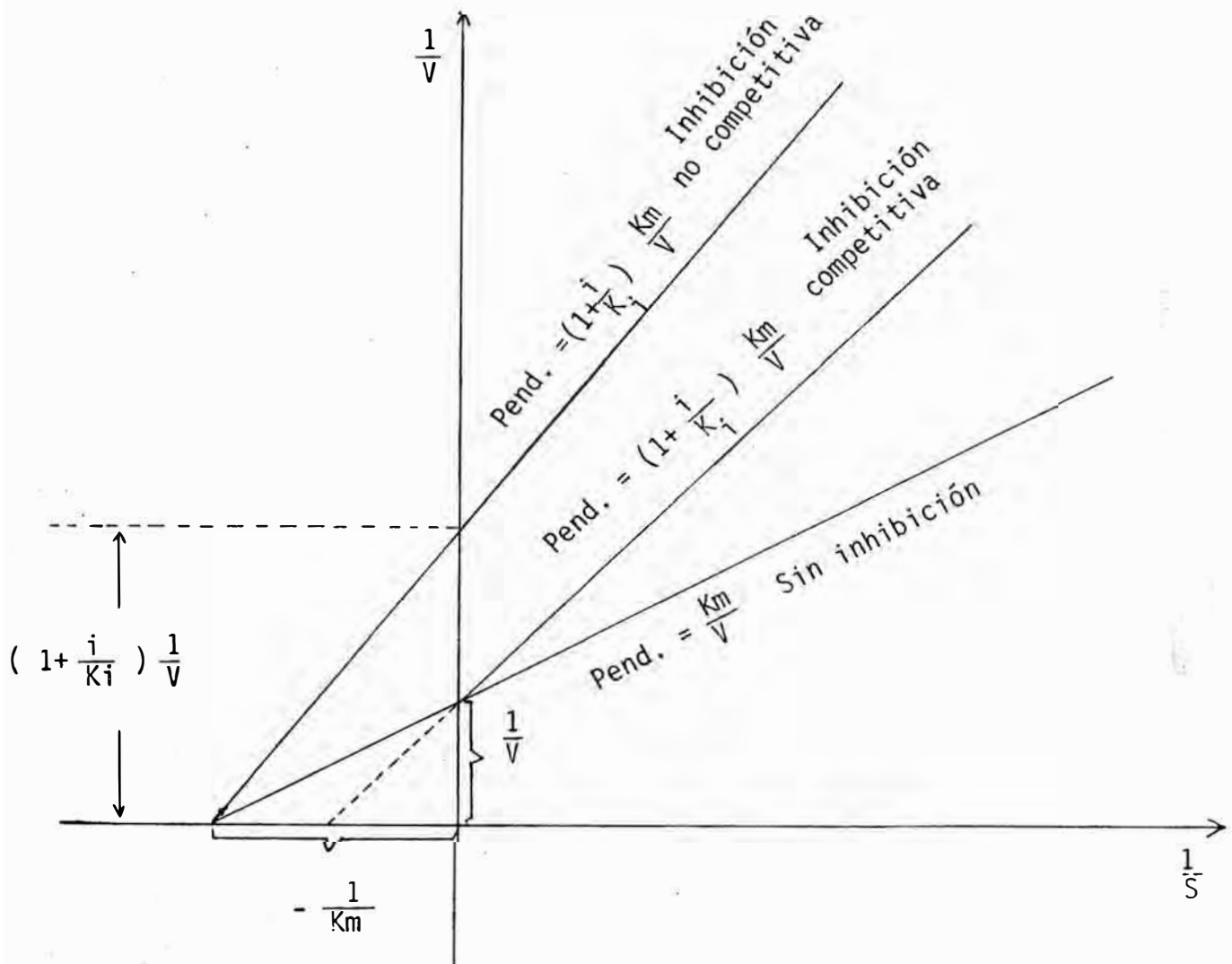


FIG. 5.4. Gráfica de la cinética de las reacciones, sin inhibición, con inhibición, y con inhibición competitiva.

5.5. MODELOS DE VELOCIDAD DE FERMENTACION CON CRECIMIENTO ASOCIADO Y SIN CRECIMIENTO ASOCIADO (13)

Diferentes formas de clasificar los modelos de fermentación han sido propuestos, GADEN sugirió que las fermentaciones sean ampliamente divididas en aquellos donde las velocidades de crecimiento y de formación de producto estén íntimamente asociados (Crecimiento asociado) y aquellos donde no existe relación entre ambos (Crecimiento no asociado), este criterio es el más ampliamente aceptado aunque algunas fermentaciones escapen a su clasificación.

Durante el curso de una fermentación Batch se verifican el crecimiento celular, formación de producto y utilización del sustrato; tales reacciones se muestran esquemáticamente en la figura 5.5

Cuando los ejemplos de fermentación de GADEN son graficados en términos de U vs tiempo, modelos típicos son obtenidos que constituyen los tres modelos típicos en fermentaciones industriales sugeridos por GADEN: (fig. 5.6)

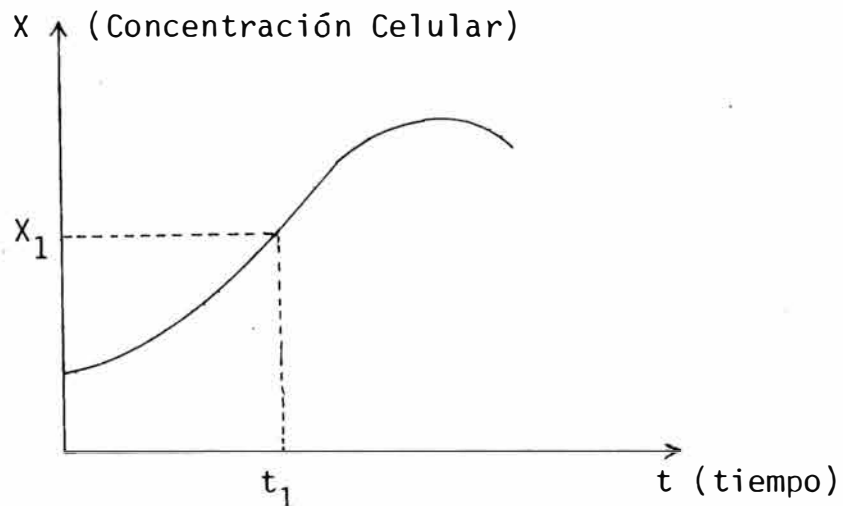
Modelo 1.- Muestra que la formación de producto está en paralelo con el crecimiento microbiano (relación lineal) durante el curso de la fermentación; este tipo es el llamado cultivo de crecimiento asociado. La fermentación a ETANOL pertenecen a este modelo.

Modelo 2.- Muestra que la formación de producto se re-

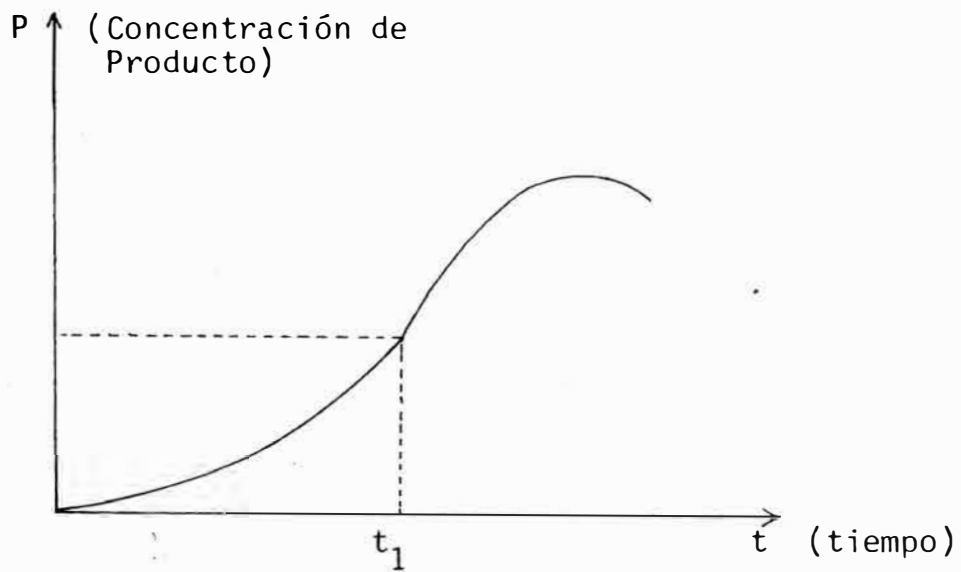
trasa y que éste empieza después que el crecimiento micelial cesa y el sustrato es consumido; este tipo de cultivo es llamado de crecimiento no asociado. Fermentos de Antibióticos (Penicilina, Estreptomicina, etc.) y producción de algunas enzimas.

Modelo 3.- Es un intermedio entre los modelos 1 y 2. Fermentación de ácido láctico, glutámico y Itaconico pertenecen a este modelo.

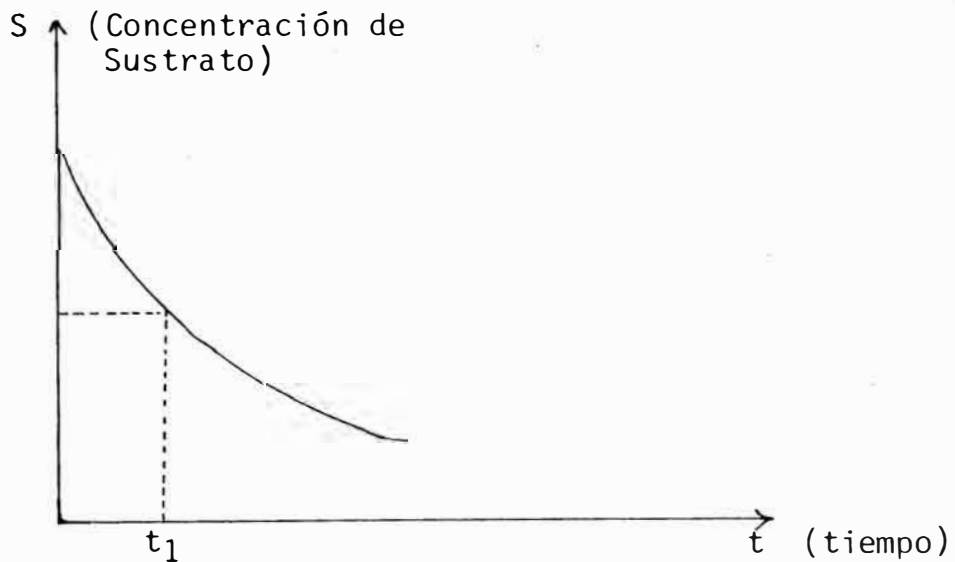
GRAFICA DE LAS REACCIONES EN UNA FERMENTACION



$$\mu = \left(\frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{x} \right)_{x=x_1 \text{ o } t=t_1} = \text{Velocidad específica de crecimiento.}$$



$$p = \left(\frac{dP}{dt} \cdot \frac{1}{X} \right)_{x=x_1 \text{ o } t=t_1} = \text{Velocidad específica de formación de producto.}$$

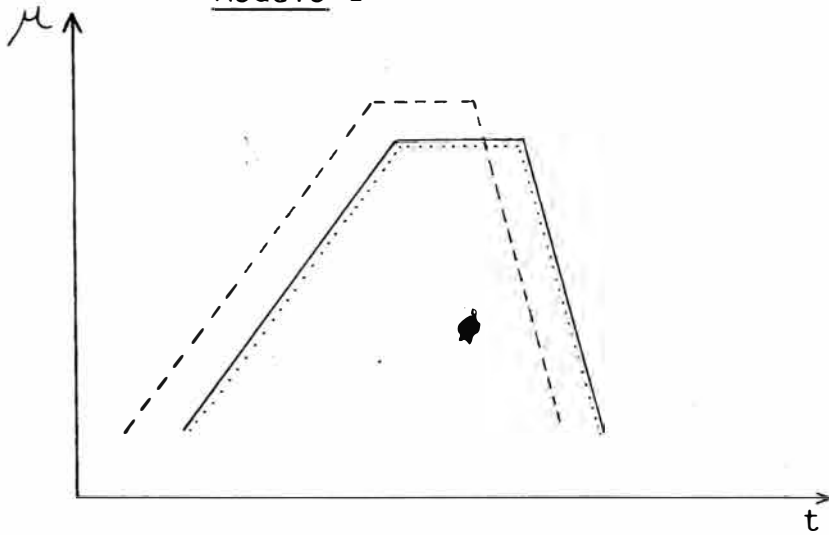


$$s = \left(- \frac{ds}{dt} \cdot \frac{1}{X} \right)_{x=x_1 \text{ o } t=t_1} = \text{Velocidad específica de consumo de sustrato}$$

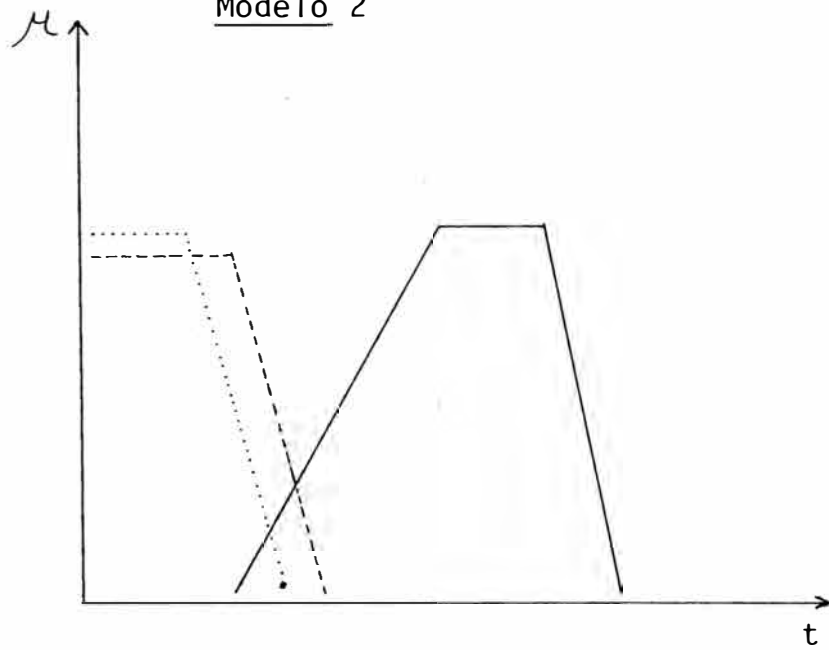
FIG. 5.5

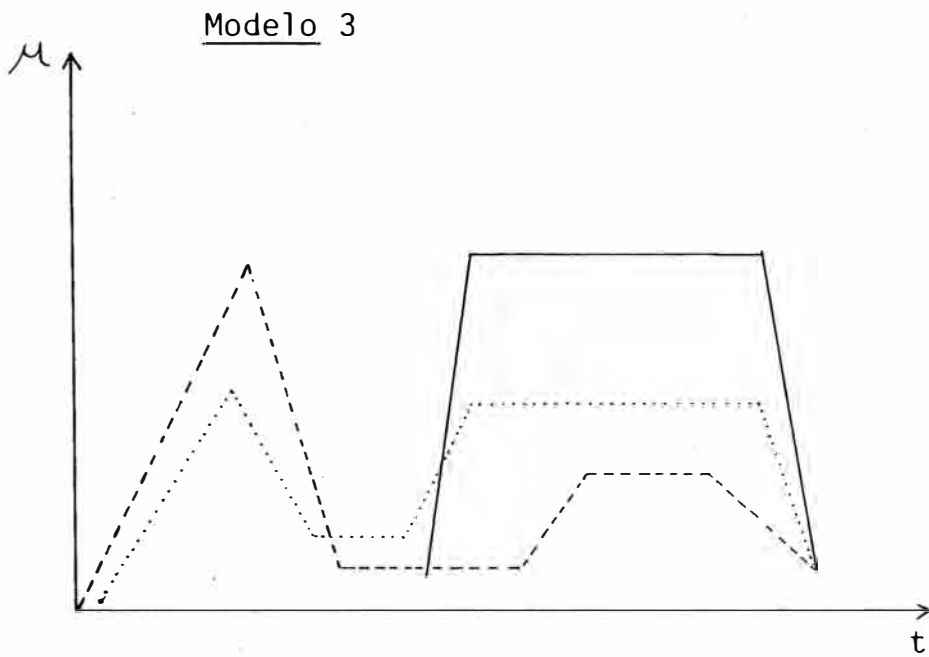
MODELOS DE FERMENTACION

Modelo 1



Modelo 2





VELOCIDAD ESPECIFICA

- A) ----- Crecimiento.
 - B) Utilización de azúcar
 - C) ————— Formación de producto
- μ = Velocidad específica de crecimiento

FIG. 5.6

5.6. MODELOS CINETICOS EN LA FERMENTACION

5.6.1. Modelo Cinético de Crecimiento Celular.-

El crecimiento unicelular en los cultivos Batch, que son los que tienen mayor importancia comercial, puede ser expresado en términos de la concentración celular X ; la del sustrato limitante S_0 , y la de un inhibidor I_0 .

Debe considerarse también que las condiciones de temperatura, fuerza iónica, y pH se establecen al principio de la fermentación y es muy probable que varíen en el transcurso de la misma, a no ser que se controlen el PH y la T°

Una expresión general es:

$$\frac{dx}{dt} = f(X, S_0, I_0, T, \text{pH}, \text{etc.})$$

donde X es concentración celular N° de células /ml

S_0 = conc. inicial de sustrato (% en peso)

T = temperatura

I = conc. de inhibidores de fermentación

En 1942 Monod (13) estableció un modelo de crecimiento bacteriano empírico:

$$\mu = \mu_{\text{máx.}} \frac{S_0}{K_s + S_0} \quad (5.12)$$

Además definía

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (5.13)$$

donde $\mu \rightarrow$ velocidad específica de crecimiento
($\frac{1}{t}$)

μ máx. \rightarrow velocidad específica máxima de crecimiento.
 $K_s \rightarrow$ constante de saturación (gr/100 ml.)

La ecuación (5.11) es similar a la Ecuación de Michaelis Marten, pero su derivación fué empírica y no teórica. En general se considera la ecuación de Monod como una primera aproximación al problema.

Identificando (5.12) y (5.13), y reordenando obtenemos:

$$\frac{dx}{x} = \mu \text{ máx.} \frac{S_0}{K_s + S_0} dt$$

como la velocidad específica se mantiene constante en la fase de crecimiento, integrando se obtiene:

$$\ln \left(\frac{X}{X_0} \right) = \mu \text{ máx.} \left(\frac{S_0}{K_s + S_0} \right) (t - t_0)$$

o también:

$$X = X_0 e^{\mu \text{ máx.} \left(\frac{S_0}{K_s + S_0} \right) (t - t_0)} \quad (5.14)$$

donde X_0 = concentración inicial de células

t_0 = tiempo de inicio de la fase de crecimiento logarítmico.

Esta ecuación nos permite evaluar la concentración celular X durante la fase de crecimiento logarítmico.

5.6.2. Modelo Cinético de Consumo de Sustrato.-

Durante el transcurso de la fermentación se verifica la disminución de la concentración de sustrato debido a la acción enzimática. Para definir una ecuación que exprese la variación de la concentración de sustrato con el tiempo definiremos la velocidad específica de consumo de sus-

trato (μ_s)

$$\mu_s = -\frac{1}{s} \left(\frac{ds}{dt} \right) \quad (5.15) \quad \left(\frac{1}{\text{Hr}} \right)$$

donde "S" es la concentración de sustrato que varía con el tiempo. Como el Crecimiento Celular está asociado directamente al consumo de sustrato, definimos la siguiente relación:

$$\mu_s = k_1 \mu \quad (5.16)$$

donde:

μ_s = Velocidad específica de consumo de sustrato (1/hr)

μ = Velocidad específica de crecimiento Celular (1/hora)

k_1 = Constante de Proporcionalidad

Substituyendo (5.16) en (5.15) obtenemos

$$-\frac{1}{s} \cdot \frac{ds}{dt} = k_1 \mu$$

$$-\ln \left(\frac{s}{s_0} \right) = k_1 \mu (t - t_0) \quad (5.17)$$

donde s_0 = Concentración inicial de sustrato (gr/100 ml)

t_0 = Tiempo de fase de Latencia.

de la ecuación (5.12) en (5.17) obtenemos:

$$-\ln \left(\frac{s}{s_0} \right) = k_1 \mu_{\text{max}} \left(\frac{s_0}{k_s + s_0} \right) (t - t_0) \quad (5.18)$$

que representa el modelo cinético propuesto del consumo de Sustrato en función del tiempo.

5.6.3. Modelo Cinético de la Formación de Producto.

Para determinar la Ecuación Cinética de la Formación del Producto asumiremos que la formación de Producto está asociada con el crecimiento Celular de la siguiente forma:

$$\frac{dP}{dt} = K_p \left(\frac{dx}{xdt} \right)^\alpha = K_p \mu^\alpha \quad (5.19)$$

donde:

P = Conc. de Alcohol Etílico (gr/100 ml.)

μ = Velocidad Específica de Crecimiento Celular
(hr⁻¹)

K_p = Constante de Proporcionalidad ($\frac{\text{gr} \cdot \text{Hr}^{\alpha-1}}{\text{ml.}}$)

α = Constante Adimensional

donde K y α dependen de los cofactores agregados al medio Hidrolizado.

Si la concentración de "So" se mantiene constante y el valor de " α " y " K " aumentan, esto significaría que la actividad Celular se incrementa debido a la presencia de cofactores dando como resultado una mayor velocidad de formación de Producto.

Reemplazando la ecuación (5.12) en la (5.19) obtenemos:

$$\frac{dP}{dt} = K_p \left(\mu M \frac{S_0}{K_s + S_0} \right)^\alpha$$

Integrando:

$$P - P_0 = K_p \left(\frac{\mu M S_0}{K_s + S_0} \right)^\alpha (t - t_0) \quad (5.20)$$

donde: t_0 = Es la fase de Latencia (hr)

P_0 = 0 durante la fase de Latencia (gr/100 ml.)

K_p y α deberán obtenerse experimentalmente.

5.6.4. Determinación de la Velocidad Específica De Crecimiento Máximo y De la Constante K_s

De la Ecuación de Monod

$$\mu = \frac{\mu_M S_0}{K_s + S_0}$$

Para calcular las constantes μ_M y K_s se calculan los valores de μ para 2 concentraciones de sustrato.

Limitante S_0 .

La velocidad específica de crecimiento μ se calcula con los datos obtenidos experimentalmente los cuales se grafican en $\ln X$.vs. t , se halla la pendiente de la recta que es igual a μ . Para diferentes concentraciones de sustrato la gráfica de la Ecuación de Monod nos da una curva como la representada en la Fig. 5.7

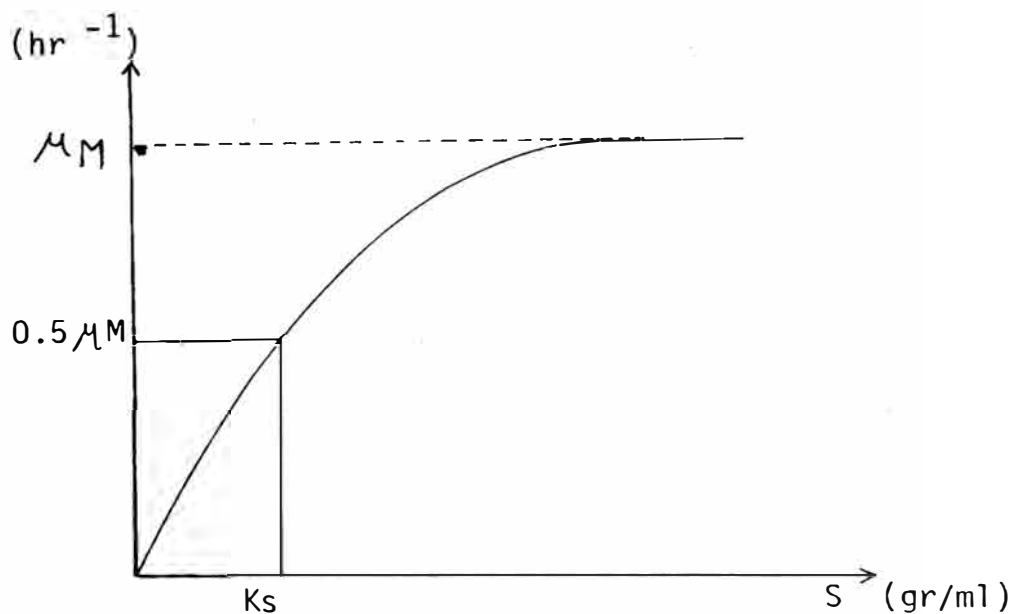


Fig. 5.7

$$\mu_M = \mu \text{ maxima}$$

CAPITULO VI

6. PRUEBAS EXPERIMENTALES

6.1. Ensayos de Laboratorio

Los ensayos de laboratorio se han dividido de acuerdo a las etapas del presente estudio, que comprenden prehidrólisis, hidrólisis, post-hidrólisis y fermentación.

