

Universidad de Granada

Facultad de Ciencias



DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA

HIDROLISIS ENZIMATICA Y ACIDA DE CELULOSA

ALFONSO ROBLES MEDINA

TESIS DOCTORAL
GRANADA, JUNIO 1987



HIDROLISIS ENZIMATICA Y ACIDA DE CELULOSA

Tesis presentada para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias, Sección de Químicas, por

Alfonso Robles Medina

realizada bajo la dirección del Prof. D. Fernando Camacho Rubio, Catedrático de Ingeniería Química de la Universidad de Granada, y del Prof. Dr. D. Pedro González Tello, Profesor Titular de Ingeniería Química de la Universidad de Granada, y juzgada el día 3 de julio de 1987 en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada por el siguiente tribunal:

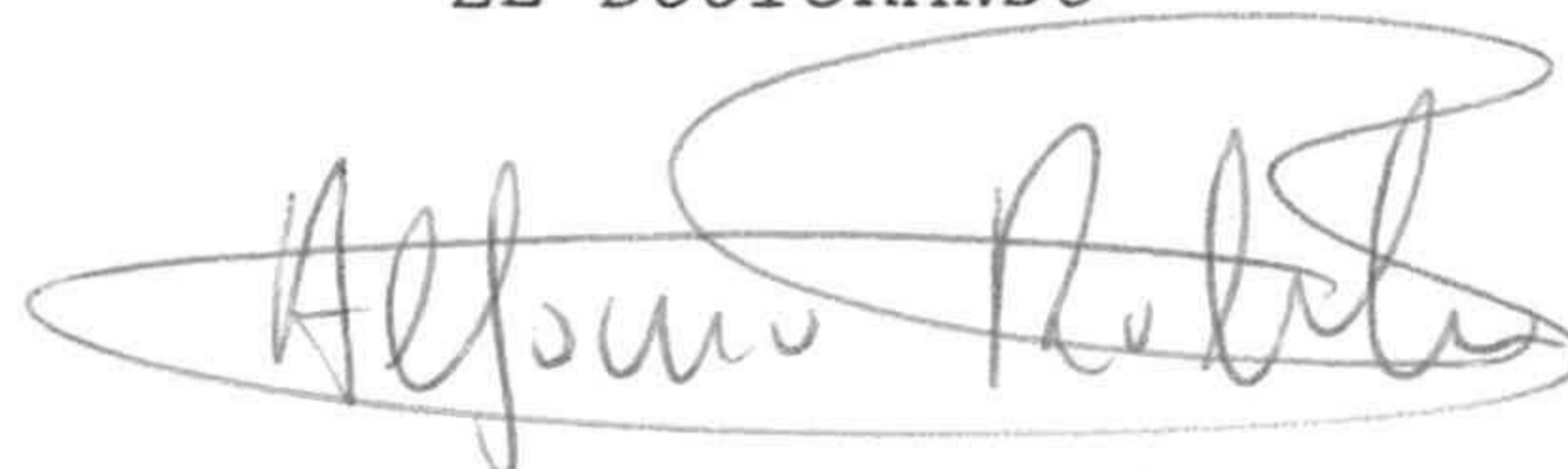
PRESIDENTE: Dr. D. Julio Boza López

VOCALES: Dr. D. José Fernando Aguilera Sánchez
Dr. D. Antonio García Rodríguez
Dra. D^a. Encarnación Jurado Alameda

SECRETARIO: Dr. D. Leopoldo Martínez Nieto

CALIFICACION OBTENIDA: Apto "cum laude"

EL DOCTORANDO



Fdo. Alfonso Robles Medina

LOS DIRECTORES DE LA TESIS



Fdo. Fernando Camacho Rubio



Fdo. Pedro González Tello





UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

Núm. 1270

Tengo el gusto de remitir 2 ejemplares de la Tesis Doctoral de D. ALFONSO ROBLES MEDINA, para su archivo en la Biblioteca de esta Facultad.

Dios guarde a Vd. muchos años.