Ensayos durante la prehidrólisis

- a) Para estos ensayos se usó un vaso de vidrio de 500 ml. que contenía 50 gramos de la muestra, el que se encontraba sumergido en bañomaría consistente en una solución saturada de sal corriente. Esto nos permitía obtener una temperatura de trabajo entre 90 a 92°C.

Es necesario anotar que las pérdidas de humedad se reponían constantemente.

Ensayos durante la hidrólisis

- b) Para estos ensayos se uso un vaso de 50 ml. que contenía 5 gr de muestra, la que previamente es secada hasta una humedad predeterminada para conseguir la concentración de ácido sulfúrico requerida.

La temperatura de trabajo fue determinada por la condición exotérmica de la reacción, la que se llevó a cabo sin refrigeración. Las pérdidas de humedad por evaporación se cuantificó pesando el material antes y después de la reacción.

Ensayos durante la post-hidrólisis

c) Para establecer estos ensayos se ha usado un balón de vidrio al que se le acondicionó un condensador con refrigerante. Esta disposición permite mantener constante la cantidad de agua, a la temperatura de ebullición.

Ensayos durante la fermentación

d) La fermentación se ha llevado a cabo en cultivos batch, en condiciones de agitación y temperatura constantes.

Es conveniente mencionar aquí que se trató que la cantidad de cepa inicial fuera lo más constante posible, para esto se empleó el mismo "asa" o varilla de inoculación.

6.2. PREHIDROLISIS

6.2.1. Estudio Teórico de la Prehidrólisis

La Prehidrólisis es la primera etapa durante la sacarificación de la madera, en el cual se hidroliza principalmente las hemicelulosas bajo la acción del ácido diluído.

La celulosa se presenta tanto en forma cristalina como amorfa; sufre hidrólisis en su parte amorfa que es fácil de hidrolizar, pero su parte cristalina permanece inalterada debido a la estabilidad de su estructura cristalina y el sello protector de la lignina que

impide un ataque mas directo. (9)

Este paso permite la obtención de una solución de azúcares reductores como la Xilosa (en mayor proporción), Glucosa, manosa y arabinosa, allana el camino para una hidrólisis de Celulosa Cristalina, más rápida y elimina los posibles inhibidores durante la fermentación.

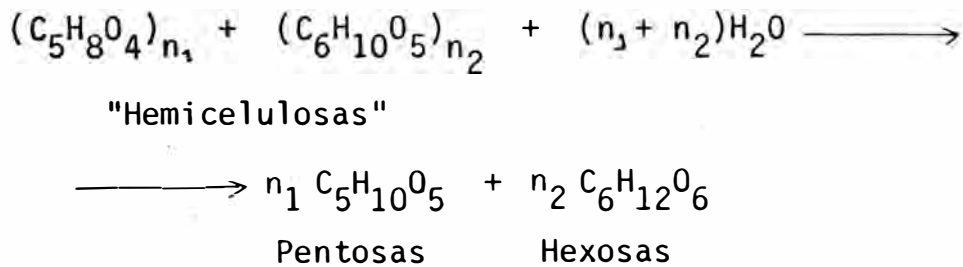
La baja temperatura utilizada (90-92°C) en comparación a procesos ya sea Madison, SCHOLLER, RHENIAU, etc, es de hecho deseable ya que la Xilosa y los otros azúcares reductores no serían degradadas y convertidos por el calor y el ácido en furfural y otros materiales poliméricos inútiles. Por otro lado esta etapa permite la obtención de un residuo sólido Ligno-celulósico más activo el cual será sometido a una posterior hidrólisis y una solución azucarada, (básicamente Xilosa) la que sería tratada por una enzima comercial la glucosa isomerasa (10) que convierte la Xilosa en Xilulosa el cual puede ser fermentado por la levadura cervecera para producir etanol, aumentando de esta manera el rendimiento de etanol por peso de madera seca.

La prehidrólisis basa su rendimiento en una buena humectación del material celulósico de tal forma que el ácido tenga una mayor área a hidrolizar. El ácido se agrega en forma de spray y en agitación continua manteniendo la humedad, (reponiendo agua) y la temperatura de prehidrólisis. Las variables que involucran esta etapa son optimizados con el criterio de minimizar los costos de energía; dichas variables como son el tamaño de partícula, temperatu-

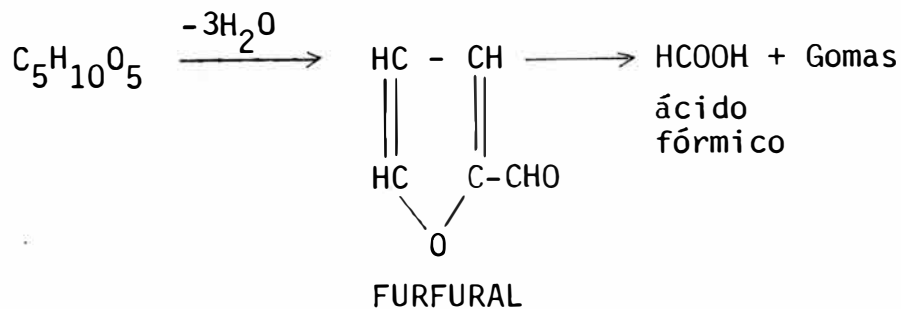
ra, concentración de ácido sulfúrico y relación de peso de ácido a madera seca son evaluados en función del rendimiento de azúcares reductores para un tiempo de prehidrólisis determinado.

REACCIONES DE LA PREHIDROLISIS

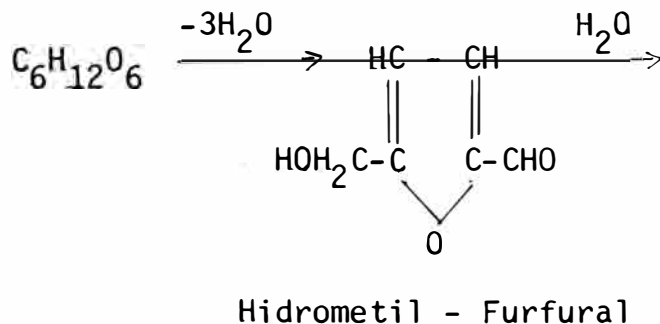
a) Hidrólisis de las Hemicelulosas:

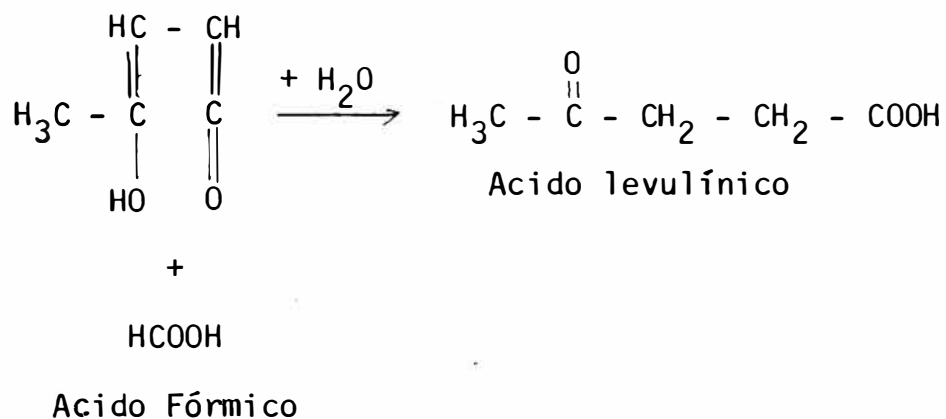


b) Degradación de las Pentosas:



c) Degradación de las Hexosas:





Las reacciones b y c se verifican a temperaturas de 120°C.

6.2.2. Influencia de la Temperatura.-

Las velocidades de las reacciones químicas como la hidrólisis se incrementan al aumentar la temperatura y los mayores rendimientos se alcanzan en menor tiempo.

Los datos del cuadro 6.1 graficados en la Fig. 6.1 muestran claramente el efecto de la temperatura sobre la velocidad de hidrólisis; de acuerdo a esto para temperaturas mayores a 25°C, se obtienen rendimientos mayores y tiempos de operación menores pero teniendo en cuenta que la degradación de los azúcares reductores aumenta al subir la temperatura y si el tiempo de calentamiento es prolongado.

Las condiciones de operación fueron:

$$\text{Razón } (W_{\text{Acido}}/W_{\text{Madera seca}}) = 1$$

Tamaño de partícula = -20; + 50 Mallas ASTM

Concentración de ácido= 8%

Temperatura = 25°C y 90°C

CUADRO 6.1.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

TEMPERATURA	25°	90°C
Tiempo (Minutos)	Concentrac.de Azucares %	
42	3.04	3.80
87	3.13	5.25
132	3.33	7.03
177	3.40	8.51
222	3.50	10.93
267	3.53	9.62

6.2.3. Influencia de la Concentración de Acido Sulfúrico.-

La hidrólisis de las hemicelulosas depende de la concentración del ácido siendo más rápida cuando más concentrado es, sin embargo la elevación de la temperatura, producto del calor de hidratación, hace que los azúcares se degraden después de un cierto tiempo al alcanzar el máximo rendimiento manteniendo constante las demás variables. La figura 6.2 muestra un máximo en el rendimiento de azúcares reductores el cual se desplaza hacia el eje de las Y a medida que la concentración de ácido aumenta incrementándose ligeramente estos máximos con la concentración.

La selección de la concentración adecuada se hará considerando que el tiempo de tostado (y por ende el consumo de energía) es el factor de mayor peso desde el punto de vista de ahorro de energía, considerando esto y observando el gráfico se tiene que: Para un incremento de 10% en el

tiempo de tostado y de 43% en la concentración de ácido se obtiene un aumento de 0.5% en el rendimiento lo cual desecha el ácido al 20% respecto al del 14%, pero el uso del ácido al 14% permite un ahorro de 68% en el tiempo de tostado y el incremento de 1.1% en el rendimiento respecto al ácido del 8% de acuerdo a esto la concentración adecuada es del 14%. Las condiciones de operación fueron:

MALLA ASTM = - 20, +50
 TEMPERATURA = 90 a 92 °C
 RAZON r = 1
 CONCENTRACION DE ACIDO SULFURICO = 14%, 8%, 4% y 20%

Estas condiciones nos permiten obtener un rendimiento de azúcares reductores en base de madera seca del 11.05%.

CUADRO 6.2.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DEL ACIDO SULFURICO.

T(min) \ %A.S.	4	8	14	20
	% De azúcares reductores			
42	2.21	3.80	7.31	6.65
87	3.37	5.25	9.05	10.42
132	5.25	7.03	11.05	10.50
177	6.10	8.51	9.15	7.47
222	7.80	10.93	7.83	
267	9.90	9.62	6.88	
292	10.50			

6.2.4. Influencia de la relación Peso de Acido/Peso de Madera Seca

Se considera la relación del Peso de Acido por Peso de Madera Seca.

La reacción de hidrólisis en forma global se lleva a cabo en 3 etapas:

- a.- La difusión del ácido hacia las hemicelulosas
- b.- La reacción de las hemicelulosas
- c.- La difusión de los azúcares formados al seno del líquido.

En la presente etapa se busca hallar la mínima razón con la finalidad de usar la menor cantidad de ácido que permita un humedecimiento uniforme a la vez que la velocidad de difusión del ácido no disminuya permitiendo una rápida prehidrólisis de aserrín.

Del gráfico 6.3 se puede apreciar que al aumentar la concentración de ácido aumenta el rendimiento. Observamos que hay 2 alternativas:

- a.- Emplear ácido del 14% con $r = 1$
- b.- Acido del 8% con $r = 3$

Un análisis de la cantidad total de ácido a emplearse da como resultado que para la alternativa "a" se usaría 14 gr de ácido contra 24 gr de la alternativa "b", consiguiéndose un incremento de sólo 0.15 gr de azúcares reductores. De acuerdo a esto se concluye que la más adecuada es la alternativa "a". Las condiciones de operación fueron las siguientes:

$r = 1, 3, 5$	% Acido sulfúrico = 8 y 14
$T = 90 - 92^{\circ}\text{C}$	MALLA ASTM = -20 + 50

CUADRO 6.3.- INFLUENCIA DE LA RELACION (P.A/P.M.S)

RAZON T(min)	1	3	5	% A.S.
	% de azúcares reductores			
87	5.25	9.12	9.0	8
132	7.03	11.2	11.1	
132	11.05	11.75	11.65	14

6.2.5. Influencia del Tamaño de Partícula

El tamaño de partícula o granulometría del material tiene incidencia en los siguientes parámetros:

- Distribución del ácido diluido sobre la superficie; se logra una mejor distribución cuando las partículas son más pequeñas.
- Composición Química, estudios anteriores y recientes han mostrado que por lo general hay menor cantidad de lignina en el material más grueso, determinando que éstos sean menos friables (alcanzan un mayor tamaño después de una molienda o una disgregación como es el aserrado), ocurre lo contrario con el material más fino. (11)
- Velocidad de difusión; teóricamente, el tiempo neto de reacción debe ser menor para las partículas más finas, debido a la mayor área de contacto, pero como se verá más adelante la velocidad de difusión también está influenciada por la composición morfológica de la madera.

Si observamos el gráfico #6.4, veremos que:

Hasta los 177 minutos el rendimiento es mayor para las par

tículas más gruesas, alcanzando su máximo rendimiento precisamente en ese tiempo, a partir de ese tiempo el rendimiento decae, mientras que para las partículas más finas éste sigue en aumento.

A los 187 minutos los rendimientos se igualan, y luego las partículas más finas tienen mayor rendimiento.

A los 222 minutos las partículas más finas alcanzan su máximo rendimiento, a partir del cual empieza a decaer.

Como un comentario del gráfico podemos plantear el siguiente mecanismo:

Durante la primera etapa, donde el rendimiento de material grueso es mayor, tiene mayor preponderancia la composición morfológica del material. Al tener menos lignina el material grueso se hidroliza "más rápido" que el material más fino.

Durante la segunda etapa, el rendimiento para el material grueso decae debido a una impregnación inicial disparada, la velocidad de hidrólisis baja como si se presentase una barrera de lignina difícil de hidrolizar.

En cambio con el material más fino, donde existe una mejor distribución durante la impregnación inicial, se presenta una hidrólisis más lenta, pero que atraviesa la barrera de lignina.

Un análisis final de azúcares potenciales residuales confirmaría esta hipótesis. Esto está demostrado en parte ya que los materiales finos, aún teniendo menor cantidad

de azúcares potenciales, dan un mayor rendimiento (11)

Las condiciones de trabajo fueron:

% A.S. = 8%

relación = 1 ($\frac{\text{Peso de Acido}}{\text{Peso de madera seca}}$)

T° = 90 - 92°C

Se ha considerado como material grueso para la muestra en estudio el tamaño comprendido entre la malla -10 + 20 y finos entre -20 + 50 ASTM.

En conclusión, se trabajará con el material comprendido entre las mallas -20 y +50 (ASTM) ya que conforman el 58, 59% del total de la distribución por tamaños y dan un mejor rendimiento.

CUADRO 6.4.- INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTICULA

Mallas	% de azúcares reductores				
-10 + 20	6.3	7.7	8.8	9.3	7.0
-20 + 50	3.8	5.3	7.0	8.5	10.9
Tiempo (minutos)	4.2	7.8	135	177	220

6.2.6. Lavado de Sólidos.-

Una vez concluída la prehidrólisis, se tienen los azúcares reductores como la xilosa (que se encuentra en mayor proporción), glucosa, manosa y arabinosa, y otras sustancias reductoras, las que se encuentran impregnadas en los sólidos lignocelulósicos.

Es necesario un lavado para permitir la remoción con la principal finalidad de evitar interferencias durante la hidrólisis, ya que si no se retiran ocasionarían la formación de furfural y productos de degradación, inconvenientes para la fermentación de los azúcares producto de la posterior hidrólisis. Otra de las finalidades es su posterior utilización al ser transformados por la glucosa isomerasa (10) en xilulosa y puedan ser fermentados por la levadura - cervecera, aumentando de esta forma el rendimiento en la producción de etanol.

El material lignocelulósico es sometido a un primer lavado en la siguiente relación:

Material celulósico = 1

Agua de lavado = 10

obteniéndose una concentración de azúcares reductores de 0.6% (gr/100 ml de solución), esto equivale a 11.05% (gr/100 gr de madera seca).

La concentración de azúcares reductores se podría aumentar en esta etapa si se recicla la solución de lavado, para posteriores lavados.

6.3. HIDROLISIS

6.3.1. Estudio Teórico de la Hidrólisis

La hidrólisis consiste de 2 pasos:

- a) La degradación de la estructura cristalina de la celulosa, y
- b) Rompimiento de las cadenas glucosídicas.

Los ácidos como catalizadores no específicos pueden atacar a la celulosa así como a la lignina, de tal forma que pueden actuar como deslignificadores (o sea eliminar la Lignina) y actuar como catalizador para la hidrólisis de la celulosa; desafortunadamente la fuerte cristalización (resistente red cristalina) permite que solamente los ácidos fuertes puedan hidrolizar la celulosa a un nivel alto de conversión, originando la formación de oligómeros; un catalizador no específico de ácidos fuertes también ocasiona degradación de los oligómeros aumentando aun más, debido a la acción del calor de la reacción lo que reduciría el rendimiento; sin embargo una reacción a temperatura ambiente y durante un tiempo determinado evitaría en parte la descomposición de los oligómeros formados, la merma en el rendimiento y posibles dificultades durante la fermentación debido a la presencia de oligómeros descompuestos y algunos elementos orgánicos inhibidores del metabolismo bacteriano.

Esta etapa se caracteriza por la formación de oligómeros que son polímeros cuyas unidades monoméricas oscilan entre 12 y 10 (monómero de glucosa), la formación de estos oligómeros se debe a la reacción de los enlaces glucopiranósidos de la celulosa. Como se muestra en las reacciones, su estabilidad se debe a su estructura y la poca presencia de agua, es decir que un medio relativamente carente de agua favorece la formación de oligómeros y que lo contrario favorece la formación de monóme

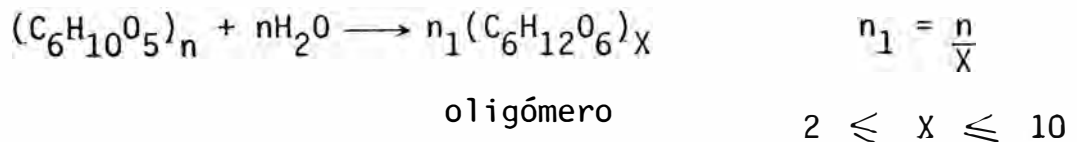
ros que es el criterio aplicado durante la post-hidrólisis.

Las variables de optimización durante esta etapa son la concentración de ácido, razón de ácido a madera seca y el efecto de la temperatura para una granulometría de partícula dada manteniendo constante las condiciones de la post-hidrólisis que son:

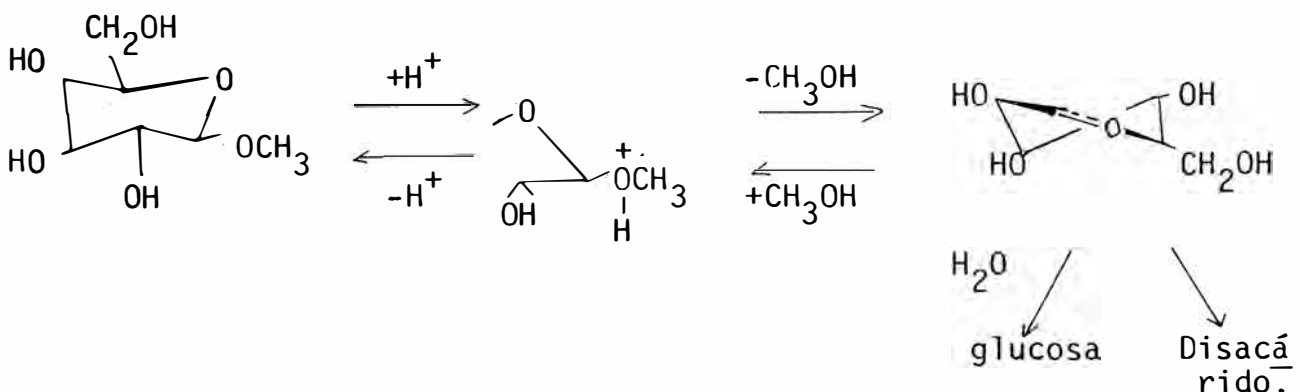
Tiempo de post-hidrólisis	= 1 hora
concentración de ácido	= 5 - 6 %
Volumen de dilución (agua)	= 10 veces el peso del hidrolizado.

REACCIONES DE LA HIDROLISIS

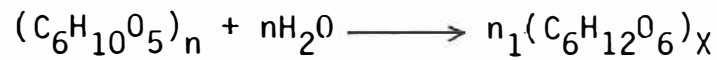
Hidrólisis de la celulosa



Hidrólisis catalizada por ácido de glucopiranosidos



De las reacciones de hidrólisis podemos determinar el factor de conversión de celulosa a oligómeros.



Peso 162n 18n 180n n = n₁X

$$\text{Factor} = \frac{180n}{162n} = 1.11 \frac{\text{gr de oligómeros}}{\text{gr de celulosa}}$$

Para la conversión de oligómeros a glucosa será el mismo factor de acuerdo a la siguiente reacción:



de estas reacciones concluimos que el factor de conversión de celulosa a azúcares reductores es:

$$F = 1.11 \frac{\text{gr A.Reductores}}{\text{gr de celulosa}}$$

6.3.2. Efecto de la Temperatura

La temperatura aumenta la velocidad de reacción de la hidrólisis de la celulosa; sin embargo también acelera la descomposición de los azúcares reductores u oligómeros recién formados, originando de esta manera bajo rendimiento los cuales se incrementan más aún si la concentración de ácido es alta. Los ensayos a la temperatura de la reacción exotérmica y a una temperatura constante (90°C) permiten evaluar el efecto del mismo sobre el rendimiento de los azúcares reductores. De acuerdo al gráfico N° 6.5 se concluye que para una temperatura constante de 90°C por más de una hora los rendimientos son mínimos y si la

reacción se interrumpe cuando se lleva a cabo a la temperatura de la reacción para un tiempo dado los rendimientos aumentan comparativamente con el de temperatura constante. De acuerdo al gráfico 6.6 T° vs tiempo, concluimos que el sistema se mantiene a T° constante (35°C) después de los 20 minutos que es el tiempo que tomaremos como tiempo de Rxn óptimo.

El efecto combinado de temperatura (90°C) y concentración de ácido sulfúrico (75%) degradan completamente el material celulósico y los azúcares dando rendimiento nulos, lo que se puede apreciar en los datos del cuadro 6.5

CUADRO 6.5.- EFECTO DE LA TEMPERATURA

T°	% A.S.	% DE AZUCARES REDUCTORES		
		1 h	2 h	3 h
90°C	71	16.25	6.64	0.753
	75	0	0	0
T° de la reacción	I(m,n) % A.S.	10'	20'	40'
		71	37.40	35.00
	75	43.75	40.69	38.65

6.3.3. Influencia de la Concentración de Acido Sulfúrico.-

La concentración de ácido sulfúrico influyen en la velocidad de hidrólisis de la celulosa de tal manera que a concentración menores al óptimo no la disuelven y valores mayores ocasionan degradación de los oligómeros formados. Este efecto se

CUADRO 6.6

TEMPERATURA DURANTE LA HIDROLISIS, A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ACIDO SULFURICO. DADA EN GRADOS CENTIGRADOS.

TIEMPO (minutos)	71% CONC.	75% CONC.	81% CONC.
3	83	105	--
4	76	96.5	--
5	70	83.0	--
6	65	75	--
7	--	--	80
8	--	--	68
9	--	--	62
11	--	--	53
13	--	40	--
17	--	--	42
19	32	--	--
24	--	31	--
28	28	--	--
50	--	26	--
55	--	--	25
57	--	--	25

CUADRO 6.7

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ACIDO EN LA HIDROLISIS
(A los 20 minutos)

Azúcares Reductores grs/100 gr madera	% Acido Sulfúrico
35.00	71
40.69	75
11.50	81
13.99	85
18.35	88

puede observar en el gráfico 6.7 (Reacción de 20 minutos) a medida que aumenta la concentración del 71% al 75% el rendimiento aumenta hasta conseguir un máximo precisamente a 75% (gráfico 6.7) si se sigue aumentando la concentración el rendimiento experimenta un descenso abrupto consiguiéndose los valores más bajos a concentración del 81%; esto se debe a que concentraciones más altas la velocidad de degradación de los oligómeros y azúcares reductores es más rápida que a concentraciones bajas, al seguir aumentando la concentración del ácido desde 81% al 85% y 88% el rendimiento aumenta ligeramente, ésta tiene su explicación en el hecho de que a medida que la concentración aumenta tiene lugar una degradación más enérgica de la lignina dando lugar a la formación de compuestos reductores no fermentables. Si observamos los gráficos (6.7 y 6.8) vemos que para cualquier concentración de ácido sulfúrico el rendimiento en azúcares reductores disminuye con el transcurso del tiempo. En sus comienzos la reacción de hidrólisis es bastante rápida obteniéndose el rendimiento máximo en los primeros instantes a partir de los cuales la velocidad de degradación es mayor que la de formación de oligómeros dando como resultado un continuo descenso en el rendimiento con el transcurso del tiempo. La elección de un tiempo de reacción de 20 minutos permitiría una mayor humectación del material celulósico y un rendimiento de 40.69%. Las condiciones de operación fueron:

Temperatura = T° de la reacción

razón = 3

Post-hidrólisis: tiempo - 1 hora

volumen de dilución = 10

Las condiciones óptimas:

% A.S. = 75%

Tiempo de reacción = 20'

CUADRO 6.8.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ACIDO SULFU-
RICO.