Granada, 8 de julio de 1.987

EL SECRETARIO,




 Sr. Director de la Biblioteca de esta Facultad==



R.33.176

UNIVERSIDAD DE GRANADA

15/96

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA

T
13
19

HIDROLISIS ENZIMATICA Y ACIDA DE CELULOSA

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 019644516
Nº Copia 121185724

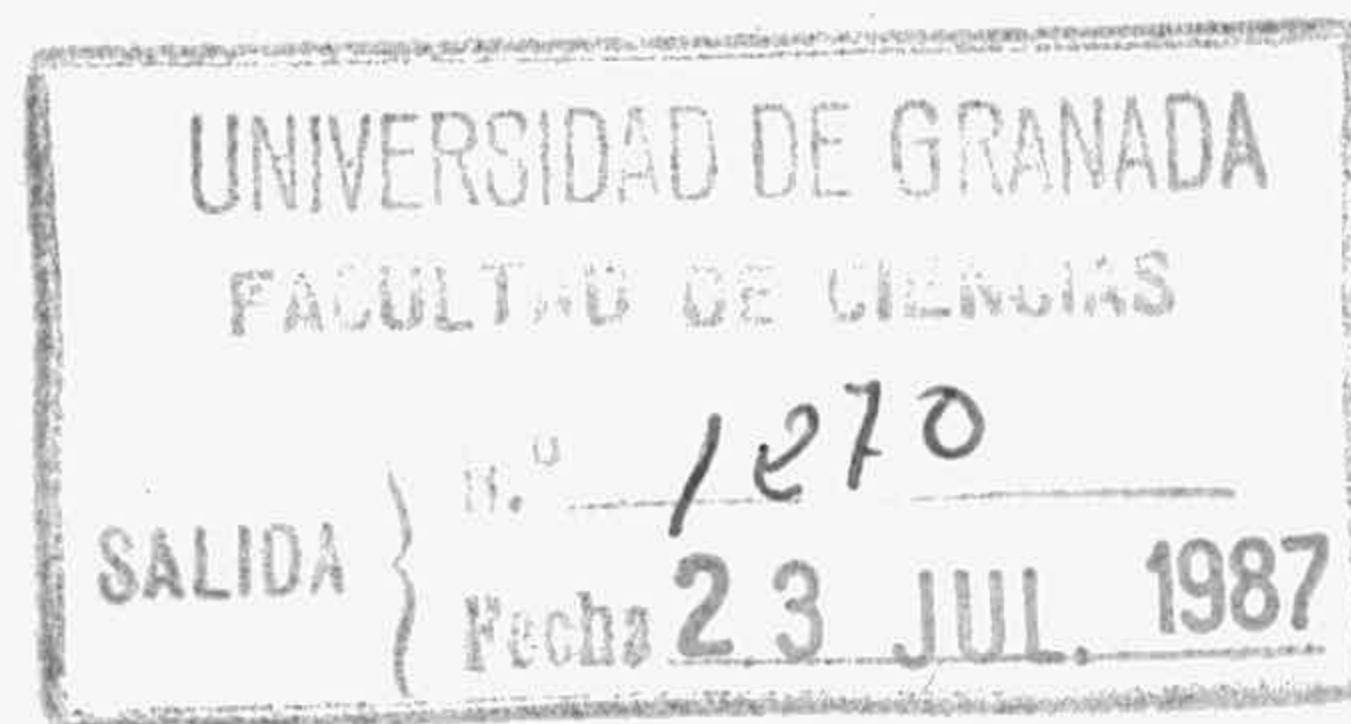
JUNIO, 1987

ALFONSO ROBLES MEDINA



R. 33.176

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA
18071 - GRANADA



HIDROLISIS ENZIMATICA Y ACIDA DE CELULOSA

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias (Sección de Químicas).

Granada, 25 de Mayo de 1987

Fdo. Alfonso Robles Medina

FERNANDO CAMACHO RUBIO, Catedrático de Ingeniería Química y Director del Departamento del mismo nombre

CERTIFICA: Que el presente trabajo sobre "Hidrólisis enzimática y ácida de celulosa" ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento bajo mi dirección y la del Dr. D. Pedro González Tello, por el Ldo. Alfonso Robles Medina para aspirar al grado de Doctor en Ciencias, Sección de Químicas.

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Dr. D. Fernando Camacho Rubio
Catedrático de Ingeniería
Química

Dr. D. Pedro González Tello
Profesor Titular de
Ingeniería Química

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas:

- A D. Fernando Camacho Rubio y a D. Pedro González Tello por su dirección, interés, ejemplo, enseñanzas y gran dedicación a todos los aspectos relacionados con este trabajo y con mi formación.

- A D^a Encarnación Jurado Alameda por su colaboración y consejos durante la realización de este trabajo.

- A todos los miembros del Departamento de Ingeniería Química que siempre estuvieron dispuestos a prestarme su colaboración y ayuda desinteresada.

- A todos los compañeros que pasaron por el Departamento de Ingeniería Química con quienes compartí las muchas horas de trabajo para la realización de esta Memoria.



a mis padres

a Dolores

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCION.....	15
2.1. APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS....	19
2.1.1. Composición y recursos disponibles.....	19
2.1.2. Procesos físico-químicos.....	23
2.1.3. Procesos bioquímicos o biotecnológicos.....	26
2.1.3.1. Producción de SCP.....	26
2.1.3.2. Obtención de etanol.....	34
2.1.3.3. Dificultades para el aprovechamiento.....	43
2.2. PRETRATAMIENTOS.....	46
2.2.1. Pretratamientos físicos.....	49
2.2.1.1. Pretratamientos mecánicos.....	49
2.2.1.2. Descompresión súbita.....	50
2.2.1.3. Irradiación.....	52
2.2.2. Pretratamientos químicos.....	54
2.2.2.1. Pretratamientos alcalinos.....	54
2.2.2.2. Pretratamientos ácidos.....	55
2.2.2.3. Pretratamientos oxidantes.....	57
2.2.2.4. Disolventes de la celulosa.....	59
2.2.3. Comparación entre pretratamientos.....	66
2.3. CELULASAS.....	68
2.3.1. Mecanismos de actuación de las celulasas....	70
2.3.2. Condiciones de operación: pH y temperatura.....	72
2.3.3. Microorganismos celulolíticos.....	73
2.4. HIDROLISIS ENZIMATICA.....	76
2.4.1. Modelos cinéticos.....	79

2.4.2. Nuevas tecnologías en la hidrólisis enzimática de celulosa.....	91
2.5. HIDROLISIS ACIDA DE RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS...	94
2.5.1. Hidrólisis ácida de hemicelulosa.....	98
2.5.2. Hidrólisis ácida de celulosa.....	100
2.5.2.1. Modelo cinético.....	100
2.5.2.2. Influencia de las condiciones experimentales.....	104
2.5.3. Procesos industriales.....	107
3. TECNICA EXPERIMENTAL.....	111
3.1. METODOS ANALITICOS.....	113
3.1.1. Análisis de azúcares reductores.....	113
3.1.2. Análisis de glucosa.....	119
3.2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA PARA CELULASAS.	123
3.3. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE OPERACION SOBRE LA ACTIVIDAD CELULOLITICA.....	127
3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	131
3.4.1. Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa.....	131
3.4.2. Pretratamientos e hidrólisis enzimática de celulosa.....	132
3.4.2.1. Pretratamientos.....	132
3.4.2.2. Hidrólisis enzimática.....	135
3.4.3. Hidrólisis ácida de celulosa.....	137
4. RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	139
4.1. HIDROLISIS ENZIMATICA DE CARBOXIMETILCELULOSA.....	141

4.2. HIDROLISIS ENZIMATICA DE CELULOSA PRETRATADA...	159
4.3. HIDROLISIS ACIDA DE CELULOSA.....	171
4.4. HIDROLISIS ENZIMATICA DE CELULOSA PREHIDROLIZADA CON ACIDO SULFURICO.....	178
5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS.....	181
5.1. HIDROLISIS ENZIMATICA DE CARBOXIMETILCELULOSA.....	183
5.1.1. Efecto sinérgico.....	189
5.1.2. Modelo cinético.....	207
5.2. HIDROLISIS ENZIMATICA DE CELULOSA PRETRATADA...	236
5.2.1. Ajuste empírico de los resultados experimentales.....	245
5.2.2. Comparación de la eficacia de los pretratamientos ensayados.....	265
5.3. HIDROLISIS ACIDA DE CELULOSA.....	273
5.3.1. Velocidad de aparición de azúcares reductores.....	274
5.3.2. Velocidad de aparición de glucosa.....	298
5.3.3. Hidrólisis enzimática de celulosa prehidrolizada con ácido sulfúrico.....	319
6. CONCLUSIONES.....	321
7. NOMENCLATURA.....	327
8. BIBLIOGRAFIA.....	337