% A.S. T(m,n)	71	75	81	85	88
	% DE AZUCARES REDUCTORES				
10	37.40	43.75	14.55	18.0	-
20	35.00	40.69	11.50	13.99	18.35
40	34.39	38.65	5.62	9.00	11.57
60	30.62	37.50	4.28	6.00	7.66
80			1.33	3.67	6.15
100			1.00		4.66
120					

6.3.4. Influencia de la relación (peso ácido/peso de madera seca).-

Se busca hallar una mínima relación de ácido a madera seca de tal forma que se economice el uso del ácido concentrado y a la vez que esta relación no dificulte la humectación del aserrín y permita la difusión del ácido sulfúrico en la madera en el cual las células no están saturadas con líquido.

Existe una relación o razón a partir del cual el rendimiento de azúcares reductores alcanzó un máximo y en el cual el aserrín está completamente humedecido. Los datos de la tabla graficados en la fig. 6.9 muestran que para $r = 3$ se alcanza el rendimiento máximo que resultaría más económico

que el $r = 6$ debido a que se usa menor cantidad de ácido sulfúrico.

Las condiciones de ensayo fueron:

% A Sulfúrico = 75%
T post-hidrólisis = 1 hora
volumen de dilución = 10

CUADRO 6.9.- INFLUENCIA DE LA RELACION

razón (r)	2	3	6	10
% Azúcares reductores	30.55	40.62	41.04	22.36

6.4. POST-HIDROLISIS

6.4.1. Estudio teórico de la post-hidrólisis.-

La post-hidrólisis es la última etapa durante la sacarificación de la celulosa de la madera en la cual los oligómeros de la glucosa obtenidos durante la hidrólisis con ácido concentrado son depolimerizados a monómeros reductores.

Esta depolimerización se realiza mediante la adición de un ácido diluido (menor de 10% y mayor de 5%) y el calentamiento prolongado del aserrín hidrolizado.

La solución azucarada obtenida después de filtrada la masa post-hidrolizada será acondicionada para los posteriores ensayos de fermentación.

La post-hidrólisis es una reacción de hidrólisis que se lleva a cabo en 2 etapas a conocer:

a) La difusión de los oligómeros hacia el seno del líquido.

Los oligómeros se encuentran impregnados en la superficie del material celulósico cada vez que la masa hidrolizada tiene apariencia húmeda y no hay líquido libre.

b) Reacción de los oligómeros con el ácido bajo acción térmica para dar los monómeros reductores fermentables.

Las variables asociadas con esta etapa como son: el volumen de dilución de hidrolizado y el tiempo de calentamiento son optimizados en función de la producción de azúcares reductores y consumo de energía.

El volumen de dilución mínimo permite ahorrar energía en lo referente a las calorías necesarias para llevarla a su punto de ebullición y mantenerlo hirviendo por un tiempo determinado.

El tiempo de ebullición regulado permite optimizar el rendimiento de azúcares y minimizar la descomposición de los mismos por acción combinada del ácido y el calor.

6.4.2. Efecto del Tiempo de post-hidrólisis.-

El tiempo de post-hidrólisis óptimo nos permite emplear la menor cantidad de energía durante el calentamiento del hidrolizado para obtener un mayor rendimiento.

Del gráfico 6.10 observamos que durante la primera hora de post-hidrólisis la pendiente es pronunciado obteniéndose un mayor rendimiento, lo que no sucede entre la primera y segunda hora donde el incremento es menos y a

partir de la segunda hora el rendimiento decrece debido a la degradación de los azúcares formados por efecto del calentamiento y la acción ácida.

Se ha elegido como tiempo óptimo de post-hidrólisis 1 hora debido a que rendimientos adicionales para tiempo de calentamiento mayores que el óptimo no compensarían - los posibles gastos de energía.

Las condiciones óptimas serán:

Tiempo de post-hidrólisis = 1 hora
volumen de dilución = 10 veces el peso del hidrolizado.

CUADRO 6.10.- EFECTO DEL TIEMPO DE POST-HIDROLISIS

TIEMPO (minutos)	% AZUCARES REDUCTORES
40	22.48
60	40.62
120	45.15

6.4.3. Efecto de la Dilución.-

La dilución del hidrolizado favorece la hidrólisis de los oligómeros para dar lugar a monómeros de glucosa. Se ha de buscar optimizar el volumen de dilución con la finalidad de minimizar el consumo de energía durante la post-hidrólisis y posteriormente cuando se realiza la concentración de los azúcares por evaporación.

Del gráfico 6.11 se concluye que la dilución óptima será 10 veces el peso del hidrolizado observándose que pa

ra valores menores comprendidos entre 5 y 10 el rendimiento aumenta con el volumen de dilución debido a que la difusión de los oligómeros al seno del líquido y la concentración del ácido permiten la reacción de oligómeros a monómeros reductores la cual se inhibe con volúmenes de dilución mayores debido principalmente a la baja concentración del ácido presente.

Las condiciones de operación óptima seran:

Volumen de dilución = 10
 Tiempo de post-hidrólisis = 1 hora
 rendimiento = 40.62 %

CUADRO 6.11. EFECTO DE LA DILUCION

Volumen de Dilución	% de Azúcares Reductores
5	24.25
10	40.62
20	34.05

6.5. NEUTRALIZACION

Como se sabe la fermentación ocurre en medios relativamente neutros, a pH comprendidos entre 4.5 hasta 8.0 (20). El hidrolizado proveniente de la última etapa, la post-hidrólisis, tiene una reacción ácida, por lo que es necesario efectuar una neutralización; cuenta además con sustancias húmicas generadas por la reacción de la lignina con el ácido sulfúrico, y diversos ácidos derivados de la descomposición de los azúcares a temperaturas elevadas en medio ácido. Por lo tanto es necesario un tratamien-

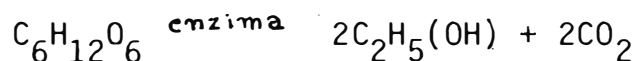
to con agentes especiales que separen en su mayor parte estos elementos.

La neutralización se puede efectuar con cualquier compuesto alcalino, a nivel industrial se lleva a cabo por lo general con cal mineral (CaO), debido a su bajo costo, aunque presenta una desventaja que se debe tomar en cuenta, suele dejar en el medio cantidades grandes de sulfato de calcio (equilibrio químico), potencialmente tóxicas para un crecimiento aceptable. La neutralización se llevó a cabo con cal mineral finamente molida hasta obtener un pH final de 4.5. Luego fue calentado a ebullición para permitir la precipitación completa de sulfato de calcio, la mezcla fue enfriada y filtrada en filtro de vacío. La solución cristalina resultante fue tratada con acetato de plomo, que precipita las ceras en su mayor parte. La solución filtrada nuevamente, se encuentra apta para su posterior fermentación.

6.6. ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA FERMENTACION

6.6.1. Criterios Generales.-

La fermentación es la etapa en la cual los azúcares reductores (Fermentables) bajo la acción de una levadura son transformados en alcohol etílico y CO₂ de acuerdo a la siguiente reacción:



Las etapas anteriores han tenido por finalidad conseguir una solución azucarada con la mínima cantidad de inhibidores, de tal forma que estos no inhiban la acción enzimática sobre los azúcares. El hidrolizado previamente es tratado llevándolo al pH adecuado y agregándoles

los nutrientes necesarios. La levadura usada fue la SACHAROMICES CEREVISIAE ATCC 4126 que es específica para la producción de alcohol, a un pH de 5 y a la T° de 30°C. El presente estudio tiene por finalidad el conseguir una fermentación Batch mediante el uso de una cepa específica con mínima producción de subproductos y la propagación en un medio de cultivo altamente nutritivo, dado que de la cepa usada se tiene poca información se han establecido las curvas de crecimiento poblacional y la velocidad específica de crecimiento en un medio al 4% de glucosa, estos datos nos permitirán caracterizar el inóculo a ser usado durante la fermentación, también se determinará la velocidad de formación de producto y consumo de sustrato que permitirán seguir el curso de la fermentación tanto a nivel de producto como de sustrato.

Los estudios y cálculos de las velocidades de producción celular, formación de producto y consumo de sustrato constituyen la base para establecer la cinética de la reacción de fermentación.

6.6.2. Curva de Crecimiento Celular.-

Estas curvas nos permitirán caracterizar el comportamiento celular de la Sacharomices Cerevisiae ATCC 4126 a las condiciones de pH y T° elegidas, en diferentes medios de cultivo. Estos medios contienen fuentes de nitrógeno, oxígeno, carbono, hidrógeno, necesarias para el crecimiento celular. En algunos medios estos van acompañados de otros factores de crecimiento como sales de so-

dio, sulfato de magnesio, extracto de levadura, fosfatos, etc.

El mejor medio de cultivo será aquel que nos da una mayor concentración de masa celular en el mismo tiempo, sin embargo dicho medio puede resultar antieconómico, por lo que se hace necesario probar con medios más simples y económicos que contengan la mínima cantidad de nutrientes y cofactores.

6.6.2.1.- En el medio Saborau.

Es el medio más usado en los laboratorios, considerado como el medio standar para el estudio del crecimiento celular y uno de los más nutritivos ya que contiene extracto de levadura y fitona.

Su composición es la siguiente:

	% Peso
Glucosa	4.0
Fitona	1.0
Extracto de levadura	0.5
Agua destilada	94.5
	<hr/>
	100.0

la curva de crecimiento poblacional está representada por la curva 1 del gráfico 6.12 (cuadro 6.12) la técnica de cultivo de la cepa se halla en el apéndice G.

CUADRO 6.12

COMPORTAMIENTO DEL CRECIMIENTO POBLACIONAL EN EL MEDIO SABURAUD, EL MEDIO SIMILAR AL HIDROLIZADO, Y EN EL MEDIO HIDROLIZADO EXPERIMENTAL.

Tiempo (Horas)	Log (No/ml) Medio Saburaud	Log (No/ml) Similar Hidrolizado	Log(No/ml) Medio Experimental
0	7.30	6.9	6.90
1	7.30	7.00	
2	7.36	7.00	
3	7.51	7.00	
4	8.27	7.08	
5	9.27	7.75	
6	10.30	8.68	7.00
7	11.26		7.81
8	12.15	10.57	8.58
9	13.12		9.57
10	14.20	12.55	10.30
11	15.11		11.20
12	16.00	14.52	12.00
13	16.95		12.92
14	17.86	16.19	13.55
15	18.90		14.50
16	19.92	18.30	15.26
17	20.79		
18	21.75	20.05	16.97
19	22.20	20.95	
20	22.28	21.62	18.54
21	22.20	21.90	
22	22.12	21.83	20.34
23			
24			21.36
25			21.50
26			21.40
27			20.83

Del gráfico 6.12, podemos determinar:

Tiempo "Lag" o Fase de latencia : 3 hr
Concentración inicial de levadura : $10^{7.3}$ colonias/ml
Tiempo de inicio de fase estacionaria : 20 hrs.

6.6.2.2. En el Medio Juffy.-

Medio que se eligió con la finalidad de detectar la posible presencia de inhibidores los cuales retardarían el crecimiento celular. Este medio es similar al medio hidrolizado y su composición es la siguiente:

	% Peso
Glucosa	4.0
Urea	0.80
Fosfato disódico	0.40
Agua destilada	94.80
	<hr/>
	100.00

Se realizaron experimentos con cantidades menores de úrea y fosfato (7), pero en la misma relación con la siguiente composición:

Glucosa	4.00
Urea	0.04
Fosfato disódico	0.02
Agua destilada	95.94
	<hr/>
	100.00

Observándose que el crecimiento era nulo. La composición final de úrea y fosfato fueron elegidas de acuerdo a las condiciones de trabajo que sigue Sociedad Paramonga. Del gráfico 6.12, podemos determinar:

Fase de latencia = 4 hrs.
Conc. Inicial de levadura = $10^{6.9}$ colonias/ml

Tiempo de Inicio de Fase Estacionaria = 21 hrs.

6.6.2.3. En el Medio Hidrolizado

El medio hidrolizado de la fermentación es aquel al cual se le han agregado las fuentes de nitrógeno; carbono. oxígeno, hidrógeno y fosfato en el mismo porcentaje que en el medio Juffy.

La composición es la siguiente:

	% Peso
Glucosa	4.00
Urea	0.80
Fosfato Disódico	0.40
Agua destilada	<u>94.80</u>
	100.00

De la curva 3 de la Fig. 6.12, se tiene que:

Lag(Fase de Latencia) = 6 horas

Concentración celular = $10^{6.9}$ colonias/ml

Tiempo de inicio de

Fase Estacionaria = 25 horas.

6.6.2.4. Observaciones

Del gráfico de la Fig. 6.12, observamos que la fase de latencia es menor; la fase logarítmica tiene una pendiente mayor, y una duración menor, cuanto más favorables sean las condiciones para el desarrollo celular.

	Medio Sabraud	Medio Juffy	Medio Hidrolizado
Tiempo de fase de latencia (hrs)	3	4	6
Tiempo de fase logarítmica (hrs)	17	17	19
# colonias/ml a las 20 horas	$10^{22.3}$	$10^{21.6}$	$10^{18.6}$

El medio Saborau es por su composición el medio más favorable para la fermentación, y es en este medio donde se logra una mayor concentración celular durante la fase logarítmica.

El medio Juffy y el medio hidrolizado tienen composición similar y han sido inoculados con la misma concentración celular inicial. Las diferencias en cuanto a tiempo de fase de latencia, tiempo de fase logarítmica y concentración celular final, se deben a la presencia de agentes inhibidores inherentes al medio hidrolizado.

6.6.3. Cálculo de las Velocidades específicas K_s y μ_M

Del gráfico de la Fig. 6.13 (Cuadro 6.13) obtenemos las pendientes:

$$(4\%) = (2.3025)(\text{Pend.}4\%) = (2.3025)(0.845) = 1.934 \text{ hr}^{-1}$$

$$(8\%) = (2.3025)(\text{Pend.}8\%) = (2.3025)(0.965) = 2.222 \text{ hr}^{-1}$$

De la ecuación (5.1) ecuación de Monod.

$$\mu = \frac{\mu_M S_0}{K_s + S_0}$$

Reemplazando valores:

$$a) 1.934 = \frac{\mu_M 4}{K_s + 4}$$

$$b) 2.22 = \frac{\mu_M 8}{K_s + 8}$$

resolviendo para μ_M y K_s obtenemos:

$$\mu_M = 2.6109 \text{ 1/hora}$$

$$K_s = 1.40 \text{ gr azúcar/100 ml solución}$$

reemplazando en la ecuación 5.1

$$\mu = 2.6109 \cdot \frac{S_0}{1.4 + S_0}$$

Esta ecuación nos permite evaluar la velocidad específica del crecimiento celular. Para distintas concentraciones de sustrato limitante S_0 :

CUADRO 6.13

CRECIMIENTO CELULAR PARA CONCENTRACIONES DE SUSTRATO INICIAL
DE $S_0 = 4\%$ y $S_0 = 8\%$

Tiempo	$S_0 = 4\%$		$S_0 = 8\%$	
	Conc.celular No/ml	$\text{Log}\left(\frac{N_0}{m\text{l}}\right)$	Conc.celular No/ml	$\text{Log}\left(\frac{N_0}{m\text{l}}\right)$
0	6.30×10^6	6.80	4.17×10^6	6.62
1	9.30×10^7	6.97	8.30×10^6	6.92
2	1.00×10^7	7.00	8.30×10^6	6.92
3	1.00×10^7	7.00	8.50×10^6	6.93
4	1.15×10^7	7.06	8.50×10^6	6.93
5	1.15×10^7	7.06	8.50×10^6	6.93
6	1.20×10^7	7.08	1.78×10^7	7.25
7	6.46×10^7	7.81	2.19×10^8	8.34
8	4.47×10^8	8.65	2.04×10^9	9.31
9	1.48×10^9	9.17	1.23×10^{10}	10.09
10	1.26×10^{10}	10.10	1.41×10^{11}	11.15
11	1.66×10^{11}	11.22	1.00×10^{12}	12.00
12	1.00×10^{12}	12.00	1.26×10^{13}	13.20

Intercepto	1.79	0.545
Pendiente	0.845	0.965
Coeficiente de correlación "r"	0.995	0.999

6.6.4. Cinética del Crecimiento Celular

En la ecuación (5.14) del capítulo 5

$$X = X_0 e^{\mu_M \left(\frac{S_0}{K_s + S_0} \right) (t - t_0)}$$

reemplazamos los valores obtenidos experimentalmente en el capítulo 6.6.3.

$$\mu_M = 2.6109 \text{ 1/hora}$$

$$K_s = 1.40 \text{ gr de azúcar/100 ml de solución}$$

Obtenemos:

$$X = X_0 e^{2.6109 \left(\frac{S_0}{1.40 + S_0} \right) (t - t_0)} \quad (6.1)$$

Considerando que los valores de μ_M y K_s han sido obtenidos en el rango de concentración de sustrato inicial S_0 comprendido entre 4% y 8%. Esta ecuación será válida en dicho rango. Del gráfico N° 6.13; se puede observar que la correspondencia entre los puntos experimentales y la línea estimada, es aceptable en el rango de 6 horas hasta las 25 horas, en este rango se tiene una velocidad específica de crecimiento constante.

Particularizando aún más esta ecuación, reemplazaremos $X_0 = 10^{6.9}$, y $t_0 = 6$ horas (tiempo de fase "lag") obtenida del gráfico de la Fig. 6.13. Obtendremos:

$$X = 10^{6.9} e^{\frac{2.61 S_0}{1.40 + S_0} (t - 6)} \quad (6.2)$$

donde "X" está dada en número de células/ml

6.6.5. Cinética del Consumo de Sustrato

Observemos la ecuación (5.18)

$$- \ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = K \mu_{\text{máx.}} \frac{S_0}{K_s + S_0} (t - t_0)$$

Anteriormente habíamos calculado en el capítulo (6.6.3) $\mu_{\text{máx}} = 2.6109$ y $K_s = 1.40$. Faltaría determinar el valor de la constante K.

Tomemos de la Fig. 6.14 las pendientes calculadas para los valores tabulados de $\ln\left(\frac{S}{S_0}\right)$ (Cuadro 6.14)

Obtenemos:

$$\text{Pendiente (4\%)} = 0.1413$$

$$\text{Pendiente (8\%)} = 0.1683$$

Además, en la ecuación (5.18) observamos que cada pendiente es función de S_0 de la siguiente forma:

$$\text{Pendiente} = K \mu_{\text{máx}} \frac{S_0}{K_s + S_0}$$

Así para $S_0 = 4\%$, obtenemos:

$$0.1413 = K (2.6109) \frac{4.0}{1.40 + 4.0}$$

$$K_{4\%} = 0.073$$

Para $S_0 = 8\%$

$$0.1683 = K (2.6109) \frac{8.0}{1.40 + 8.0}$$

$$K_{8\%} = 0.076$$

Si se toma el valor promedio, obtenemos para K

$$K = 0.0744$$

Reemplazando todos estos valores en la ecuación (5.18) obtenemos:

$$-\ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = (0.0744) (2.6109) \frac{S_0}{1.40 + S_0} (t - t_0)$$

$$-\ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = 0.1942 \frac{S_0}{1.40 + S_0} (t - t_0) \quad (6.3)$$

Esta ecuación relaciona a "S", únicamente como función de

CUADRO 6.14

VALORES OBSERVADOS DE S (Concentración de glucosa) CON RESPECTO
AL TIEMPO (PARA $S_0 = 4\%$ y $S_0 = 8\%$)

Tiempo horas	S gr azúcar/100 ml	$-\ln\left(\frac{S}{S_0}\right)$	S gr azúcar/100 ml	$-\ln\left(\frac{S}{S_0}\right)$
8	2.90	0.32	5.47	0.38
10	2.31	0.55	4.22	0.64
12	1.852	0.77	3.19	0.92
14	1.23	1.18	2.18	1.30
16	0.92	1.47	1.38	1.76
18	0.76	1.66	0.98	2.10
20	0.57	1.95	0.725	2.40
22	0.43	2.24	0.56	2.65

CUADRO 6.15

COMPORTAMIENTO DEL CONSUMO DE SUSTRATO
DURANTE LA FERMENTACION (S = 4% Y S = 8%)
VALORES CALCULADOS

TIEMPO (horas)	CONCENTRACION S = 4%	(gr/100ml) S = 8%
0	4.00	8.00
6	4.00	8.00
8	3.05	5.30
10	2.32	4.13
12	1.75	3.19
14	1.25	2.18
16	1.00	1.40
18	0.75	0.98
21	0.50	0.74
22	0.48	0.58

So y t, y tendrá validez en el rango de 4% al 8%.

La gráfica de esta ecuación, junto a los valores observados se muestran en el gráfico 6.15. Podemos mencionar aquí que esta ecuación no tiene validez para tiempos mayores a 22 horas (fuera de la fase de crecimiento logarítmico) si este fuera el caso tanto " μ " como " μ_s " tomarían valores iguales a cero.

6.6.6. Cinética de la formación de Producto

Revisemos la ecuación N°(5.20) para P.

$$P - P_0 = K_p \left(\mu_m \frac{S_0}{K_s + S_0} \right)^\alpha (t - t_0)$$

Al tener dos variables K_p y α , necesitaremos dos ecuaciones simultáneas para resolverla.

De los datos tabulados en el cuadro N° 6.16, obtenemos:

$$\text{Pend. 8\%} = 0.2079 = K_p \left(2.6109 \times \frac{8.0}{1.40 + 8.0} \right)^\alpha$$

$$\text{Pend. 4\%} = 0.0971 = K_p \left(2.6109 \times \frac{4.0}{1.40 + 4.0} \right)^\alpha$$

Dividiendo estas expresiones obtenemos:

$$\alpha = 5.485$$

Reemplazando este valor en la primera expresión, obtenemos:

$$K_p = 0.0026$$

Sustituyendo estos valores obtenidos en la ecuación (5.20) obtenemos:

$$P - P_0 = 0.0026 \left(2.6109 \frac{S_0}{1.40 + S_0} \right)^{5.485} (t - t_0) \quad (6.4)$$

donde "P" está dado en gr de alcohol/100 ml de solución.

Esta ecuación relaciona la concentración de producto para cual

CUADRO 6.16

COMPORTAMIENTO DE LA FORMACION DE PRODUCTO ALCOHOL
 DURANTE LA FERMENTACION (S = 4% Y S = 8%)
 VALORES OBSERVADOS

TIEMPO (horas)	CONCENTRACION (gr/100ml)	
	S = 4%	S = 8%
0	0.00	0.00
3	0.50	0.50
10	0.48	0.95
12	0.69	1.35
14	0.75	1.61
16	1.00	1.97
18	1.20	2.64
20	1.35	2.86
22	1.60	3.37
24	1.70	3.62
26	1.68	3.57

quier concentración inicial de sustrato (S_0) y un tiempo t de terminado. A su vez sólo es válida en el período de crecimiento logarítmico.

6.6.7. Determinación Gráfica de la Presencia de Inhibidores en el Hidrolizado.-

La presencia de inhibidores se manifiesta en el aumento de la fase de latencia y la disminución de la velocidad específica de la levadura en el medio.

Del gráfico 6.17 comparando el medio hidrolizado con el medio similar al hidrolizado, observamos que la fase de latencia del medio hidrolizado aumenta de 4 a 6 horas y su velocidad específica disminuye de 2.22 a 1.934 hr^{-1} .

De acuerdo a esto podemos concluir de que el medio hidrolizado presenta inhibidores.

CAPITULO VII

7.- RESIDUOS Y SUB-PRODUCTOS DEL PROCESO Y APROVECHAMIENTO (7)

La obtención de alcohol a partir de madera da origen a diversos residuos y sub-productos; estos residuos pueden ser aprovechados de tal forma que pueden ser producidos o transformados en productos de gran valor comercial.

La construcción de fábricas pequeñas integradas a los de etanol para la recuperación de sub-productos, tornan el proceso mas económico y disminuyen sensiblemente el costo de producción de alcohol.

7.1. Residuos Generales por el Proceso:

- Pre hidrólisis: El ácido sulfúrico utilizado en esta operación permite la extracción y los azúcares reductos como Xilosa y Arabinosa provenientes de la hidrólisis de las hemicelulosas. Esta operación permite también lavar la madera de la tierra que pueda contener, los cuales posteriormente sedimentarán.
- Hidrólisis: El principal residuo producido es la lignina. Ella constituye el producto secundario más importante de la sacarificación de la madera. La lignina es un conjunto más estable que no es afectado por el ácido sulfúrico o por los agentes químicos usados en el proceso. En el proceso se obtiene una lignina con una humedad del 70%
- Neutralización: La neutralización del hidrolizado con carbonato de calcio y cal da una solución clarificada separándose por filtración una lama, Conteniendo sulfato de calcio con 50% de humedad.

- Fermentación: Una vez terminada la fermentación del mosto queda un residuo en el fondo del fermentador que básicamente contiene células de levadura tanto vivas como muertas. Durante la fermentación se libera continuamente CO₂ gaseoso.
- Destilación: El principal residuo es la viñaza, estas contienen pentosas fermentadas, cenizas azúcares reductores, ácidos volátiles, etc.

Este residuo es el mas serio problema entre todos los residuos generados por el proceso ya que son nocivos para la vida acuática.

7.2. Aprovechamiento y/o tratamiento de los Residuos

La Lignina: Aprovechando químicamente la lignina es posible disminuir el costo de producción de etanol ya que ésta constituye una fuente potencial de compuestos reactivos que de producidos eficientemente pueden tomarse este sub-producto más valioso que como combustible. La lignina puede ser utilizada como combustible del propio proceso, disminuyendo su humedad al 15%, se ha encontrado un amplio campo de operación en la fabricación de resinas artificiales fenolaldehido, en la preservación de las raíces de plantas contra el ataque de concentraciones salinas muy elevadas debido a la capacidad de absorber las bases.

La utilización de la lignina carbonizada de la hidrólisis como "coque" viene siendo estudiado por los investigadores, las conclusiones en este sentido permiten el uso de los briquetes carbonizados en la producción de tipos especiales de hierro esponja, hierro gusa, etc. en sustitución

ción de coque, siendo un reductor de alta calidad metalúrgica; la fabricación de coque tornaría posible la obtención de alcohol a costos bastantes bajos.

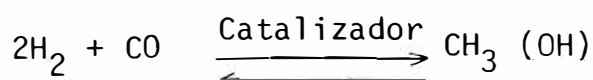
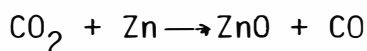
- Pre-Hidrolizado: Solución líquida constituida básicamente por pentosas como arabinosas y xilosas y en menor proporción extractivos, ceras, gomas, etc.

Este prehidrolizado puede aprovecharse para obtener un conjunto intermedio mediante acción enzimática para posteriormente ser transformada por la levadura en alcohol.

El método básicamente consiste en usar una enzima glucosa Isómerasa que actúa sobre las xilosas transformándolas en un isómero de la glucosa; éstos a su vez son fácilmente fermentables por las levaduras cerveceras como Saccharomices que fermentan tanto la glucosa y el Isómero de la glucosa.

Otra alternativa sería usar una "tórula utilis" para fermentar las pentosas directamente a alcohol.

- Bióxido de carbono: El CO_2 es desprendido durante la fermentación. Su recuperación no siempre es económico, el CO_2 líquido no puede ser almacenado porque representa una inversión de capital muy alta en cilindros, sin embargo puede recuperarse parte del CO_2 de las usinas y venderlo a alguna subsidiaria para ser recuperado en algún caso se usa para síntesis de metanol de acuerdo a la reacción.

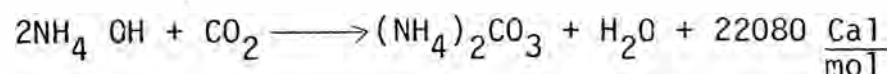
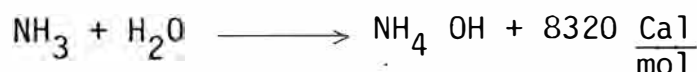


El monóxido reacciona con el hidrógeno a alta temperatura y presión.

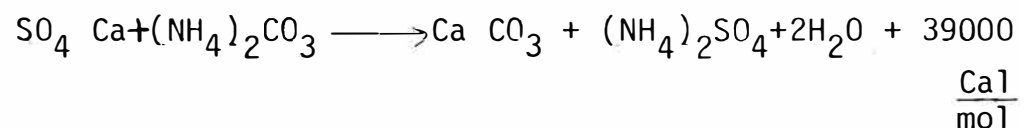
- Sulfato de Calcio: El sulfato de calcio tiene poca utilidad, constituyendo un problema; una posible solución sería la utilización de un Agente neutralizante diferente del Ca CO_3 ó CaI que pudiese ser recuperado y permitiese un reciclado de ácido sulfúrico; otra solución sería el desarrollo de microorganismos capaces de fermentar un medio ácido.

Una posibilidad bastante interesante sería la producción de fertilizantes (Sulfato de Amonio) a través del proceso "Merbemburg" que se basa en la reacción entre carbonato de amonio y sulfato de calcio obteniéndose sulfato de amonio y carbonato de calcio usado en el proceso.

La 1era. etapa: Obtención de carbonato de amonio a partir de amoniaco y dióxido de carbono.



2da. etapa: Producción de sulfato de amonio



- Levadura: El aprovechamiento de la levadura después de una debida recuperación consta de:

a).- Partiendo del vinoto.. después de la decantación, el lodo de células mientras es tratado por el ácido sulfúrico y sirve para alimentar los mostos de fermentación.

b).- Partiendo del mosto.. recolectando las células de levadura que son purificadas por lavado, decantadas y finalmente prensadas.

Vinoto: El aprovechamiento de la viñaza puede ser llevado a cabo mediante aplicaciones como:

A).- Abono.- debido a su alto contenido teórico de potasio fósforo y Nitrógeno.

B).- Alimento Animal.- debido a su gran valor nutritivo.

C).- Recuperación de Pentosas: Las pentosas recuperadas pueden ser vendidas para la producción de furfural.

CAPITULO VIII

8. BALANCE DE INSUMOS Y PRODUCTO

Este balance se hizo tomando como referencia, 100 gr de material (aserrín) seco, el que contenía 31.58 gr de agua (24% humedad con respecto al peso total).

Para la prehidrólisis se emplea ácido sulfúrico de 97.7% en peso el que es diluído con agua, y luego mezclado con el material húmedo. De modo que se obtiene una relación 1 a 1 entre el peso de ácido y el agua total al peso de material seco.

El lavado se realiza con un peso de agua igual a 10 veces el peso de material pre-hidrolizado. La mezcla resultante es filtrada, obteniéndose una solución de azúcares reductores y ácido principalmente.

El material lignocelulósico es evaporado con la finalidad que contenga sólo la humedad necesaria para que al ser mezclado con el ácido concentrado mantenga una relación de ácido y agua a material lignocelulósico seco de 3.

Durante la hidrólisis, se observa una evaporación de 40.63 gr de agua, que equivale a un 62% del agua presente en esta etapa.

Al material hidrolizado se le agrega 10 veces su peso total de agua. Durante la post-hidrólisis no se registra una pérdida apreciable por evaporación, ya que se hizo con un condensador de reflujo.

La mezcla resultante es filtrada, obteniéndose unos 3.2 li-

tros de solución ácida de azúcares reductores de 1.23% peso.

Esta mezcla es neutralizada con carbonato de Calcio. La mezcla resultante es nuevamente filtrada, obteniéndose un peso de 2,971 gr de líquido. Este líquido es llevado a ebullición a baja presión, hasta concentrar los azúcares desde 1.23% en peso hasta 3.25% en peso o su equivalente a 4.0 gr/100 ml.

La solución concentrada es tratada con oxalato de potasio para precipitar compuestos indeseables, durante la fermentación.

Para la fermentación se agregan 9.40 gr de úrea (0.80% peso) y 4.7 gr de fosfato disódico (0.4% peso), obteniéndose 16.88 gr de alcohol.

En resumen se tiene:

INSUMOS:

131.58 gr de material húmedo
(100.00 gr de material seco)
214.07 gr de ácido de 97.71% peso
5,117.29 gr de agua.
110.95 gr de CaCO_3
9.4 gr de úrea
4.7 gr de fosfato disódico

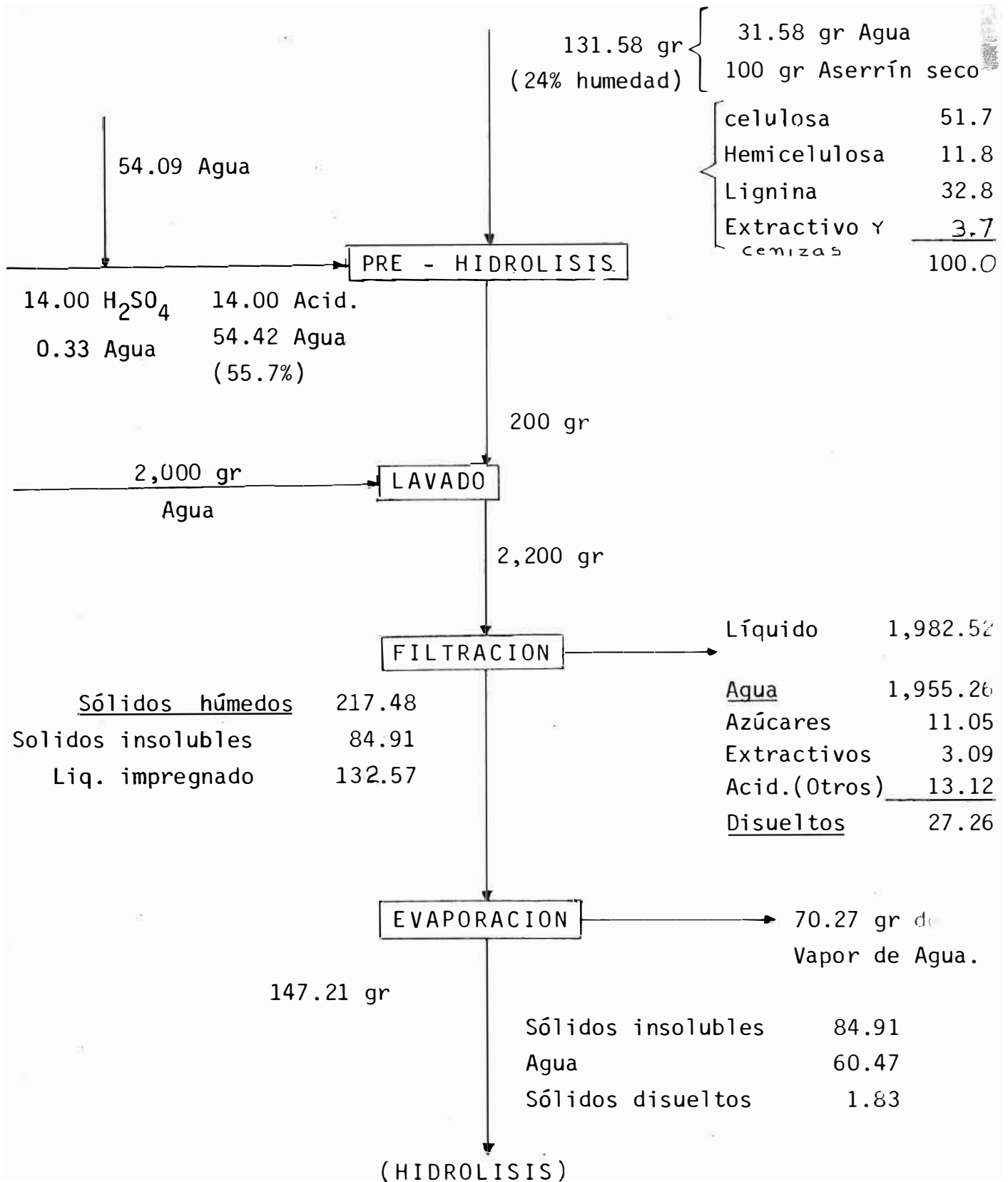
PRODUCTO

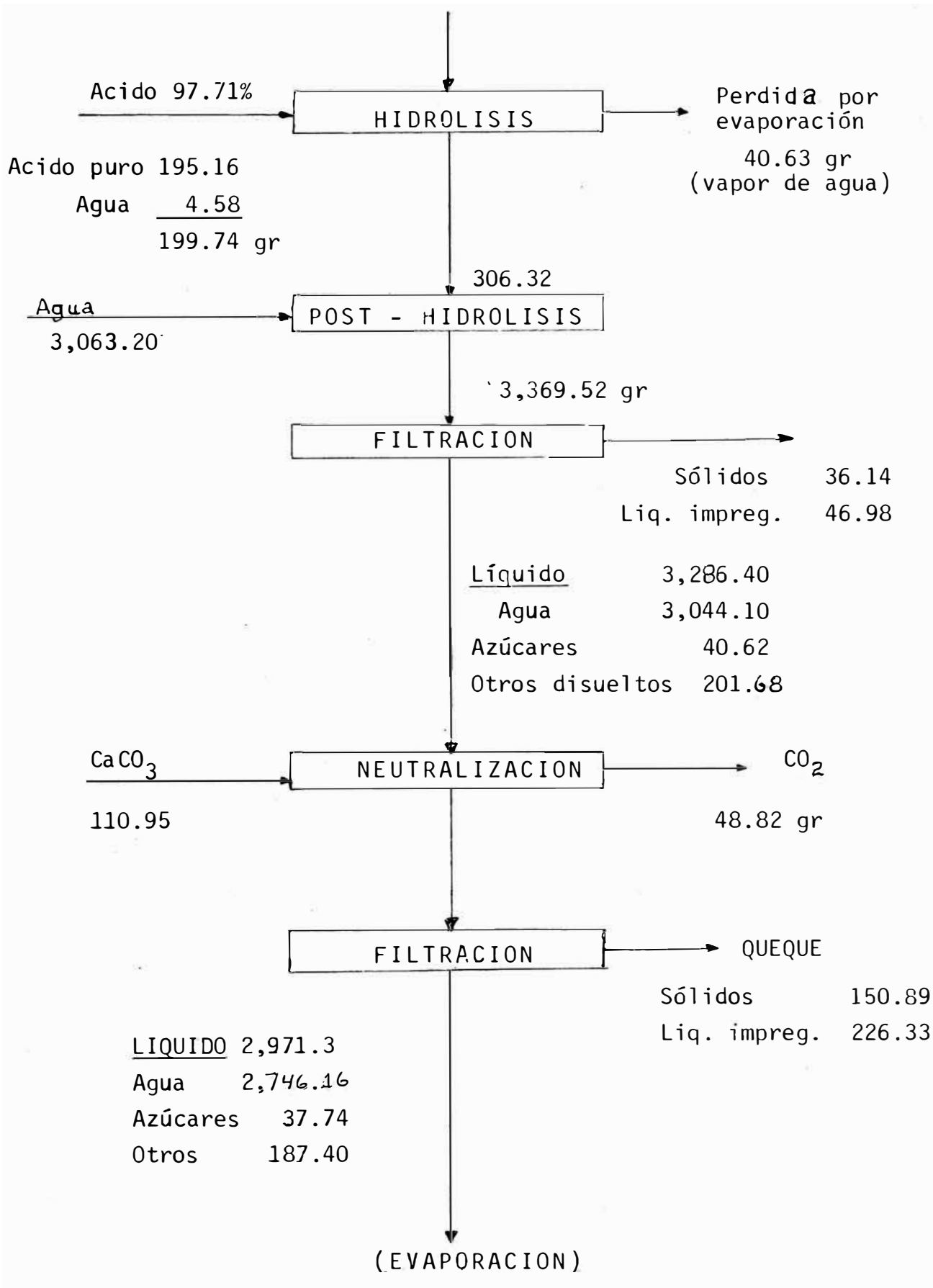
16.88 gr de alcohol

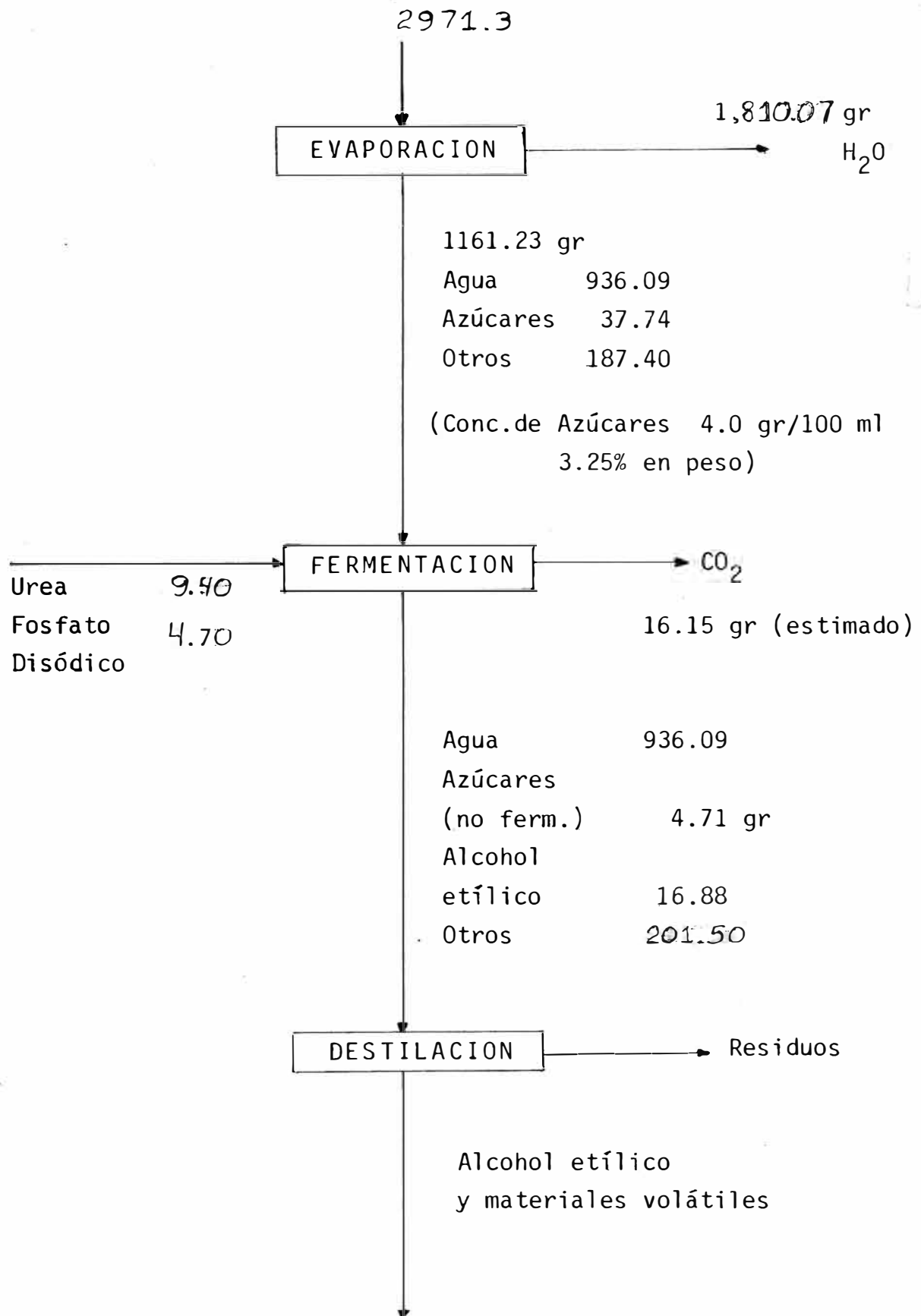
SUB-PRODUCTOS

11.05 gr de pentosas
48.82 gr de CO_2

BALANCE DE INSUMOS Y PRODUCTO







IX.- ALCANCES Y PROYECCIONES DE LA PRESENTE INVESTIGACION

A través del presente trabajo se ha demostrado la factibilidad del proceso de fermentación como una alternativa de producción de alcohol. Este proceso emplea tanto la acción química como la enzimática, y tiene como objetivo disminuir el consumo de energía en el mismo, obteniéndose alcohol etílico.

El uso de aserrín y otros desechos celulósicos en este proceso evita la acumulación de estos en los centros de aserrado que de otra manera serían utilizados como carbón o serían echados al río en su mayor parte, ocasionando problemas de contaminación.

El tratamiento del material mediante un tostado inicial (Roasting) facilita la acción del ácido concentrado, y mejora el rendimiento durante la fermentación, ya que la mayor parte de compuestos inhibidores de la fermentación han sido retirados en el lavado después del tostado. Las ventajas de este proceso biotecnológico radican en las siguientes etapas:

- A.- El aprovechamiento de recursos excedentes como el aserrín y el uso del ácido sulfúrico concentrado que se produce a un costo relativamente bajo en el país.
- B.- La implementación de una pre-hidrólisis que facilita la hidrólisis y la posterior fermentación de los azúcares.
- C.- El uso de temperaturas menores a 100°C elimina la necesidad de usar presiones mayores a la atmosférica.

Como desventajas podemos enunciar:

La cantidad excesiva de ácido sulfúrico para producir alcohol (10 Kg de ácido por cada lt. de alcohol).

Los trabajos futuros deberán estar encaminados a reducir los costos de proceso y mejorar los rendimientos en las distintas etapas.

Así nosotros sugerimos un estudio más amplio del efecto del tamaño de partícula durante la pre-hidrólisis.

Investigar la posibilidad de aplicar este proceso a otros tipos de especies vegetales, especialmente sobre desechos de mayor contenido de celulosa y menor contenido de lignina.

Efectuar los estudios para isomerizar la xilosa proveniente de la pre-hidrólisis y convertirla en xilulosa fermentable a etanol por la levadura que se ha utilizado.

Implementar el reciclaje de la solución ácida de xilosa proveniente de la pre-hidrólisis con la finalidad de obtener soluciones más concentradas para mejorar el rendimiento y el consumo de ácido sulfúrico en esta etapa.

Estudiar el efecto en rangos de temperatura menores durante la post-hidrólisis.

Evaluar el efecto de una permanencia prolongada de los azúcares fermentables en un medio ácido, con los resultados obtenidos, Evaluar la posibilidad de reciclar la solución ácida proveniente del lavado posterior a la hidrólisis, agregarle más ácido y utilizarla nuevamente en la hidrólisis obteniendo de esta manera soluciones más concentradas en azúcar fermentable.

Así mismo sería conveniente reciclar la solución proveniente de la post-hidrólisis y utilizarla nuevamente en el lavado posterior a la hidrólisis, obteniéndose soluciones más concentradas en azúcares fermentables.

Efectuar un reconocimiento cualitativo y cuantitativo de los posibles compuestos inhibidores de la fermentación.

Estudiar más ampliamente la influencia de la concentración inicial de azúcares fermentables durante la fermentación.

Estudiar la influencia del tamaño de inóculo o lo que es equivalente, la concentración inicial de levadura, se sabe que una mayor concentración inicial de ésta disminuye el tiempo de latencia.

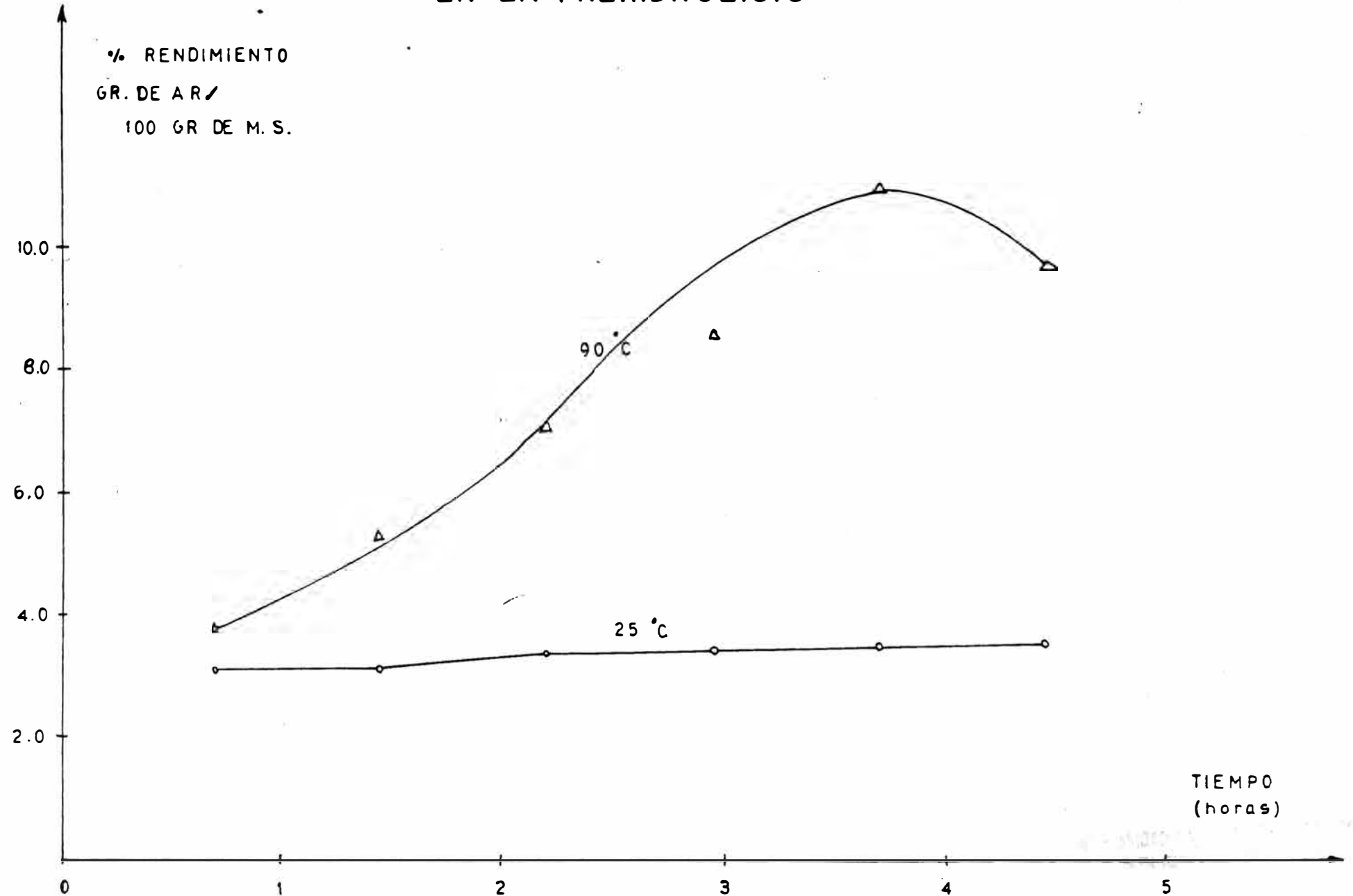
Evaluar la influencia de la inyección de aire estéril en el comportamiento del crecimiento poblacional.