1. RESUMEN

Uno de los objetivos más interesantes que en la actualidad se plantea a la Comunidad Científica, sobre todo en la vertiente de I + D, es el desarrollo de procesos comerciales que permitan la utilización, de forma económicamente viable, de la biomasa primaria y residual como fuente de energía renovable y como sustrato para la obtención de proteínas a partir de microorganismos unicelulares, SCP. Así, la obtención de etanol y su posterior utilización como combustible líquido o como materia prima de base en la Industria Química Orgánica, parece tener un futuro prometedor. De manera análoga, la utilización de residuos lignocelulósicos como el sustrato para el crecimiento de biomasa, SCP, y el empleo de la mezcla resultante como pienso, puede ser interesante ya que de esta forma se puede contribuir a reducir los costos de importación de proteínas pienso, fundamentalmente soja y maíz.

La utilización racional de los residuos lignocelulósicos para producir etanol y/o SCP implica realizar distintas operaciones sobre el sustrato, cuyo fin es conseguir que esta materia prima sea más fácilmente asimilable por los microorganismos. Por ello lo usual es comenzar con pretratamientos, físicos y/o químicos, del residuo lignocelulósico, con objeto de hacerlo más accesible al ataque enzimático; a continuación se somete al sustrato pretratado a hidrólisis enzimática y el caldo resultante se lleva a una fermentación aerobia (SCP) o anaerobia (etanol). Aunque el procedimiento descrito es el más utilizado, en la actualidad también se están intentando procesos en que la hidrólisis enzimática y la fermentación (aerobia o anaerobia) se reali-

zan simultáneamente a partir de un mismo microorganismo; por ejemplo C. thermocellum para la producción de etanol y Ch. cellulolyticum en el caso de la obtención de SCP. Sin embargo, los rendimientos obtenidos, sobre todo en la fermentación etanólica, son muy bajos; no obstante es posible que los avances tecnológicos y sobre todo el aporte de la Ingeniería Genética, hagan que estos procesos alcancen mayores posibilidades para una explotación comercial.

Una variante de todos los procesos anteriores, que podríamos llamar bioquímicos o biotecnológicos, consiste en sustituir las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática, por una hidrólisis ácida con H_2SO_4 diluido y temperaturas altas; en estos procesos se obtiene un caldo relativamente rico en glucosa que posteriormente se lleva a fermentación. Sin embargo, esta hidrólisis es menos selectiva que la enzimática y la posibilidad de obtener productos tóxicos para los microorganismos (como consecuencia de la degradación de la glucosa) es alta y ha sido comentada en la bibliografía.

Las dificultades más importantes que se presentan para el desarrollo comercial de los procesos biotecnológicos residen, fundamentalmente, en la propia naturaleza del sustrato, debido a su estructura cristalina y a la barrera física que supone la lignina, ya que ambas dificultan el posterior ataque enzimático. Si a estos hechos se une la baja actividad de las celulasas comerciales y la inhibición-represión que se puede producir sobre los microorganismos durante la fermentación, se comprende que el tema es apasionante y digno de estudio. Conscientes de este hecho el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada comenzó hace años una línea de Investigación sobre "Hidrólisis y Fermentación de Residuos Lignocelulósicos", financiada por la

CAICYT, proyecto nº 306/81, que se complementa en la actualidad con el proyecto "Alternativas Tecnológicas para la Fermentación Etanólica de Hidrolizados de Residuos Lignocelulósicos", financiado por la Junta de Andalucía, proyecto nº 2/12. En esta memoria se da cuenta de los resultados obtenidos durante la hidrólisis de carboximetilcelulosa, CMC, y de una celulosa microcristalina que ha sido sometida a diferentes pretratamientos químicos. También se ha estudiado la hidrólisis ácida de este sustrato con H_2SO_4 concentrado y temperatura ambiente (30°C).

La hidrólisis enzimática de celulosa y en general de cualquier residuo lignocelulósico, se lleva a cabo poniendo al sustrato en contacto con celulasas en un medio acuoso. Las celulasas constituyen un grupo de enzimas hidrolíticas que rompen los enlaces β -1,4-glicosídicos, que enlazan las unidades de anhidroglucosa en las cadenas de celulosa. Las celulasas están formadas fundamentalmente por tres grupos de enzimas:

endo- β -1,4-glucanasa	EC.3.2.1.4
exo- β -1,4-glucanasa	EC.3.2.1.91
β -1,4-glucosidasa	EC.3.2.1.21

y se obtienen a partir de microhongos celulolíticos como por ejemplo el T. viride, y fundamentalmente el T. reesei. El mecanismo más admitido para la actuación de cada una de ellas es el siguiente:

- Las endoglucanasas, E_1 , forman complejos intermedios con las cadenas de celulosa y las hidrolizan al azar, dando lugar a cadenas de menor grado de polimerización y otros azúcares reductores solubles cuyo grado de polimerización DP es inferior a seis, $DP \leq 6$.