Evaluar el efecto del uso de mayores cantidades de úrea y fosfato disódico durante la fermentación.

Evaluar el uso de otros factores nutrientes tales como sales de sodio, cobre, fierro y sulfatos.

Debemos también señalar que esta investigación biotecnológica para nosotros resultó ser inédita por la falta de información, pero creemos que se han sentado algunos hitos para que se puedan seguir desarrollando en base a las pruebas experimentales encontradas; en ese sentido dejamos la posta al grupo de investigación "Aprovechamiento de Recursos Naturales" que dirige el Ing. Edwin Dextre para que continúe con la línea emprendida.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA PREHIDROLISIS



INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ACIDO DURANTE LA PREHIDROLISIS

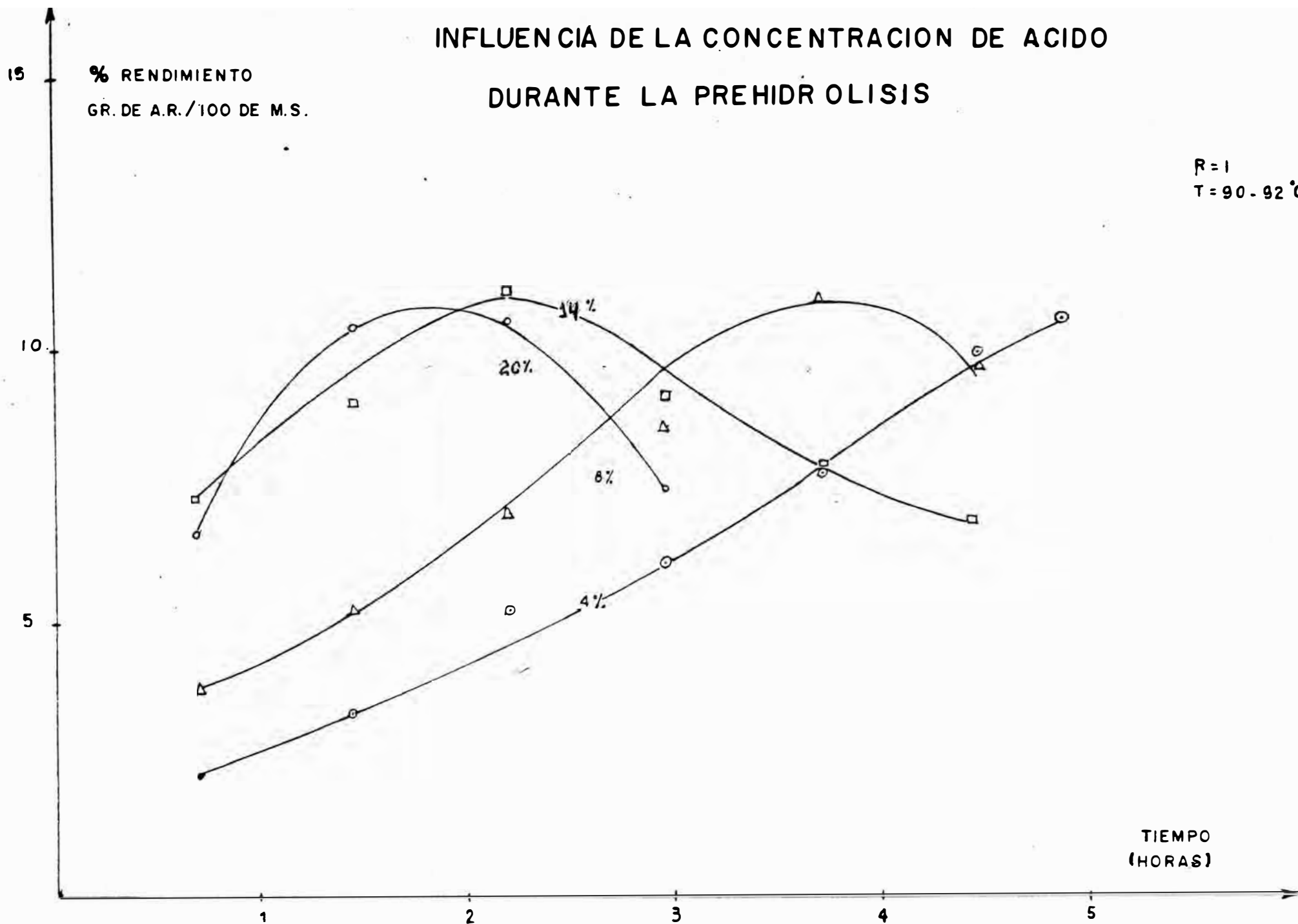


FIGURA 6.2

EFEECTO DE LA RELACION ACIDO MADERA EN LA PREHIDROLIS

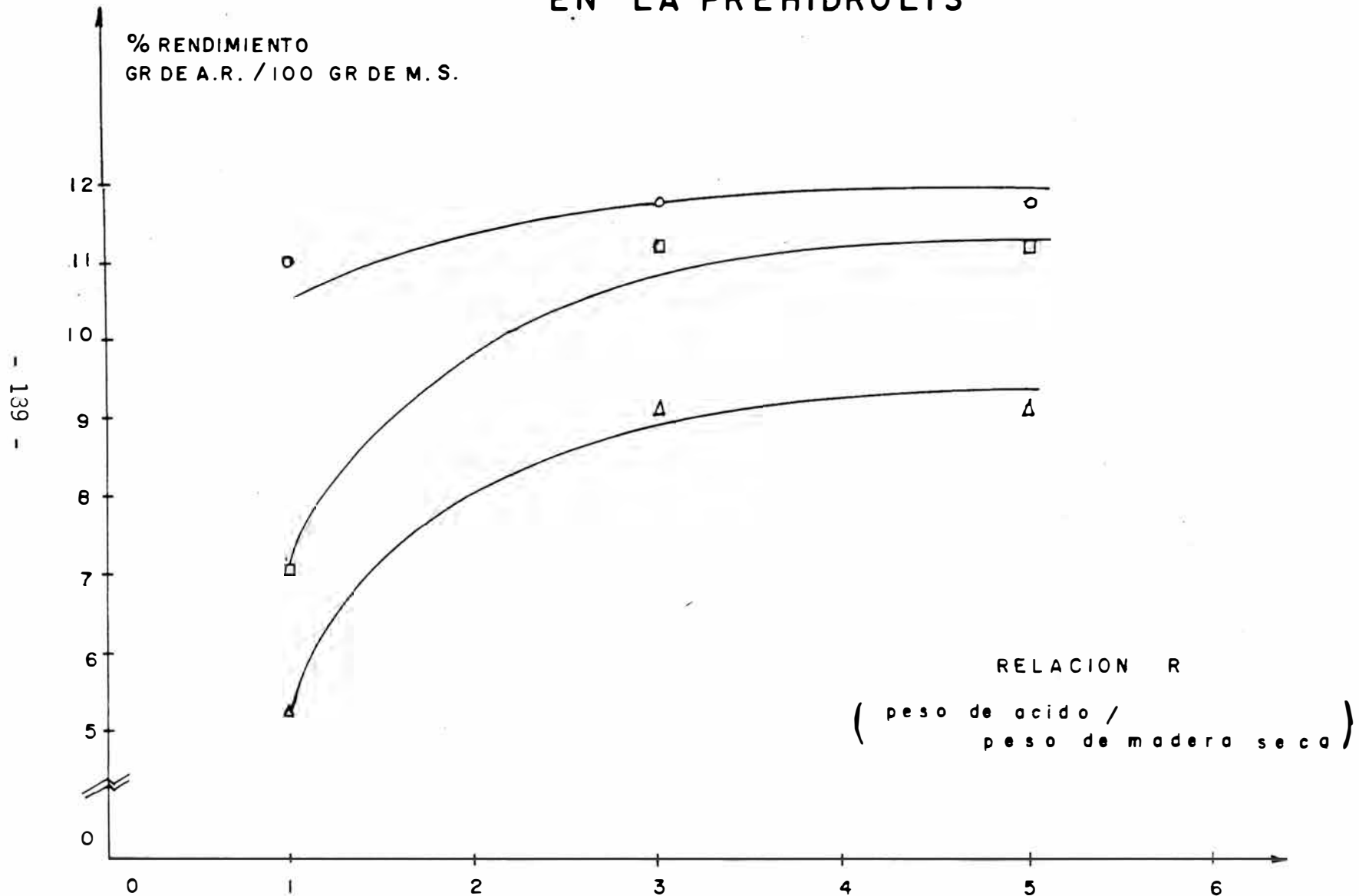


FIGURA 6.3

INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTICULA EN LA PREHIDROLISIS

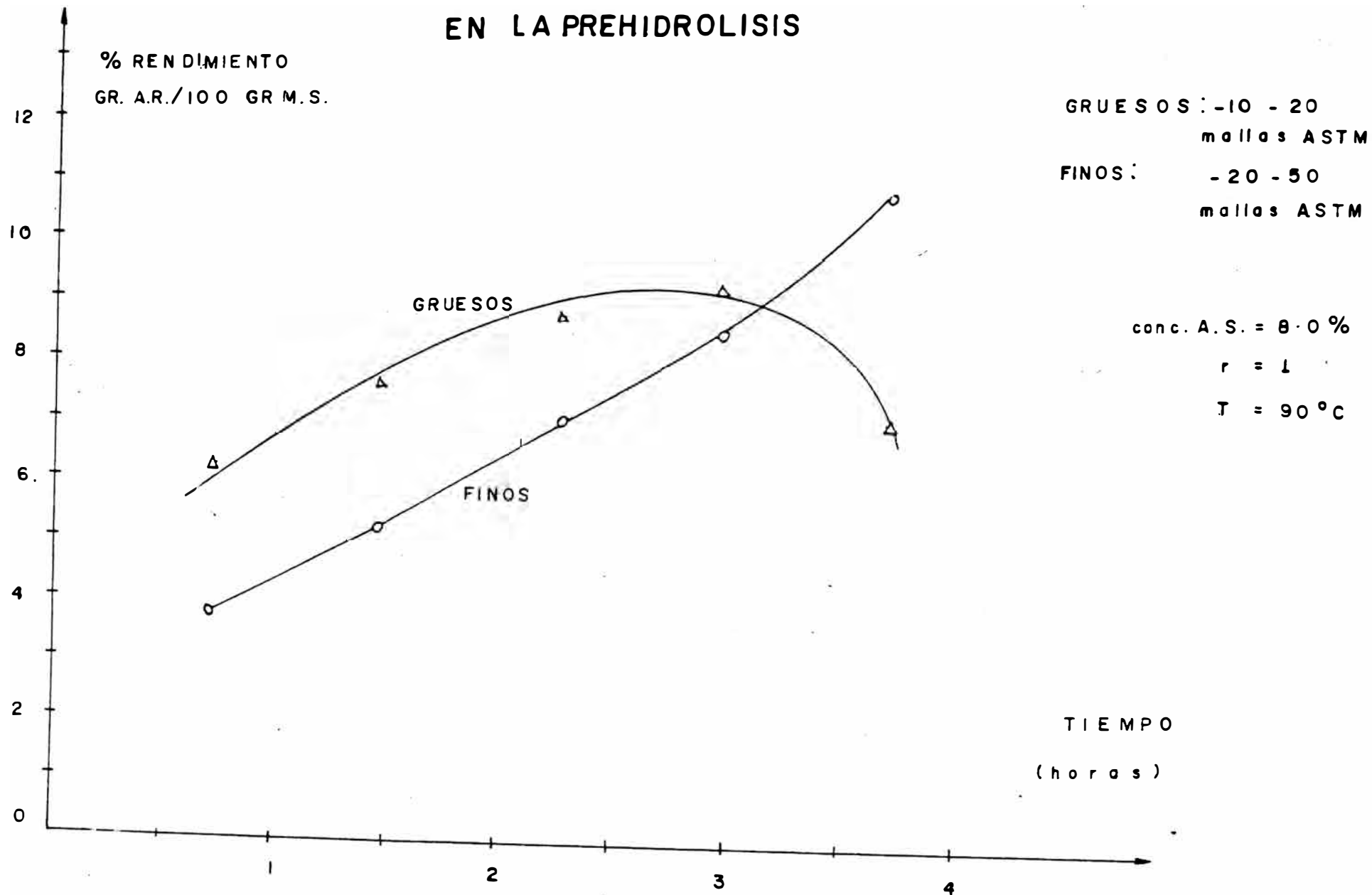
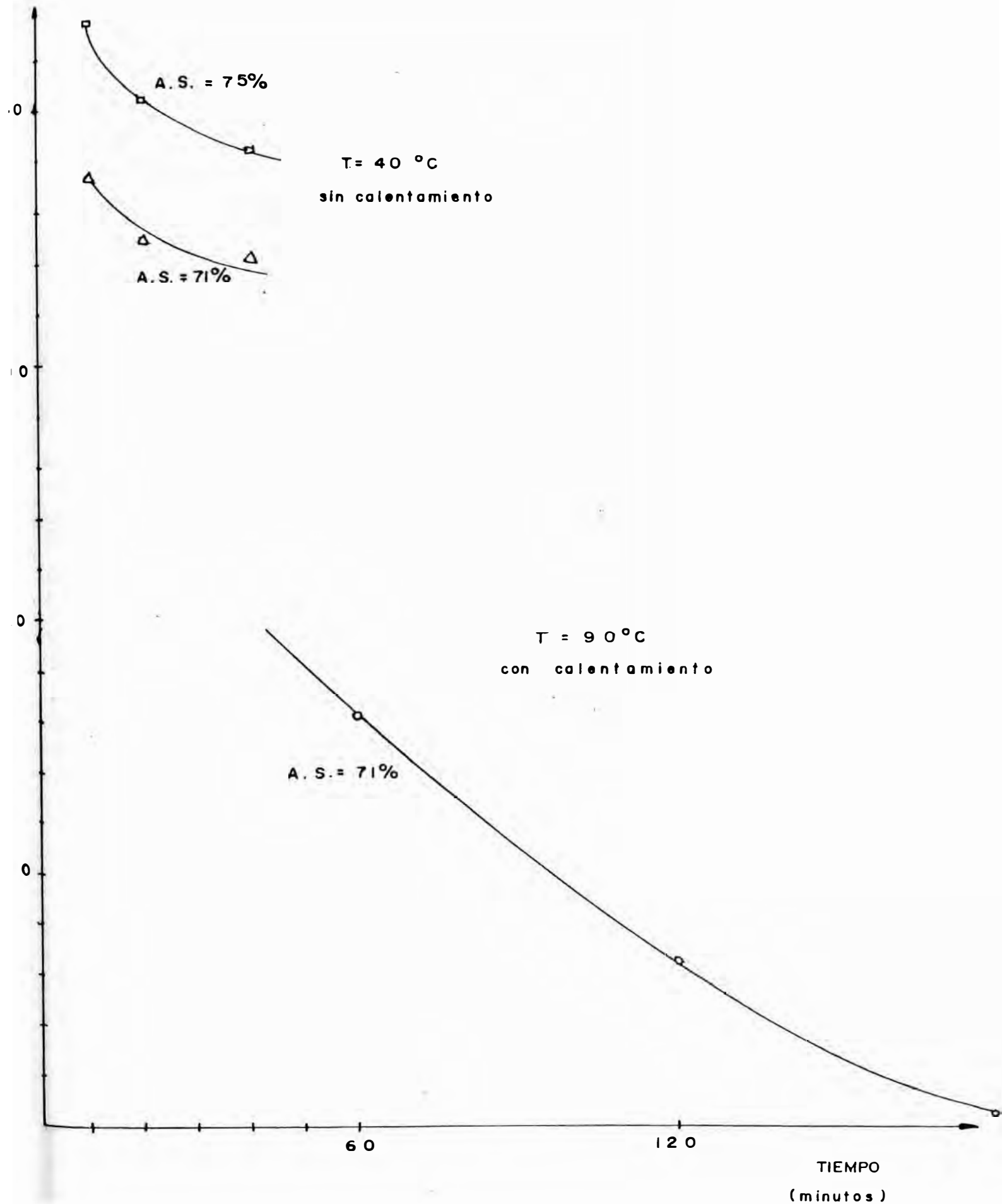


FIGURA 6.4

% A. R.
G de A. R. /100 M.S.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA HIDROLISIS



COMPORTAMIENTO DE LA TEMPERATURA DURANTE LA HIDROLISIS

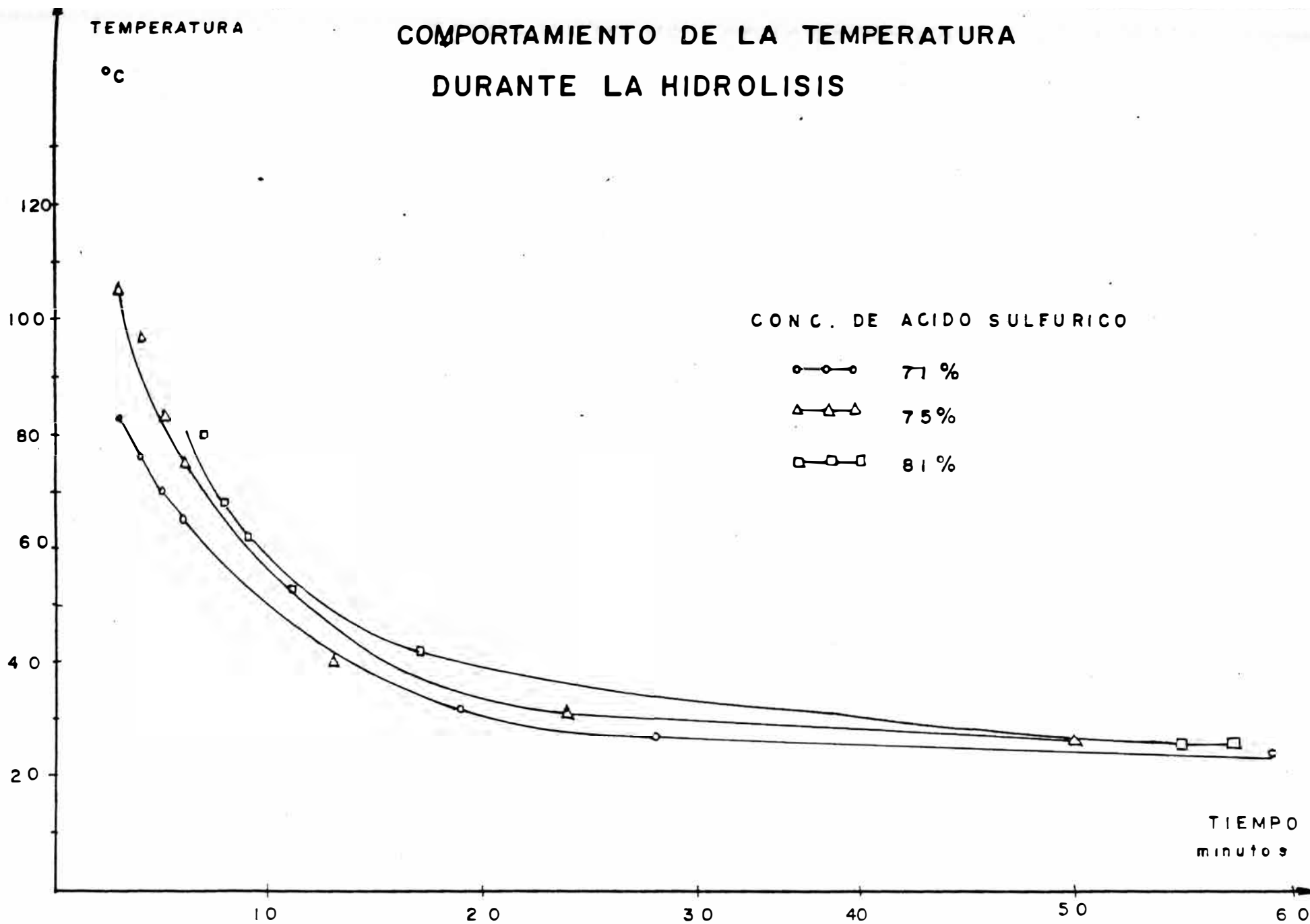


FIGURA 6.6

RENDIMIENTO VS. CONC. DE ACIDO EN LA HIDROLISIS

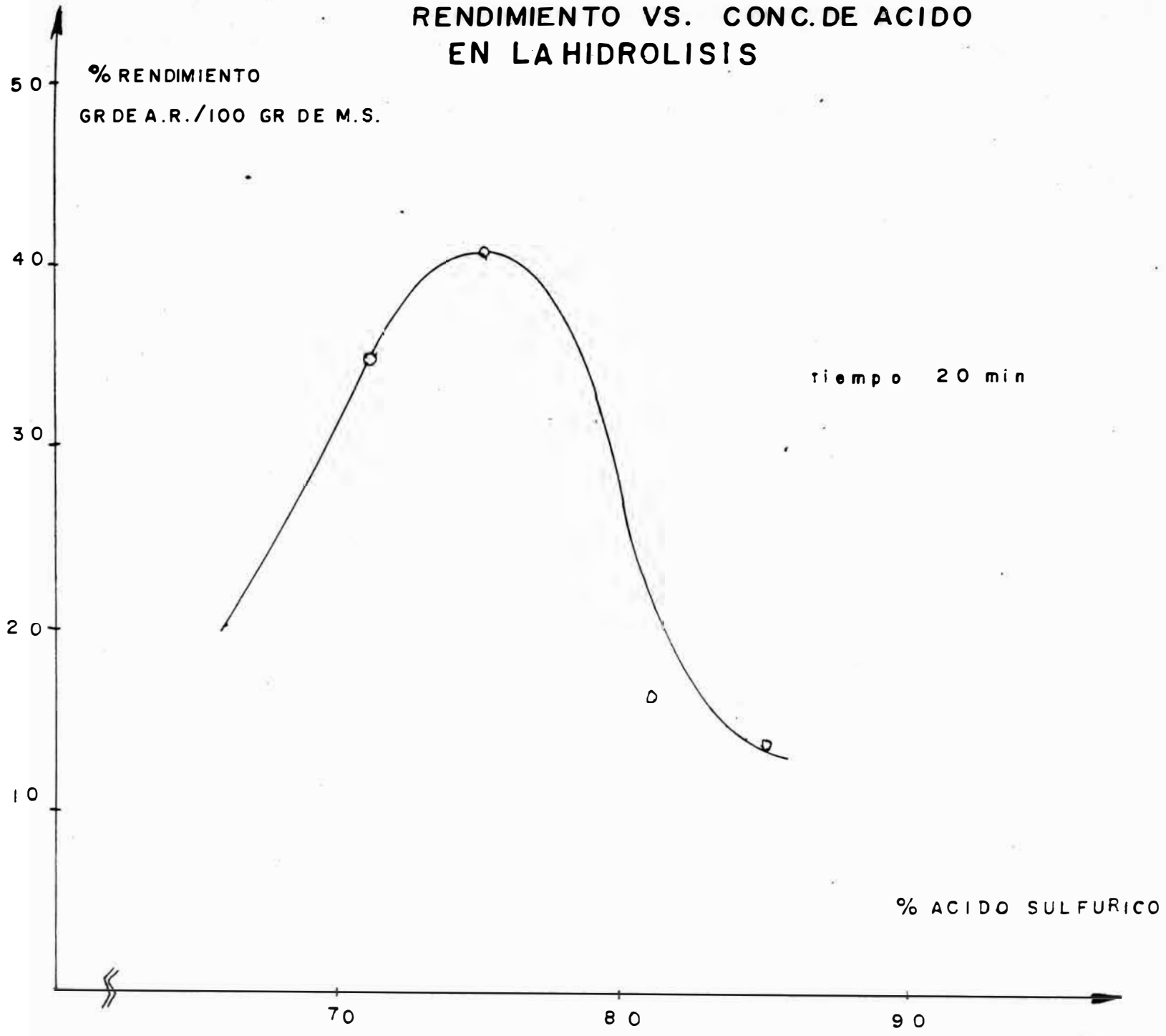


FIGURA 6.7

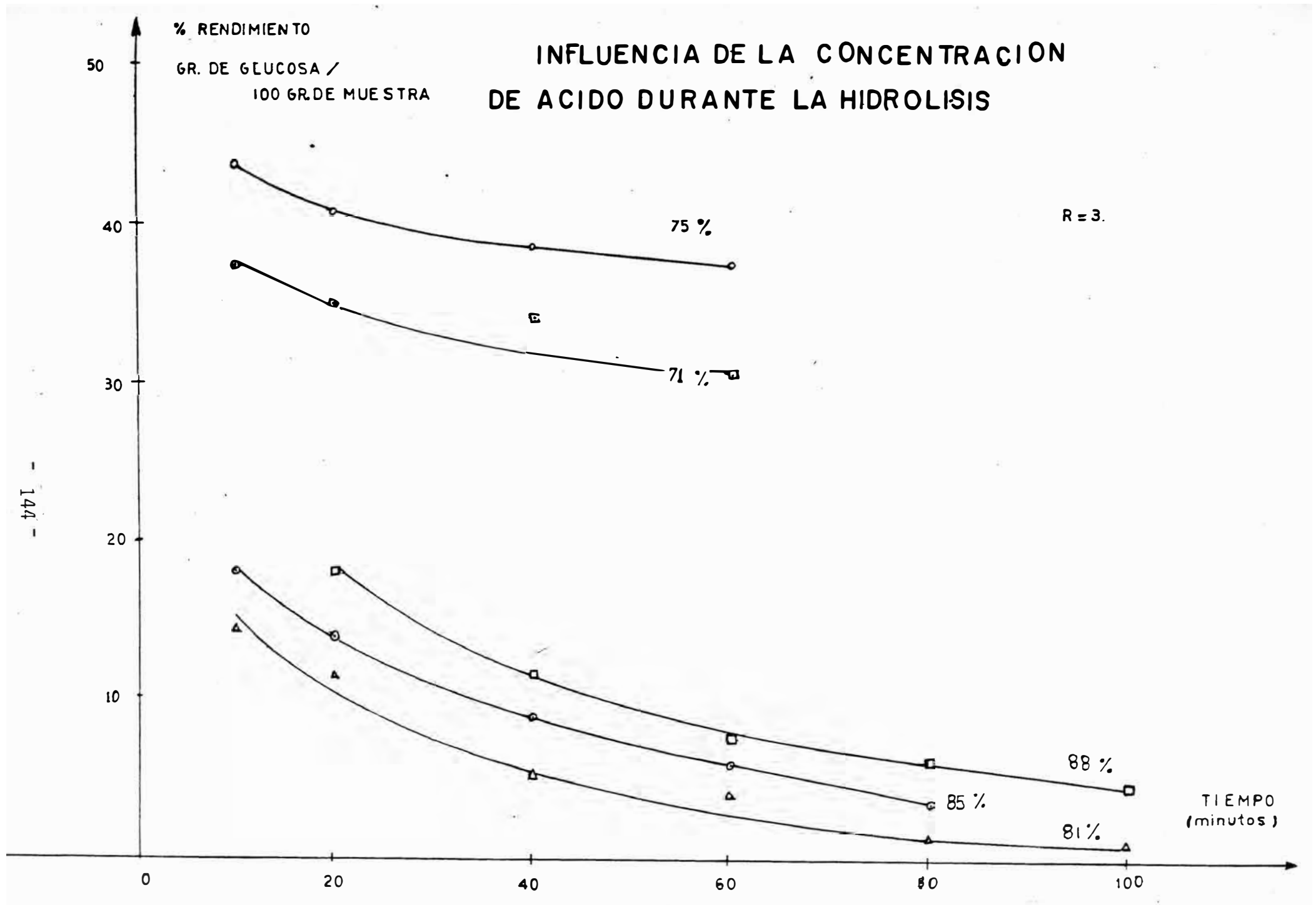


FIGURA 62

RELACION OPTIMA DE HIDROLISIS

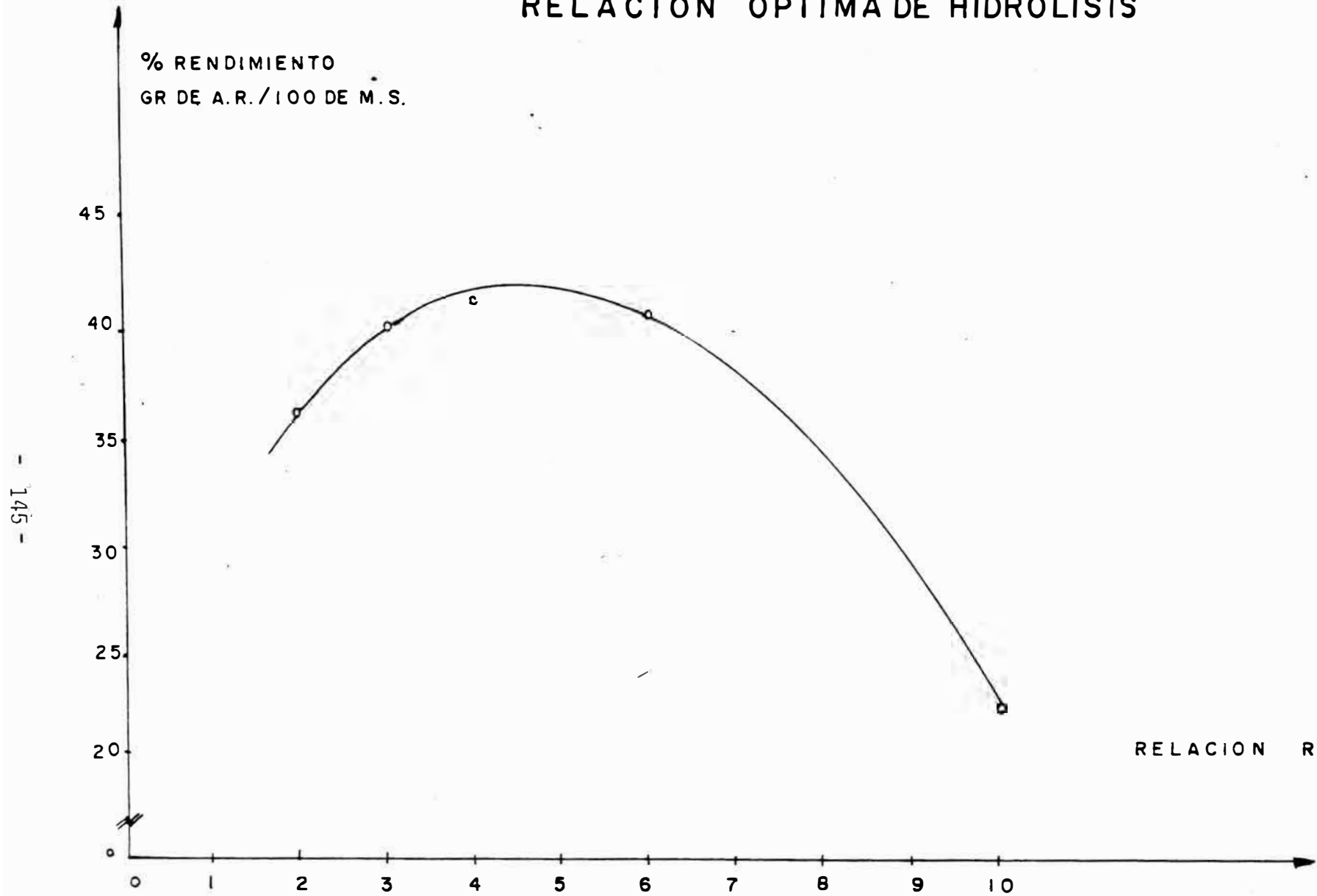
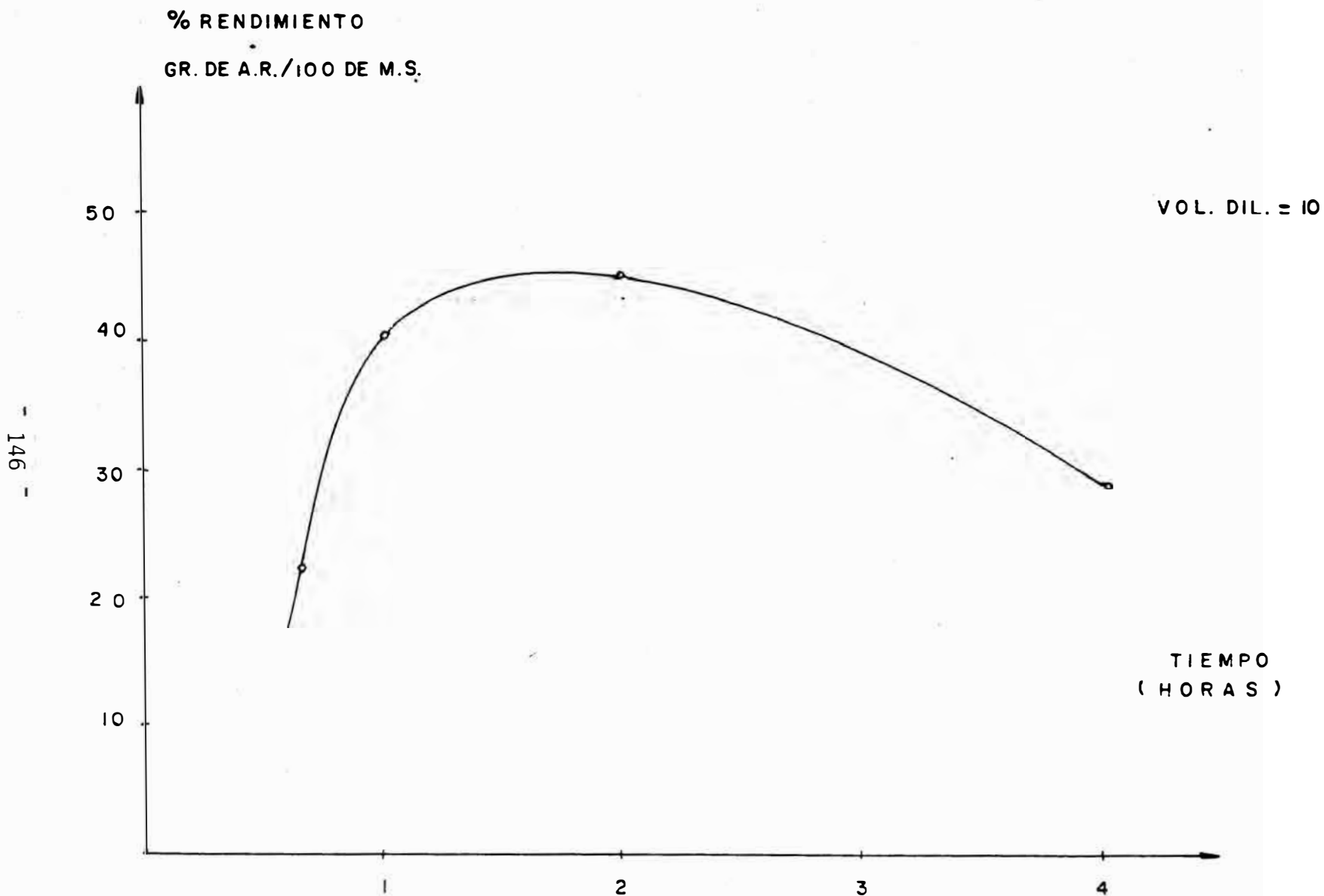


FIGURA 6.9

EFFECTO DEL TIEMPO DE POSTHIDROLISIS



- 146 -

FIGURA 6.10

EFFECTO DEL VOLUMEN DE DILUCION

% RENDIMIENTO
GR DE A.R. / 100 M.S.

TIEMPO 1 hr

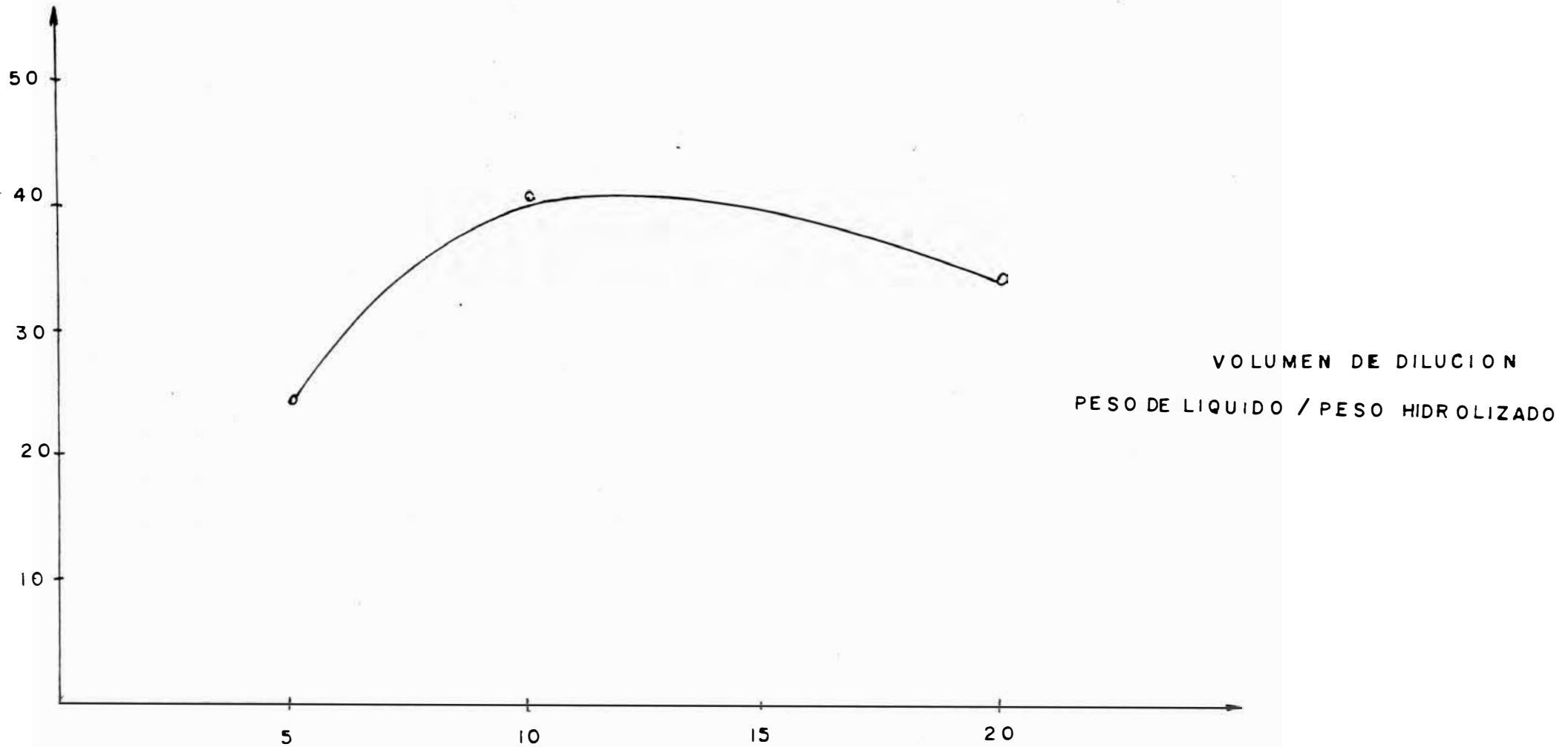
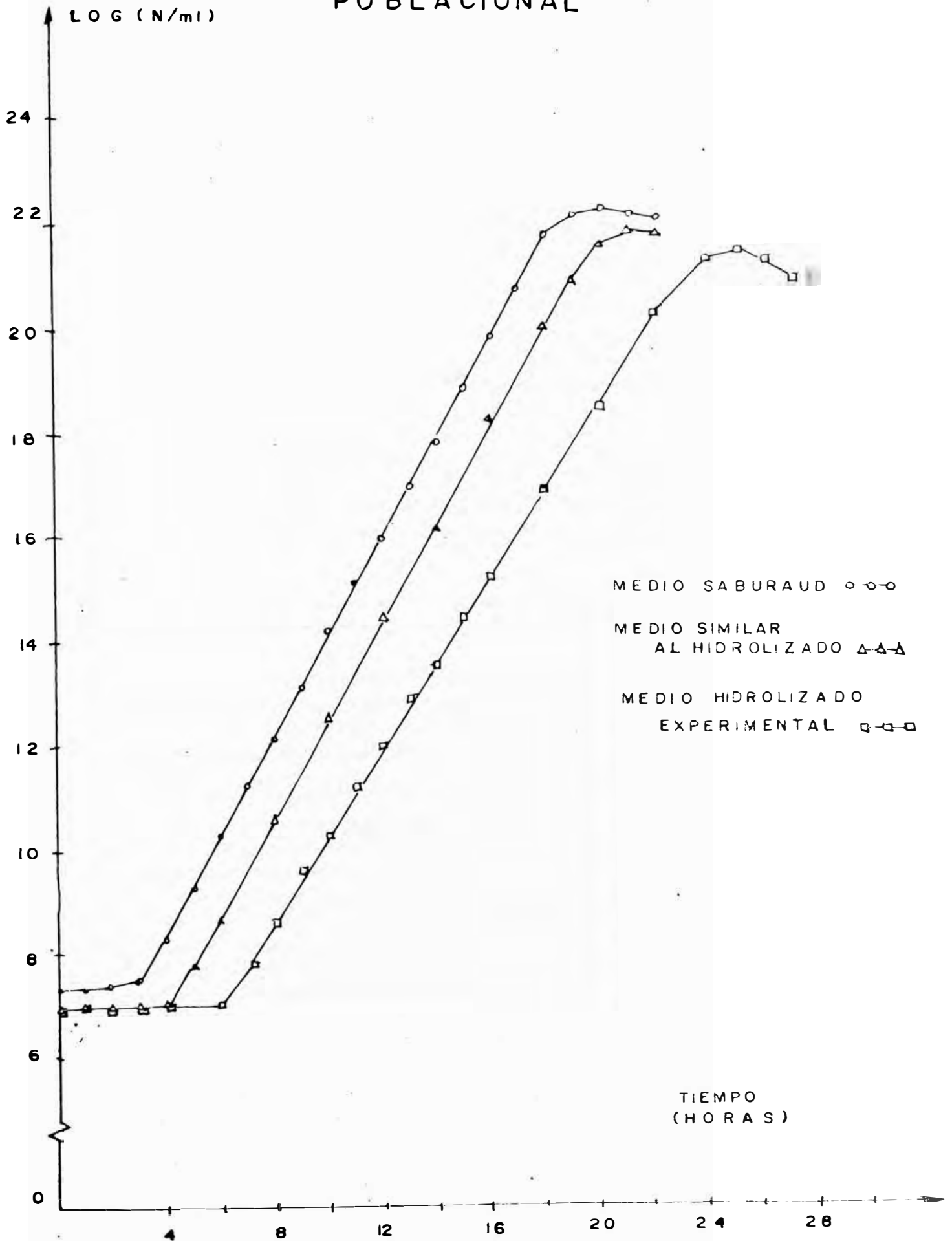