- Las exoglucanasas, E_2 , se unen a los extremos

no reductores de las cadenas de celulosa separando celobiosa, y finalmente se admite que

- la β -1,4-glucosidasa, E_3 , hidroliza en disolución la celobiosa a glucosa.

Si a este mecanismo de actuación se une la existencia de una reacción heterogénea y otra homogénea y un posible sinergismo entre E_1 y E_2 , se comprende que la hidrólisis enzimática de la celulosa es compleja y por tanto difícil de representar mediante modelos sencillos. Por ello, y para obviar los inconvenientes de un sistema heterogéneo, se han planificado experimentos de hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa en un sistema homogéneo.

La carboximetilcelulosa utilizada ha sido CMC de baja viscosidad, Sigma C-8758 y el complejo celulolítico celulasas de T. viride, cuya actividad se ha medido sobre celulosa microcristalina, CMC y celobiosa, a pH = 4,9 y 40°C. Así mismo se ha comprobado la posible desnaturalización de la enzima en estas condiciones de operación; en todos los casos se ha obtenido que las celulasas son estables, a pH = 4,9 y 40°C, hasta tiempos de reacción de, al menos, 96 h.

En los experimentos con CMC se ha ensayado la influencia de la intensidad de tratamiento enzimático, $C_{E_0} t$, y se han planificado de forma tal que se pudiera poner de manifiesto el sinergismo entre E_1 y E_2 . En todos los casos la mezcla reaccionante ha estado formada por 2 ml de una disolución de CMC de distintas concentraciones (1,2; 2,0; 3,0; 5,0; 10,0; 20,0 y 25,0 g/l) y 0,2 ml de disolución de enzima (de 50 mg/l a 4 g/l); la temperatura ha sido 40°C, el pH = 4,9 y los tiempos de incubación inferiores a 15 h. Mediante estos experimentos se ha puesto de manifiesto la existencia de un

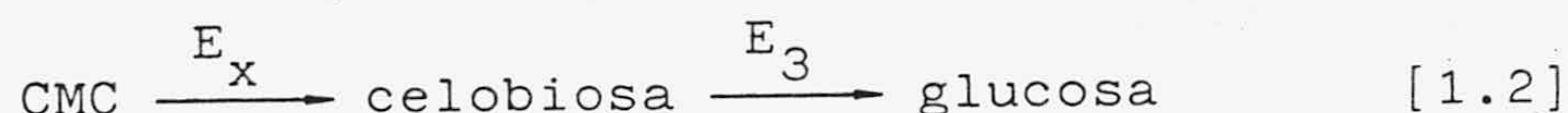
sinergismo entre E_1 y E_2 y se han interpretado los resultados cinéticos, en ausencia de sinergismo, mediante un modelo que contempla la acción conjunta de las endo y exoglucanasas.

El sinergismo observado entre E_1 y E_2 se ha puesto de manifiesto mediante experimentos realizados a valores de $C_{E_0}t$ constantes y se demuestra por la contribución de un término de segundo orden (con respecto a la concentración de enzima) en la conversión obtenida para la CMC. Este efecto es independiente de la concentración de sustrato, aumenta con la concentración de la enzima y disminuye con el tiempo de hidrólisis. La contribución del sinergismo sobre la concentración total de azúcares reductores se ha cuantificado en los intervalos investigados mediante la expresión:

$$C_A - C_{A\infty} = \frac{2,34}{t} (C_{E_0}t)^{0,8} \quad (\text{mg/l}) \quad [1.1]$$

donde C_A y $C_{A\infty}$ corresponden a las concentraciones totales de azúcares reductores obtenidas en presencia y ausencia de sinergismo, respectivamente.