FIGURA 6-11

COMPORTAMIENTO DEL CRECIMIENTO

POBLACIONAL



CRECIMIENTO CELULAR VS. TIEMPO

A CONCENTRACIONES DE SUSTRATO INICIAL

$S_0 = 4\%$ y $S_0 = 8\%$

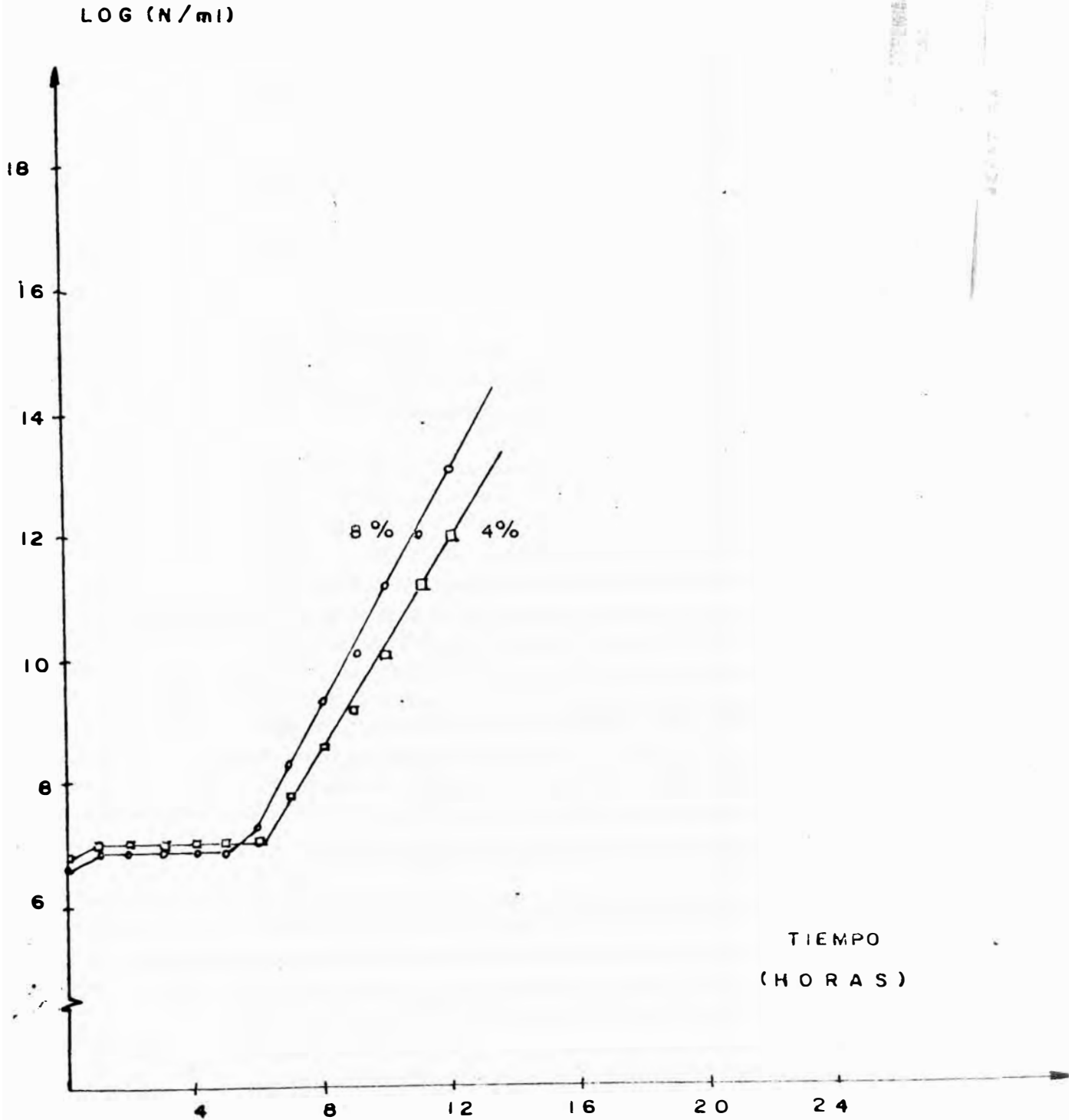


FIGURA 6.13

COMPORTAMIENTO DEL CONSUMO DE SUSTRATO

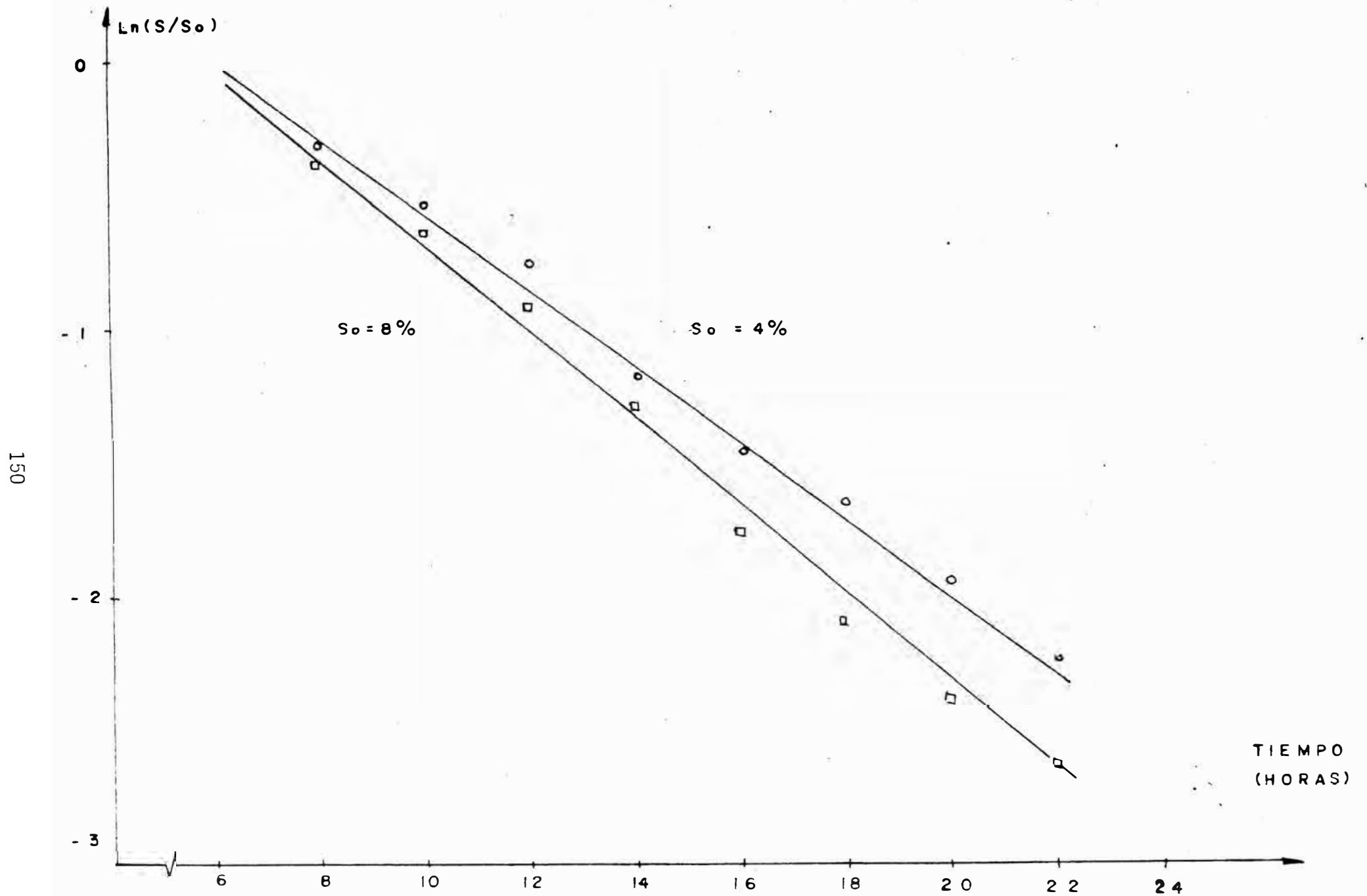


FIGURA 6-14

CONSUMO DE SUSTRATO EN LA FERMENTACION

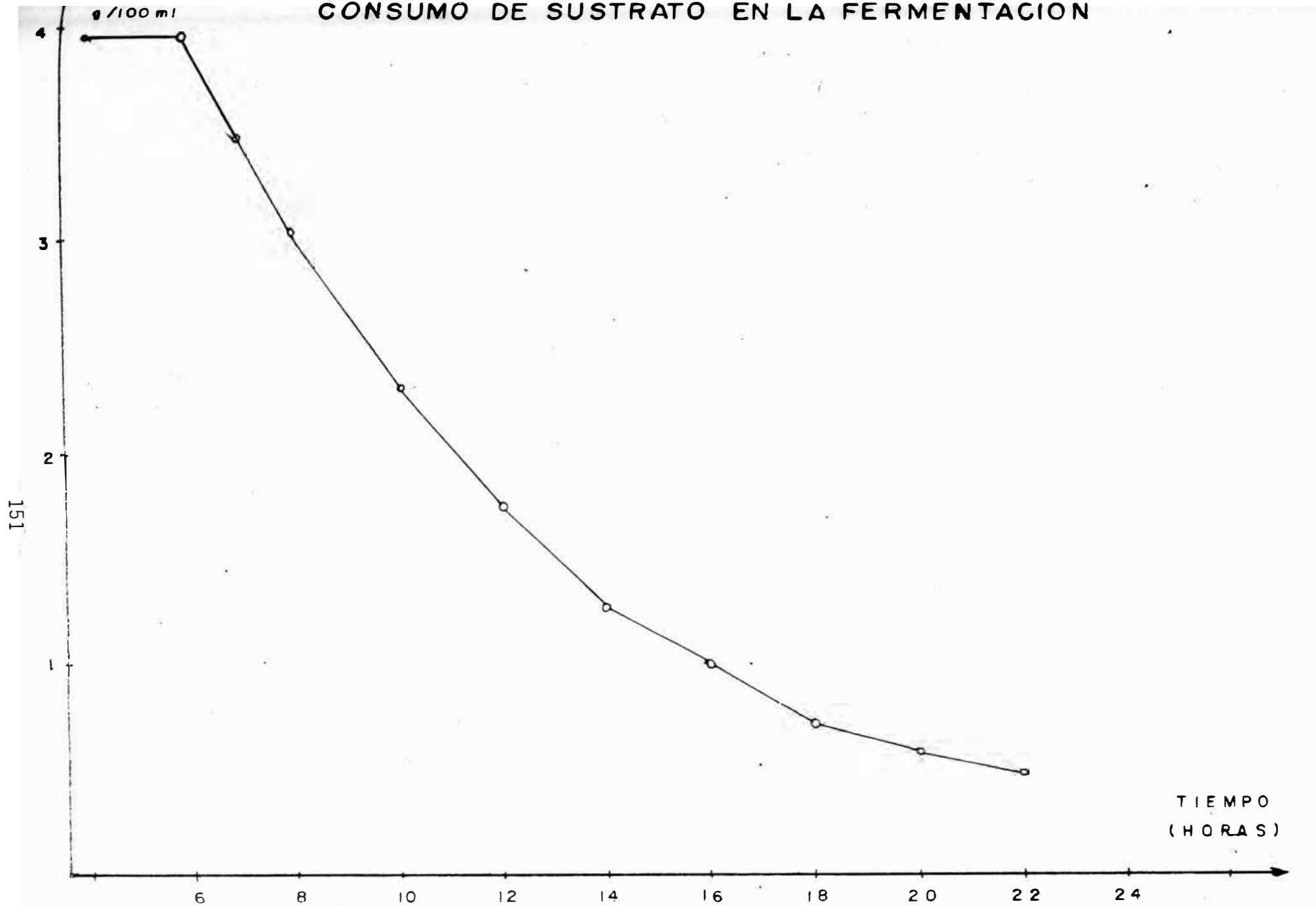


FIGURA 6-15

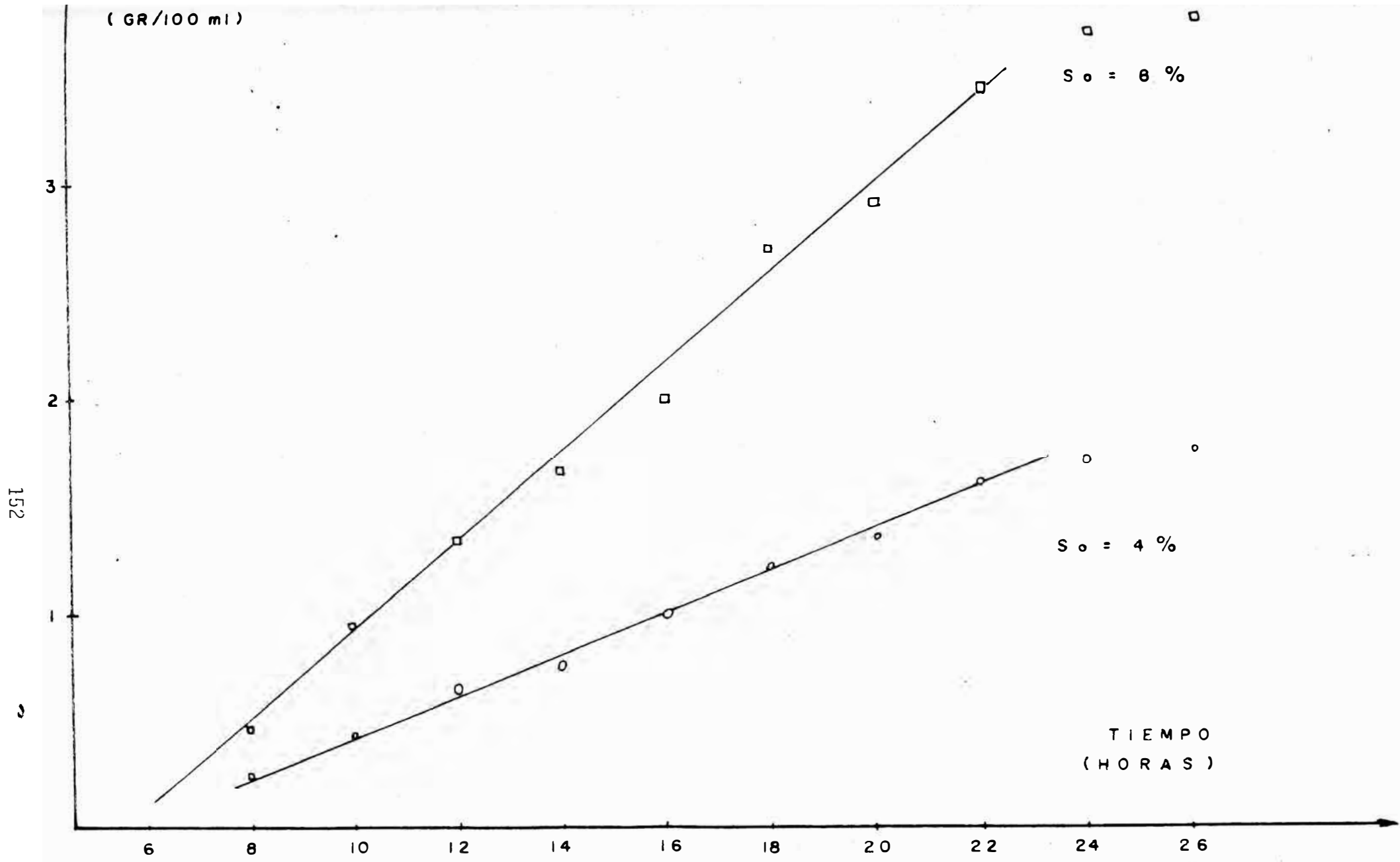


FIGURA 6.16

152

PRESENCIA DE COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA FERMENTACION

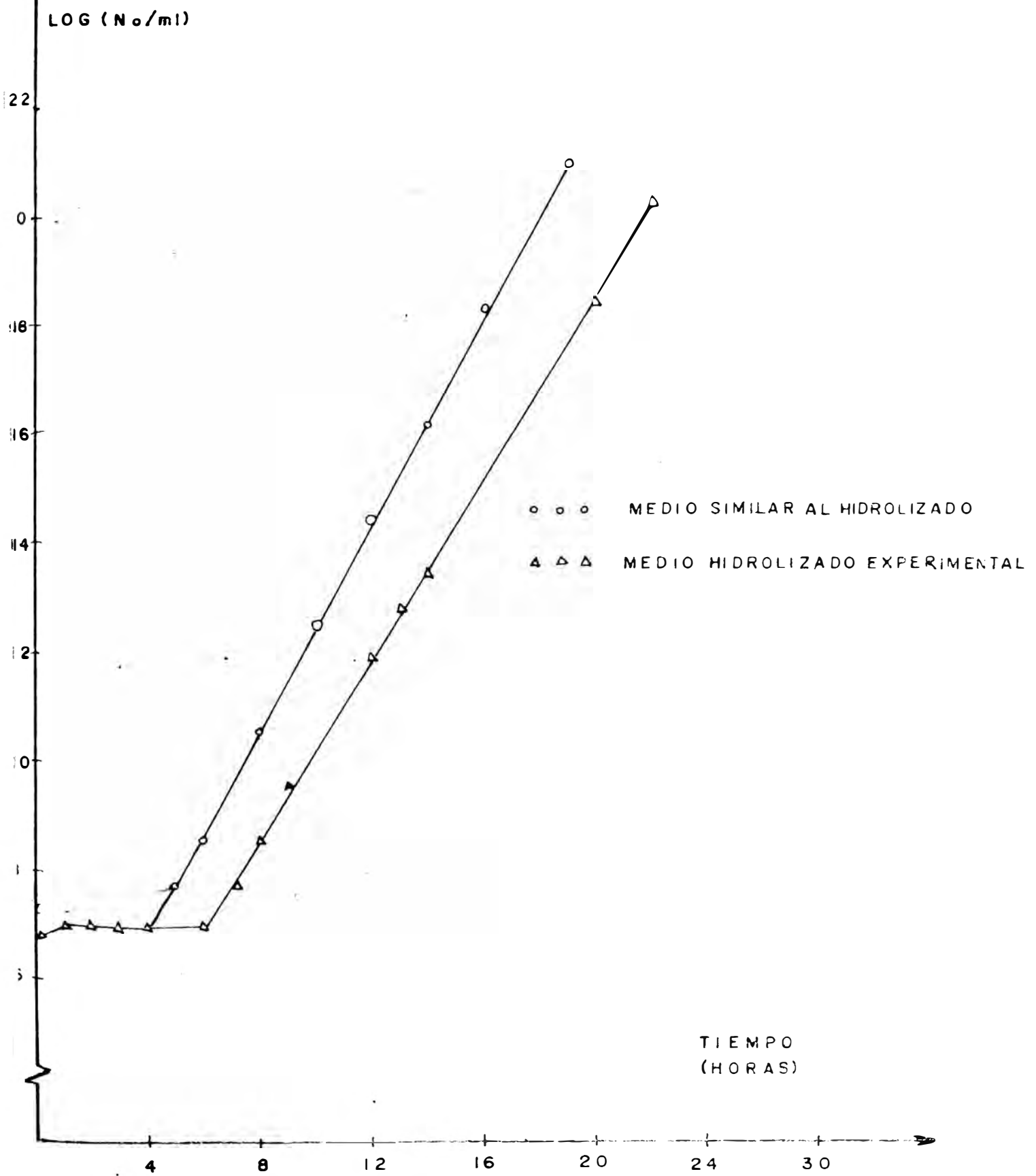


FIGURA 6.17

APENDICE

A.- Determinación de Celulosa en Madera por el Método de Kurschner y Hoffner

a. Principio

Ataque de la lignina mediante mezcla nitro-alcohólica, que la transforma en productos nitrofenólicos solubles en alcohol e insolubles en agua. El alcohol protege la celulosa de la acción del ácido nítrico. Las hemicelulosas son hidrolizadas y las otras sustancias son disueltas.

b. Equipo

Cápsulas de porcelana
Pesafiltros
Bomba o trompa de vacío
Balón de cuello esmerilado de 100 ml
Refrigerante a reflujo
Crisol filtrante N°2
Estufa
Bañomaría
Balanza analítica
Vaso de precipitado.

c. Reactivos

Acido nítrico de 40° Bmé

Alcohol etílico de 90°

d. Muestra de Madera

Fracción 40/60 de aserrín preparado, y extraído en alcohol-benceno de acuerdo con la norma TAPPI T 6 os-59.

e. Modo Operatorio

Pesar 2 g de muestra de madera con 0.1 mg de precisión. Aparte determinar la humedad de la muestra. Colocar la muestra pesada en un balón de 100 ml con refrigerante a reflujo.

En un vaso de precipitado tomar 10 ml de ácido nítrico y agregar 40 ml de alcohol; hechar rápidamente la mezcla en el balón con la muestra. Llevar a ebullición suave en baño maría, con refrigerante a reflujo, durante una hora; decantar el líquido sobrenadante sobre crisol filtrante N°2. Agregar otros 50 ml de mezcla nitro-alcohólica y hacer hervir suavemente otra hora.

Repetir por tercera vez el ataque nitro-alcohólico y luego de una hora de ebullición suave, filtrar bajo vacío con la ayuda del crisol filtrante; lavar el residuo con agua caliente desionizada y secar en estufa a $105^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante. Efectuar la determinación de celulosa y de humedad por duplicado.

f. Expresión de Resultados

Porcentaje promedio de celulosa con dos decimales, referido a muestra de madera de masa constante.

Notas: 1. Los 50 ml de mezcla nitro-alcohólica deben ser

preparados cada vez.

2. La celulosa obtenida es impura y degradada, pero el método es rápido.

B.- Determinación de Pentosanos en Madera por el Método Bromuro Bromato Generalizado.

a. Principio

Dosaje del furfural, producido por acción de ácido clorhídrico en las condiciones establecidos en el presente método, mediante una solución de bromuro-bromato y conversión a porcentaje de pentosanos.

El furfural proviene de pentosanos propiamente dichos, xilanos y arabanos, de ácidos urónicos que siempre acompañan a los poliósidos y que son particularmente abundantes - en las materias pécticas, y de la celulosa misma que da una pequeña cantidad de omegahidroximetilfurfural que en gran parte puede destruirse por una segunda destilación.

El rendimiento en furfural no es cuantitativo para ninguna de estas sustancias. Los xilanos dan el rendimiento más elevado seguidos por los arabanos. En la práctica para transformar el furfural en pentosanos debe utilizarse un coeficiente determinado experimentalmente.

b. Equipo

Aparato de destilación de vidrio, compuesto de un balón de 250 ml de cuello largo y boca esmerilada, un tubo embudo de separación de 50 ml que se une al balón y tiene salida a un refrigerante espiral pequeño.

Probetas

Mechero Bunsen, tripode y malla asbestada.

Bolitas de vidrio

Cápsulas de porcelana

Pesafiltros

Balanza analítica

Fiola de 1000 ml

Erlenmeyer con boca esmerilada de 1000 ml graduado, con tapa.

c. Reactivos

- Acido clorhídrico al 12.7 por ciento. Se diluyen 307 ml de HCl (1.18-1.19 de densidad) a 1000 ml agregando agua desionizada.

Solución de bromuro-bromato de potasio. Disolver 2.783 g de bromato de potasio pesado con 0.1 mg de precisión y 10 g de bromuro de potasio; agregar 10 ml de hidróxido de sodio 0.1 N y completar a 1000 ml con agua desionizada.

Tiosulfato de sodio. $S_2O_3Na_2 \cdot 5 H_2O$, 0.1 N.

- Ioduro de potasio al 10 por ciento.
- Solución de almidón.
- Hielo machacado a partir de agua desionizada.

d. Muestra de Madera

Fracción 40/60 de aserrín preparado y extraída en alcohol-benceno según la norma TAPPIT 6 os-59

e. Modo Operatorio

Pesar 1 g de muestra de madera con 0.1 mg de precisión aparte determinar la humedad de la muestra. Colocar la muestra pesada en balón de destilación, agregar 100 ml de

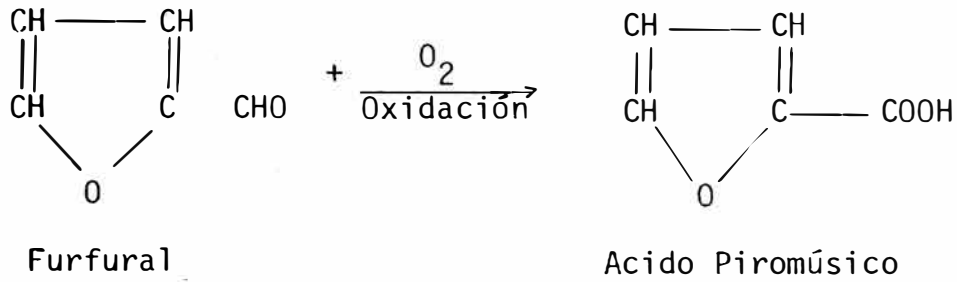
HCl. (12.7 por ciento) y algunas bolitas de vidrio. Tapar y calentar regulando la llama del mechero para recoger 30 ml de destilado en 10 minutos. El calentamiento debe ser suave para evitar toda pirogenación. Calentar colocando el balón sobre malla metálica asbestada que sobrepase largamente el balón. Cada vez que se destilan 30 ml, agregar sin dejar entrar aire 30 ml de ácido clorhídrico que se introducen por el tubo embudo lentamente para no interrumpir la ebullición.

Recoger 210 ml de destilado, lo cual debe lograrse en 70 minutos; poner 250 g de hielo machacado al Erlenmeyer con el destilado para obtener 0° C o menos. Agregar 50 ml de solución bromuro-bromato, tapar el Erlenmeyer, dejar unos minutos, agitar y dejar en reposo 5 minutos. La temperatura debe ser de 0° C.

Al cabo de los 5 minutos agregar 2 g de ioduro de potasio (20 ml de solución de IK al 10 por ciento) y volver a tapar el Erlenmeyer; agitar vigorosamente y titular el exceso de iodo con tiosulfato de sodio 0.1 N, utilizando la solución de almidón hacia el fin de la titulación, hasta desaparición del color azul con una gota de tiosulfato. Efectuar un ensayo en blanco en las mismas condiciones.

Notas:

El furfural es oxidado por el bromuro-bromato, actuando el bromato como dador de oxígeno:



El bromo producido es reducido por el ioduro:



El iodo es titulado mediante tiosulfato:



f. Expresión de Resultados

El peso de furfural corresponde a 1 ml de tiosulfato 1 N es 0.048 g.

El factor de conversión de pentosanos en furfural es de 0.727 y de 0.88 el de la xilosa, que predomina en los pentosanos, en furfural.

El porcentaje de pentosanos es:

$$\begin{aligned}
 & \frac{0.048 \times 100}{0.727 \times 0.88} \text{ N} \frac{(V_2 - V_1)}{M} \\
 & = 7.5 \frac{\text{N} (V_2 - V_1)}{M}
 \end{aligned}$$

Donde:

N = la normalidad del tiosulfato

V₁ = el volumen del tiosulfato gastado para la muestra.

V₂ = el volumen de tiosulfato gastado en el ensayo en blanco.

M = la masa de la muestra.

B.- DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS AZUCARES. METODO DE FEHLING (21)

Definición.- Cantidad de azúcar reductor necesarios de una solución standar para reducir totalmente, el cobre contenido en un volumen determinado del reactivo de Fehling hasta el estado cuproso.

Fundamento.- Poder reductor del azúcar sobre la sal cuprica del reactivo.

Reactivos - Solución Fehling A y B
Solución Standar de glucosa

Material.- Erlenmeyer de 250 ml
Pipetas de 50 ml
Bureta de 50 ml
Probeta de 100 ml

Técnica Operatoria:

1. Colocar en la bureta la solución standar de glucosa.
2. Medir exactamente en un Erlenmeyer 10 ml de Fehling A, 10 ml de Fehling B. Añadir 25 ml de agua destilada y someter a fuego directo hacia ebullición constante durante 2 minutos. Luego dejar caer gota a gota la solución standar de glucosa hasta el viraje del color azul al amarillo (Previamente la coloración - vira al verde amarillo), la titulación debe ser completada en 1 minuto.

Para observar mejor el punto final se usara el azul de metileno, con el cual el punto final será el paso del azul al incoloro.

3. Anotar el gasto obtenido
4. Cálculo del % de A. reductores

Se basa en la siguiente fórmula: Para 2 ml de muestra

$$\% \text{ A.R.} = \left(\frac{V_{ST} - V}{2} \right) \cdot (X\%)$$

- % A.R. = Porcentaje de azúcares reductores en gr/100 ml Presentes en el medio de cultivo.
- V_{ST} = Volumen standar de la solución de glucosa al X% consumido por la solución A + B
- X% = Concentración de la solución de glucosa en gr/100 ml.
- V = Volumen consumido por el resto de la solución A + B - que queda sin reaccionar después de agregarle la muestra reductora.

C.- DETERMINACION DE ALCOHOL ETILICO EN UNA MUESTRA

Técnica de Duboshi

- Se toma 2 ml de solución problema; se adiciona 20 ml de agua destilada.
- Se destila en un matraz durante doce minutos aproximadamente.
- Los vapores se reciben en un matraz que contiene 10 ml de una solución 1 N de dicromato de potasio.
- Se hierve esta última hasta que se lleve a cabo la oxidación completa del alcohol.
- Se titula el exceso de dicromato de potasio con una solución valorada de tiosulfato de sodio, usando ferricianuro de potasio como indicador (el punto final se nota por el cambio de color de la gota de amarillo rojizo hasta un azul verdoso, al generarse el complejo ferri-ferro cianuro de potasio).