Por otra parte, los experimentos cinéticos de CMC realizados en ausencia de sinergismo, se han interpretado mediante un modelo de dos reacciones en serie con inhibición competitiva de producto en ambas. El esquema del modelo es



Este esquema de reacción implica que el sistema puede representarse por la acción consecutiva de la exoglucanasa y de la β -1,4-glucosidasa. De acuerdo con este mecanismo las ecuaciones cinéticas propuestas son:

$$\frac{dC_A}{dC_{E_0} t} = \frac{K_{ao} (C_{So} - C_A - C_D)}{1 + K_c C_D} + \frac{K_{do} C_D}{1 + K_f C_A} \quad [1.3]$$

para la velocidad total del proceso y

$$\frac{dC_D}{dC_{E_0} t} = \frac{K_{ao} (C_{So} - C_A - C_D)}{1 + K_c C_D} - \frac{K_{do} C_D}{1 + K_f C_A} \quad [1.4]$$

para la hidrólisis en fase homogénea de la celobiosa. Para integrar las ecuaciones [1.3] y [1.4] se ha recurrido al método de Runge-Kutta de cuarto orden y mediante sucesivos tanteos se han obtenido los valores de las constantes cinéticas que mejor ajustan nuestros resultados. Este modelo permite evaluar las conversiones obtenidas, en función del producto $C_{E_0} t$, con desviaciones inferiores a $\pm 10\%$.

La hidrólisis enzimática de un sistema heterogéneo se ha llevado a cabo sometiendo a hidrólisis a una celulosa microcristalina (Avicel Merck 2330) pretratada con distintos disolventes de la celulosa (H_2SO_4 del 70% en peso, FeTNa y zincóxeno) y NaOH 1,5 M. Estos pretratamientos se han realizado en un reactor agitado, 300 rpm, y temperatura ambiente, 30°C. La cantidad inicial de sustrato en todos los casos es 5 g y las variables de pretratamiento ensayadas son la relación disolvente/sustrato, D/S, (entre 1 y 20 ml/g) y el tiempo de pretratamiento, t_p , (entre 1 y 6 h). Después de cada pretratamiento se reprecipita la celulosa disuelta con agua o metanol y el sustrato obtenido se somete a hidrólisis enzimática con celulasas de T. viride a 40°C, pH = 4,9 y E/S = 2 mg enzima/g sustrato; la cinética del proceso se ha seguido mediante la determinación de azúcares reductores totales y glucosa.

Los resultados cinéticos obtenidos durante la

hidrólisis enzimática de la celulosa pretratada se han interpretado mediante un mecanismo análogo al representado por la ecuación [1.2], es decir



La primera reacción transcurre en la interfase sustrato-medio acuoso, liberando fundamentalmente celobiosa y otras cadenas solubles de $DP > 2$; se comprende, por tanto, que la eficacia del pretratamiento vendrá dada, para las mismas condiciones de operación, por la cantidad inicial de cadenas solubles liberadas, que en nuestro caso está relacionada con una disminución de la cristalinidad y/o un aumento del área interfacial específica.

Para reproducir los resultados experimentales se ha utilizado el modelo hiperbólico propuesto por Holtzapple y col.:

$$X_D = X_{Dmax} \frac{t}{t_{1/2} + t} \quad [1.6]$$

donde X_D es la conversión del sustrato a cadenas solubles de $DP > 1$, en mg/g de sustrato, y X_{Dmax} y $t_{1/2}$ son los parámetros del modelo. Mediante [1.6] se reproducen todos los resultados experimentales con desviaciones inferiores a $\pm 10\%$. Este modelo también se ha utilizado para estimar la velocidad inicial de producción de cadenas solubles de $DP > 1$, r_o , ya que para $t = 0$ se cumple

$$r_o = \left(\frac{dX_D}{dt} \right)_{t=0} = \frac{X_{Dmax}}{t_{1/2}} \quad [1.7]$$

Los valores de r_o se han utilizado para caracterizar la bondad del pretratamiento. Así, de los pretratamientos

realizados (H_2SO_4 del 70%, FeTNa, zincoxen y NaOH 1,5 M a 30°C), el más eficaz, con gran diferencia, es el llevado a cabo con H_2SO_4 del 70% y de acuerdo con los resultados obtenidos para r_o se pueden ordenar, en cuanto a su eficacia, de la siguiente forma:



Para el pretratamiento con H_2SO_4 del 70% la velocidad inicial de producción de cadenas solubles, r_o , ha resultado ser función de D/S y del tiempo de pretratamiento, t_p , de acuerdo con la ecuación

$$r_o = 2,8 (D/S) t_p^{0,3} \quad [1.8]$$

D/S en ml/g y t_p en horas. A partir de esta ecuación es posible optimizar (en el intervalo investigado) la influencia de t_p y D/S para conseguir abaratar los costos de los pretratamientos con H_2SO_4 del 70%.

Dado que durante los pretratamientos con H_2SO_4 del 70% se obtiene una solubilización apreciable de la celulosa (del orden del 60%) que aumenta con D/S y t_p , se planificaron diferentes ensayos de hidrólisis ácida con H_2SO_4 concentrado. En todos los experimentos se ha partido de 1 g de celulosa microcristalina, Avicel Merck 2330, que se deposita en un vaso de precipitados; a continuación se añade H_2SO_4 de la concentración deseada y en la cantidad elegida. En todos los casos se detiene la hidrólisis mediante la neutralización con NaOH 1,3 M; la suspensión resultante se agita intensamente durante 15 min y en ella se determinan azúcares reductores totales y glucosa. Las variables de operación ensayadas son la temperatura ($25, 30, 35$ y 40°C), la concentración de ácido (31,0; 45,0; 58,5; 62,0; 65,0 y 70,0% en peso) y la relación disolvente/sustrato (1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 y 5,0 ml/g).

Los resultados obtenidos mediante estos ensayos indican que para $D/S \leq 1$ ml/g y concentraciones de H_2SO_4 inferiores al 62%, $C_a < 62\%$, el ácido ejerce fundamentalmente sobre el sustrato un efecto "swelling". En cambio para las relaciones disolvente/sustrato comprendidas entre 1,5 y 5 ml/g, $1,5 \leq D/S \leq 5$ ml/g, y $62\% \leq C_a \leq 70\%$, se obtiene, a todas las temperaturas ensayadas, la hidrólisis parcial de la celulosa y su solubilización total; el tiempo de solubilización depende de las variables de operación ensayadas:

$$t_d = 0,57 (1 - 0,125(D/S)) C_a^{-8,0} \exp\left(\frac{89,6}{RT}\right) \quad [1.9]$$

donde C_a está expresada en tanto por ciento, D/S en ml/g, la energía de activación aparente en KJ/mol y t_d en horas. En las condiciones en que se produce la solubilización total de la celulosa, $D/S \geq 1,5$ ml/g y $C_a \geq 62\%$, los resultados experimentales obtenidos para azúcares reductores se ajustan a una cinética de orden cero:

$$\frac{dA}{dt} = k \quad 0 \leq t \leq t_d \quad [1.10]$$

En [1.10] la velocidad específica de aparición de cadenas solubles, k , ha resultado ser función de la temperatura, de la concentración de ácido y de D/S , de acuerdo con la expresión:

$$k = 6,73 \cdot 10^{-4} (D/S) C_a^{13,41} \exp\left(\frac{-113,6}{RT}\right) \quad [1.11]$$

donde D/S está en ml/g, C_a en tanto por cien en peso y la energía de activación aparente se expresa en KJ/mol.

Por otra parte, la velocidad de aparición de glucosa, en el intervalo de temperatura de 25 a 40°C,



$62 \leq C_a \leq 70\%$ y $1,5 \leq D/S \leq 5$ ml/g, se ajusta a un modelo de dos reacciones pseudohomogéneas, en serie y de primer orden:



De acuerdo con [1.12] la velocidad de producción de glucosa es

$$\frac{dG}{dt} = k_1 S - k_2 G \quad [1.13]$$

donde S es la cantidad de celulosa en cada instante, expresada en glucosa potencial, y G es la cantidad de glucosa liberada, ambas en mg/g.

Por integración de [1.13] se obtiene que

$$G = S_0 \frac{k_1}{k_1 - k_2} (\exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t)) \quad [1.14]$$

Mediante [1.14] se han obtenido los valores de k_1 y k_2 que mejor ajustan nuestros resultados. Estos parámetros cinéticos se han correlacionado con las variables de operación, resultando que

$$k_1 = 4,91 \cdot 10^8 (D/S) C_a^{6,0} \exp\left(\frac{-127,6}{RT}\right) \quad [1.15]$$

$$k_2 = 1,33 \cdot 10^{25} (D/S) C_a^{0,77} \exp\left(\frac{-166,7}{RT}\right) \quad [1.16]$$

donde D/S está expresada en ml/g, C_a en tanto por cien en peso de ácido y la energía de activación aparente en KJ/mol.