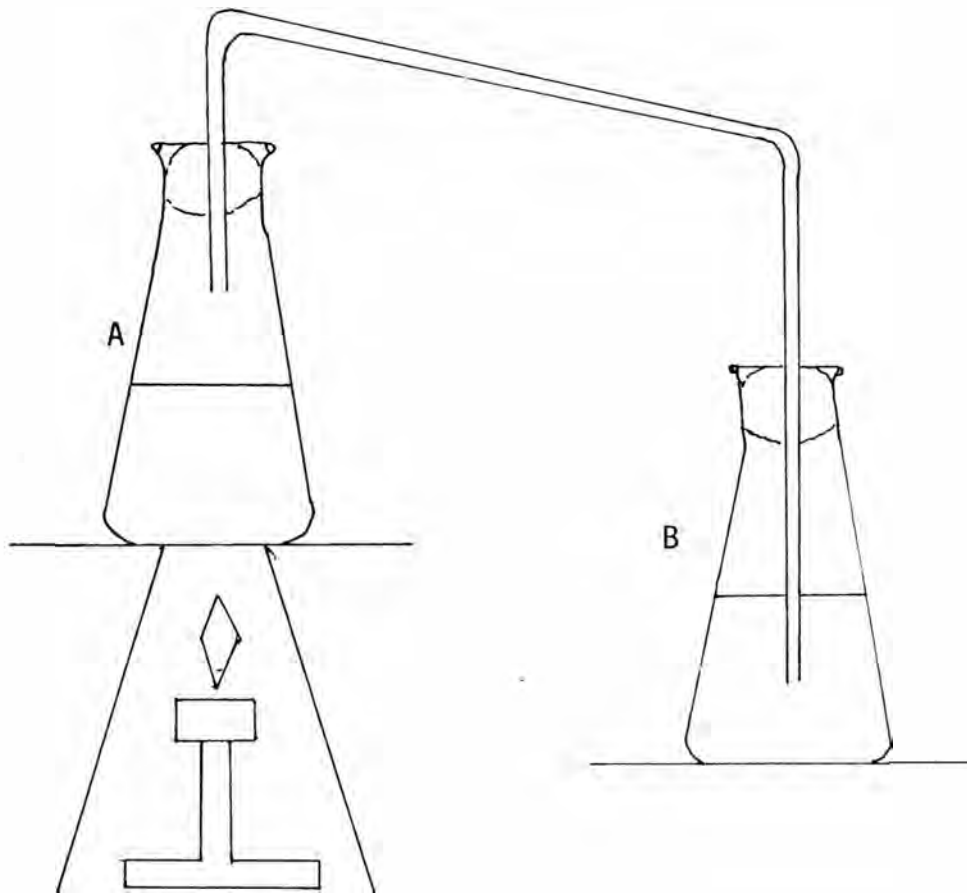
Tiosulfato de Sodio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mol pesa 248.20 gr

Dicromato de Potasio $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1 mol pesa 294.22 gr

La equivalencia es:

1 ml de tiosulfato de sodio = 0.049 gr de dicromato

= 5.0 ml de alcohol etílico absoluto.



EQUIPO DE DESTILACION

A.- 2 ml. de muestra + 20 ,ml. de agua

B.- Solución de Dicromato de Potasio

D.- ESTERILIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO

Los medios de cultivo suelen colocarse en tubos de ensayo, redomas o recipientes, que después son taponados con algodón no absorbente o cubiertos con tapa de rosca o de metal o capuchos plásticos de fácil colocación y después de ello esterilizados. El agente corriente de esterilización es el calor húmedo a temperatura de 120°C. Para lograr esta temperatura, el vapor debe estar a 15 lb/Pul.Cuadr. ello es posible en una autoclave de laboratorio o una olla express casera. Basta la exposición durante 15 a 30 minutos para matar los microorganismos si el esterilizador no está muy cargado. La esterilización de las bocas de los tubos y frascos de ensayo para impedir la contaminación del medio durante las operaciones ulteriores (vaciar el material en cajas petri, o cultivos de inoculación) y la esterilización de las agujas de inoculación se hacen en el mechero Bunsen.

E.- DETERMINACION DE LA CURVA DE POBLACION MICROBIANA

Las curvas de población bacteriana se precisan al inocular un número pequeño de microorganismos en un medio de cultivo y contar las bacterias en muestras obtenidas a intervalos de cada hora. Los recuentos hechos por examen microscópico representan el total de células vivas y muertas como se muestra en la curva A de la Fig. 1. Los recuentos por dilución o de colonias indican solamente la población de células vivas, como se muestra en la curva B. Se emplean los logaritmos para representar claramente con exactitud los cambios de población cuando los recuentos dan cifras bajas y muestran aún los recuentos máximos. La curva B es característica de poblaciones de cualquier tipo, limitadas a un sistema cerrado y sometidas a inanición o al efecto nocivos de productos tóxicos de desecho por ejemplo el bióxido de carbono a medida que aumenta la población.

La Fig. 2 muestra el esquema seguido para la determinación de la curva de Población Microbiana.

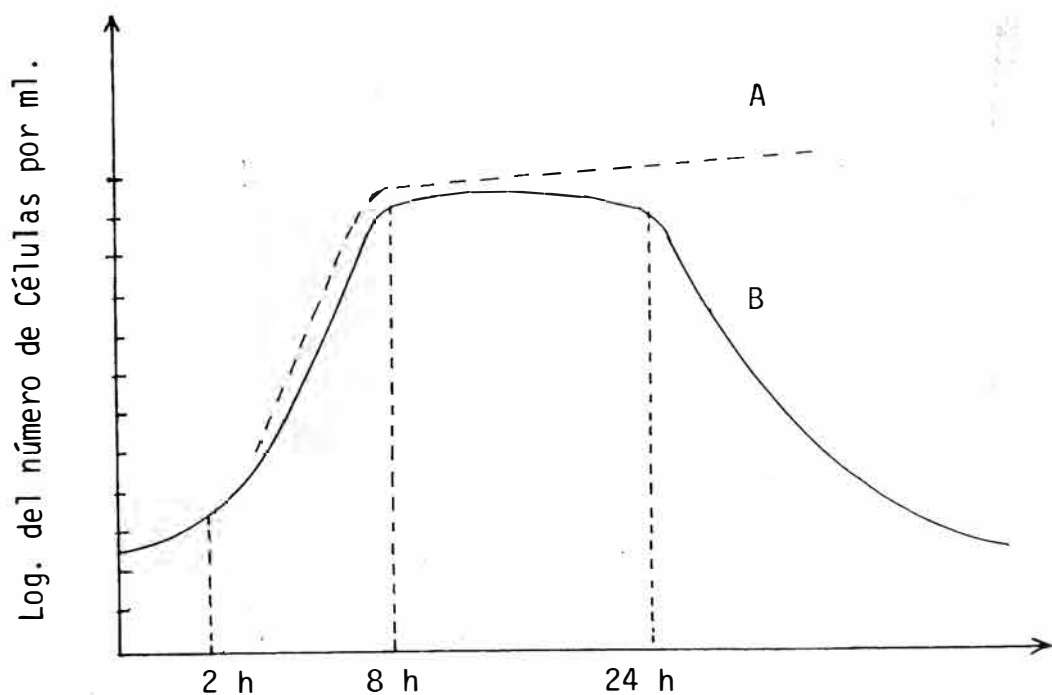


FIG. 1
- 165 -

F.- ANÁLISIS POR CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA DE LOS AZUCARES Y SUS DERIVADOS. (22)

La cromatografía de capa fina (CCF) proporciona un método simple, rápido y sensible, para el análisis cuantitativo y cuantitativo de azúcares de bajo peso molecular y sus derivados.

Los carbohidratos, los cuales son altamente hidrofílicos, requieren de sistemas de solventes polares. Este tipo de solventes tienen velocidades de migración relativamente pequeñas, requiriendo entre media hora, hasta tres horas para un ascenso completo en la placa.

Los valores de la constante de velocidad R_f disminuyen a medida que los grupos hidrólicos se incrementan, lo mismo sucede al aumentar los pesos moleculares. (Pentosas, hexosas, disacáridos). Se sabe también que impregnando la capa de sílica gel con acetato de sodio se aumenta la resolución.

La cromatografía de papel, ofrece la resolución de la cromatografía de papel convencional, combinada con la velocidad y la sensibilidad de la cromatografía de capa fina.

PREPARACION DE LAS PLACAS DE SILICA GEL

De acuerdo a la bibliografía, se preparó una mezcla de 30 gr de sílica gel en 60 ml de agua destilada, la que fue aplicada a 5 placas con un aplicador especial hasta un espesor de 250 μ . Las placas fueron secadas a 110°C durante 30 minutos. La mezcla de carbohidratos que va a ser cromatografiada es disuelta en agua u otro solvente disponible, con la ayuda de un tubo capilar se coloca una gota en el punto inicial a 15 mm del final de la placa. La bibliografía consultada recomienda una aplicación de 5-50 μ g

por gota.

Después de una selección de los posibles solventes, se investigaron tres tipos, de los cuales se eligió el constituido por:

solvente	acetato de etilo	ácido acético	metanol	H ₂ O
parts en volumen	60	15	15	10

Las corridas cromatográficas duraron aproximadamente tres horas al cabo de las cuales, ya se había obtenido una buena resolución, y ya se había cubierto la longitud de las placas.

LA VISUALIZACION

El uso de agentes destructivos no específicos tales como el ácido sulfúrico, permite la visualización o detección de derivados altamente sustituidos de azúcares, los cuales no pueden ser visualizados por otros métodos. También es necesario el uso de agentes reveladores, tales como el anisaldehído naftol-resorcinol, etc.

En nuestro caso se ha empleado como agente revelador una mezcla de Acido Sulfúrico al 20%, Acido Nítrico al 20%, Alcohol etílico y agua. Una vez terminada la corrida en húmedo, las placas fueron secadas con un ventilador de aire caliente, luego fueron rociadas con la mezcla reveladora (en forma de spray), luego calentadas a 130°C durante 15 minutos. Hemos usado dos reveladores, anilina en el primer caso y difenilamina en el segundo caso.

CORRIDA N°2 .- REVELADOR DIFENILAMINA

PREHIDROLIZADO Mancha alargada desde 0.16 hasta 0.29, ambos en media luna, círculos en 0.39, 0.5 y 0.61

HIDROLIZADO	Manchas en media luna ligeras en 0.13 y 0.18 Círculos en 0.39, 0.5 y 0.61
ARABINOSA	Círculo en 0.42
DEXTROSA	Mancha ovoide en media luna con núcleo en 0.31
Ac.GLUCORONICO	Mancha desde cero hasta 0.375
MANOSA	Mancha ovoide media luna en 0.36
XILOSA	Círculo en 0.45
Glucosa Ind.	Mancha en 0.25 y en 0.40
Derivados	Mancha en 0.25 y en 0.38

Experimentos posteriores demostraron que existe interacción en la velocidad relativa de los azúcares cuando se encuentran en una mezcla. Parece ser que estas velocidades son menores con respecto a las de los azúcares que no están en mezcla.

OBSERVACIONES.-

En la placa cromatográfica se colocaron las siguientes muestras prehidrolizado, hidrolizado, arabinosa dextrosa, ácido glucorónico, manosa, xilosa, glucosa industrial, derivados de degradación de glucosa y nuevamente el prehidrolizado, seguido del hidrolizado. Como anotamos en el siguiente cuadro, los coeficientes de velocidad relativa (que es el cociente de la distancia recorrida por la muestra entre la distancia recorrida por el solvente).

CORRIDA N°1.- Revelador ANILINA Placa Marrón

PREHIDROLIZADO	Mancha desde 0.2 hasta 0.28, círculos a 0.37 y 0.47
HIDROLIZADO	Colas en 0.06 y 0.12, círculos en 0.36, 0.47 y en 0.57
ARABINOSA	Círculo en 0.41
DEXTROSA	Mancha ovoide en 0.35
Ac. GLUCORONICO	Mancha alargada desde cero hasta 0.44.
MANOSA	Mancha ovoide media luna, en 0.36
XILOSA	Círculo en 0.48
Glucosa industrial	Mancha hasta 0.175, mancha en 0.30
Derivados	Mancha hasta 0.30

CONCLUSIONES.-

En el prehidrolizado se ha detectado la presencia de xilosa, ver corrida cromatográfica N°1 con el revelador anilina. También se ha detectado una porción menor de glucosa. También se observan trazas de compuestos más pesados o menos polares, que pueden estar constituidos por ceras y taninos solubles en ácidos diluídos.

En la misma fotografía se observa para el hidrolizado, la presencia de glucosa en mayor proporción, con pequeñas trazas de xilosa. De la misma, se puede observar la presencia de compuestos más polares o más livianos, que no están comprendidos entre los azúcares investigados. Dada la intensidad de la mancha, es recomendable su posterior investigación. Así mismo se observan trazas de azúcares más pesados, que pueden estar conformados por oligómeros que no han sido completamente hidrolizados.

Otra conclusión importante es que no se observa la presencia de ácido glucorónico, que es el principal producto de una oxidación enérgica de la glucosa, y que puede ser uno de los agentes inhibidores de la fermentación más importante.

G.- EXPLICACION DE DIAGRAMA DE LA DETERMINACION DE LA CURVA DE CRECIMIENTO POBLACIONAL

1.- Preparación del medio de cultivo y el agar saborau

<u>Medio Saborau</u>		<u>AGAR Saborau</u>	
Fitona	1 gr	Fitona	1 gr
Glucosa	4 gr	Glucosa	4 gr
Extr.de levadura	0.5 gr	Extr.de levadura	0.5 gr
Ag. destilada	<u>94.5</u>	Agar	1.8 gr
	100 gr	Ag. destilada	<u>92.7</u> gr
			100 gr

2 y 3.- Esterilización del medio de cultivo y el agar saborau a $T = 120^{\circ}\text{C}$. Por 15 minutos; de las cajas Petri y los demás materiales de vidrio a $T = 180^{\circ}\text{C}$ por 1 hora.

4.- Vaciado del agar en las cajas Petri, previamente la boca del matraz o tubo es flameada para esterilizar.

5.- Traslado de la cepa mediante unas asas al medio de cultivo. Los materiales previamente deben ser flameados.

6.- El medio de cultivo con la levadura es colocado en la estufa a $T^{\circ} = 32$ por 24 horas,

7.- Siembra de 1 ml, luego se incuba en el vitroterm a 30°C en 9 ml de suero fisiológico.

8.- Se toma 1 ml del medio de cultivo y se diluye tantas veces como sea necesario y la última dilución se agrega a la caja Petri con el medio agar. Este medio debe hallarse líquido en el momento de agregarse el medio de cultivo.

9.- Las cajas Petri se colocan en la estufa a $T = 32^{\circ}\text{C}$ por 3 días después de los cuales aparecen colonias (puntos blancos) en el medio agar.

10.- Contómetro mediante el cual se lee el número de colonias por ml, esto equivale al número de levaduras presentes en esa unidad de tiempo en que se cultivó.

DIAGRAMA DE LA DETERMINACION DE LA
CURVA DE CRECIMIENTO POBLACIONAL

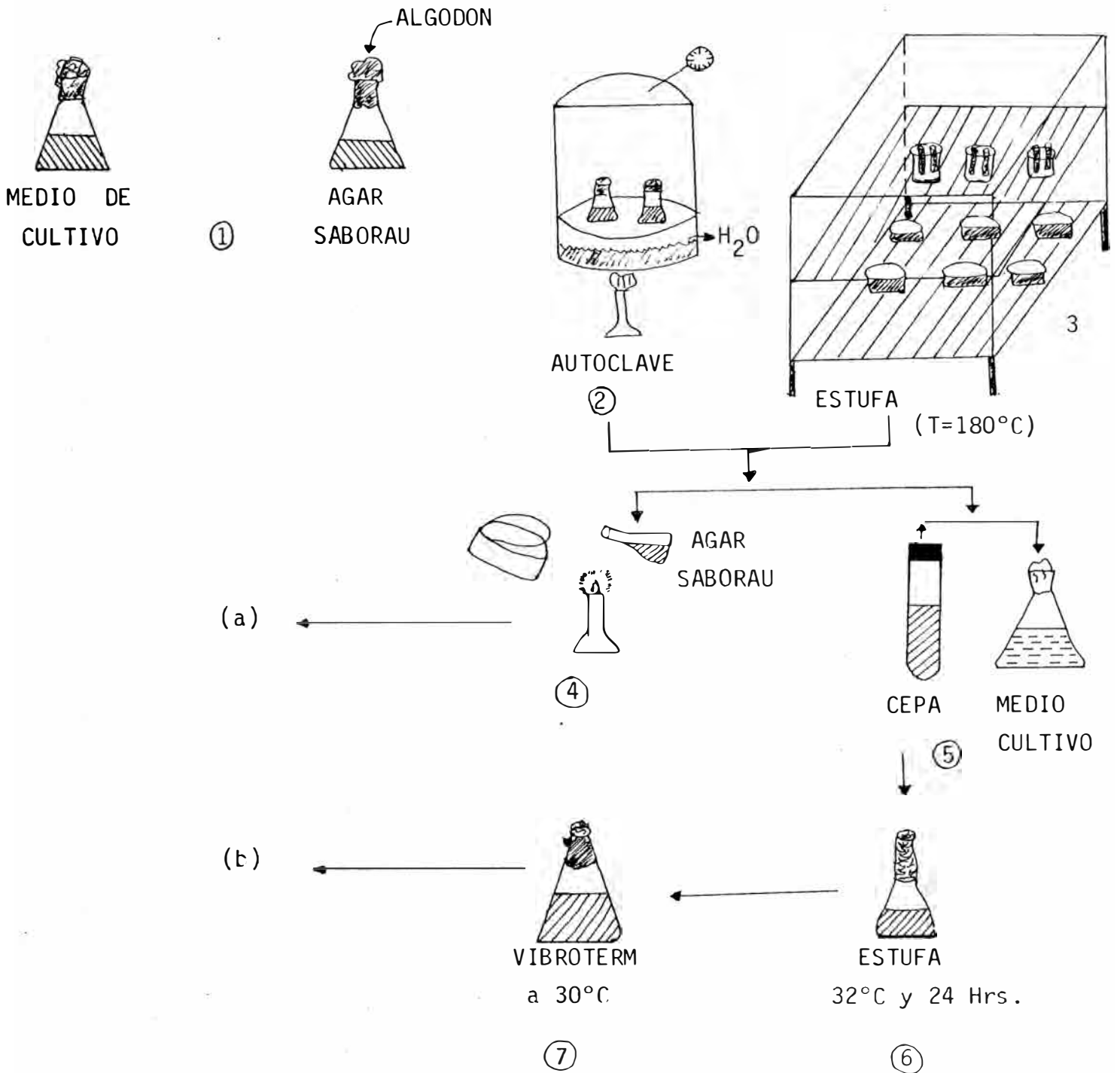


FIGURA N° 2

CONTINUACION DE FIG. N° 2

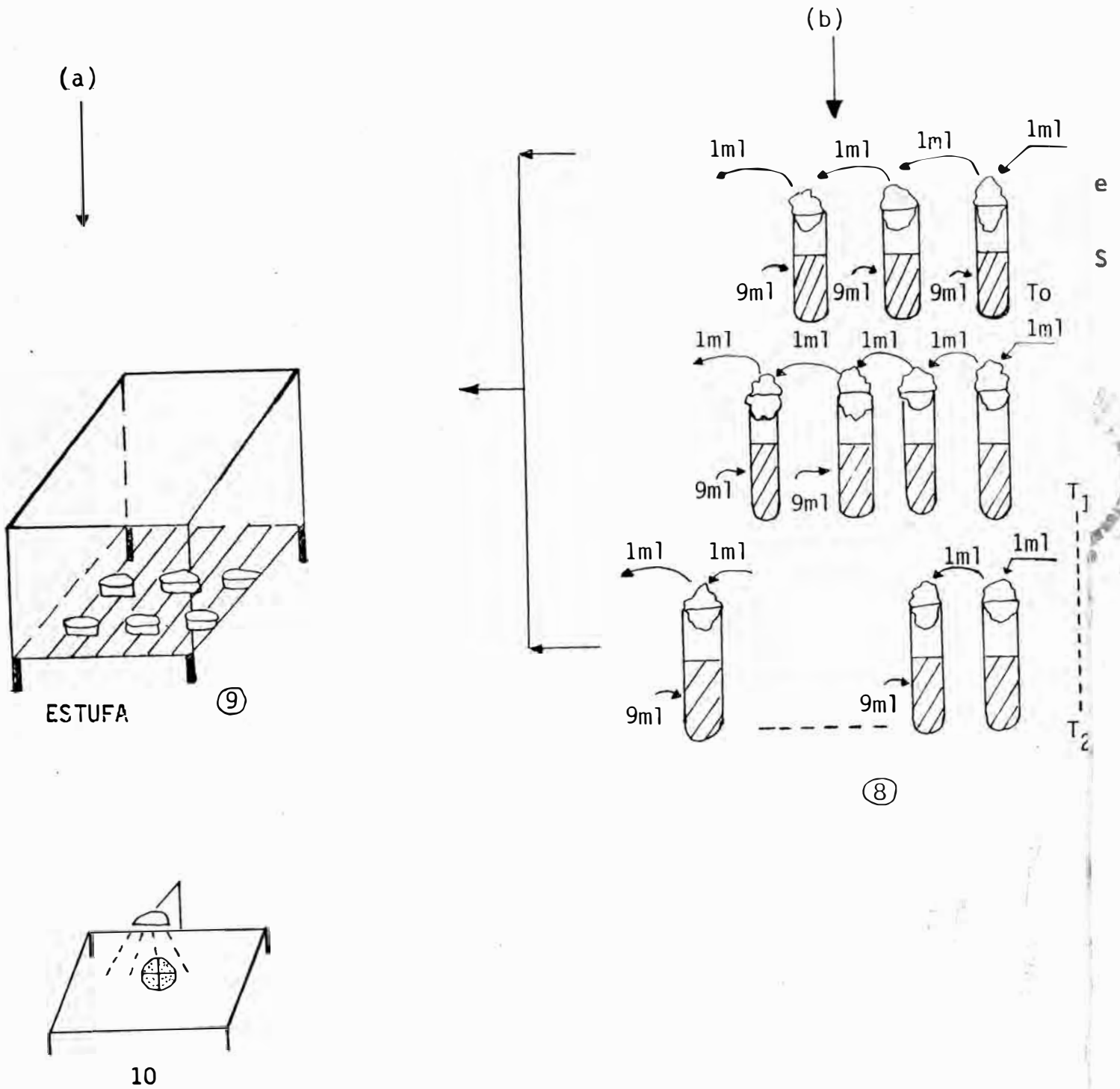


FIG. 2

BIBLIOGRAFIA

- 1.- George T. Tsao, Producción de Azúcares Fermentables a partir de materias celulósicas, Laboratorio de Ingeniería de Recursos Renovables, Universidad de Purdue, Indiana, E.E.U.U. Trabajo presentado en el Seminario sobre Fuentes de Energía Renovables. Año 1980, págs. 2, 5, 9.
- 2.- George T. Tsao, An Integrated Process of utilization of Renewable Resources in the production of ethanol (LORRE). Año 1982, págs. 2,3,5,7.
- 3.- N. Kosaric y otros. Ethanol Production by Fermentation, Advances in applied microbiology, volume 26, Academic Press Inc. Año 1980, págs. 148,151.
- 4.- Ministerio de Agricultura-Perú, Anuario de Estadística Forestal y de Fauna Silvestre, 1982, 1983 . 1984, 1985.
- 5.- Aero Sjostron, Fundamentals and applications of Wood Chemistry, (Lab. of Wood, Finland), año 1981, págs. 12, 41a, 43, 45.
- 6.- Morrison and Boyd, Química Orgánica, año 1970, pág. 1154.
- 7.- Ministerio de Industria-Brasil, Estado da Arte de los Estudos de la Producao do Etanol, Brasilia, 1981, págs. 11,12,33,46,47 , 35,39,41,44,62,64,71 al 89.
- 8.- A. Thickener, Acid Hidrolisis of Wood, Auckland Scholl of Engineering, Auxkland-New Zealand, 1981, págs. 16.
- 9.- J.A. Kent, Department of Chemical Engineering West Virginia University, Química Industrial, pág. 223,224,225,226. Ediciones Grijalbo S.A., Barcelona (1964).

- 10.- Reihd Leonard and George J. Hajny, Fermentation of wood sugars to ethyl alcohol, Industrial and Engineering ch. Abril 1945. Págs. 390 a 395.
- 11.- Albert Leningler, Bioquímica. Ediciones Omega S.A. Barcelona, págs. 160 al 161, 165,166.
- 12.- Phillip L. Carpenter, Microbiología. 2a. edición. Año 1970,pág. 208 al 214.
- 13.- Suichi Aiba, y otros. Biochemical Engineering. Año 1965. Págs. 77-85, 102-104.
- 14.- Nathan Gilbert, Hydrolysis of wood, Industrial and Engineering chemistry, vol. 44, N°7. Año 1952, págs. 1712 al 1720.
- 15.- Alfredo Sánchez M., Principios de Microbiología Industrial. Pág. 34-35, Año 1970.
- 16.- H. Mendelson, Inventa A.G. CHE.E., Junio 1981, pag. 62-65.
- 17.- E. Harris, Madison Wood Sugar Process. U.S. Forest Products Laboratory, Madison, Wisconsin. I.E.CH. Vol. 38. N°9, Año 1946. Pág. 890-895.
- 18.- E.Harris, (U.S. F.P.L.) Hidrolisis of wood, I.E.CH. Vol. 37. 1, Año 1944, pág. 12-23.
- 19.- J.R. Siemon (Industrial Research Lab.) S.E.S. Report N°75/5. Año 1975, pág. 12 a 14
- 20.- Biotecnología Tecnologic. Das Fermentagoes. Urgel de Almeida Lima, Eugenio Aquarone, Walter Borzani, pág.46 y 47.
- 21.- Elwin E. Harris and Albert A. Kline. Analysis of wood sugars - Industrial and Engineering Chemistry. Vol.172, Febrero 1945 .

Pág. 95.

22.- Egon-Sthal, Thin layer chromatography A Laboratory Handbook, second edition, Springer. Año 1969, pág. de 807 al 837.