Si se comparan los rendimientos en glucosa obtenidos en esta investigación con los publicados por otros

autores para la hidrólisis ácida con H_2SO_4 diluido y altas temperaturas, se comprueba que ambos son del mismo orden ($\approx 30 - 40\%$). Sin embargo, la hidrólisis con H_2SO_4 concentrado y temperaturas bajas tiene, a nuestro juicio, la ventaja de conseguir la solubilización total de la celulosa y por tanto un alto rendimiento en azúcares solubles de $DP \geq 2$. Por ello es posible que la optimización de los procesos destinados a la obtención de hidrolizados ricos en glucosa (limpios de productos de degradación y a costos razonables) implique la utilización de un proceso en dos etapas. En la primera de ellas se utiliza el ácido concentrado como pretratamiento y prehidrólisis y en la segunda se realizaría una hidrólisis enzimática con celulasas ricas en β -1,4-glucosidasa (o con adición de esta enzima), ya que el porcentaje de celobiosa en disolución es previsiblemente elevado.

Conscientes de este hecho, se han realizado experimentos de hidrólisis enzimática ($pH = 4,9$, $40^\circ C$ y celulasas de T. viride) de celulosa pretratada y parcialmente hidrolizada con H_2SO_4 del 70% ($D/S = 3$ ml/g, $t_p = 6$ h y $40^\circ C$) con distintas relaciones enzima/sustrato (5, 10 y 30 mg de enzima/g sustrato). Los datos obtenidos indican que las conversiones de la celulosa pueden ser del orden del 50%. No obstante es posible que se puedan mejorar estos resultados utilizando celulasas más ricas en β -1,4-glucosidasa. En la actualidad se continúa trabajando en esta línea.

2. INTRODUCCION

En la actualidad parece evidente que la biomasa primaria y residual será en un futuro inmediato la principal fuente de recursos con que contará la Humanidad para la obtención de alimentos, productos químicos orgánicos e incluso combustibles líquidos y gaseosos, debido al agotamiento y creciente encarecimiento de la biomasa fósil (petróleo, carbón y gas natural), Joglekar y col. (1983), Sarkanen y Tillman (1980), Barnett y col. (1976) y Fernández González (1980).

En este sentido, los residuos de carácter lignocelulósico constituyen una materia prima renovable y abundante cuyo aprovechamiento es deseable.

Por otra parte, el desplazamiento de las materias primas de la Industria Química hacia la biomasa primaria y residual ha determinado un interés creciente por los procesos microbiológicos de aprovechamiento de la misma. Las ventajas de estos procesos se pueden resumir en:

- Se reduce el consumo de energía y se incrementa la seguridad debido a que generalmente se opera a presiones y temperaturas próximas a las ambientales.

- Disminuye el riesgo de contaminación del entorno industrial, a la vez que se utilizan residuos que por su naturaleza es necesario eliminar.

- Aumenta la productividad y el aprovechamiento de la materia prima, como se deduce de comparar los tiempos de duplicación de los microorganismos con los



de las plantas y animales superiores y la selectividad de una reacción enzimática con la de una reacción química no biológica.

La aplicación de los desarrollos tecnológicos de la Industria Química y de los recientes avances de la Ingeniería Genética a los procesos microbiológicos han dado lugar a que la Biotecnología se convierta en una de las áreas de conocimiento más dinámica e innovadora de los años ochenta; en este sentido se estima que el mercado para los procesos biotecnológicos será de billones de pesetas para finales de siglo, Joglekar y col. (1983).

2.1. APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS

2.1.1. Composición y recursos disponibles

Los residuos lignocelulósicos están formados fundamentalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. En la tabla 2.1 se dan las composiciones de algunos tipos de estos residuos. Estos contenidos varían mucho de unos residuos a otros e incluso dependen del lugar, condiciones de cultivo, variedades, etc; en general, el contenido en celulosa de las maderas es superior al de los residuos de forrajeras.

En la tabla 2.2 se indican las velocidades medias de generación de los residuos agrícolas y forestales más abundantes en Andalucía, según datos del Centro de Estudios de la Energía (1980). Por otra parte, la generación media de residuos sólidos urbanos se estima en 0,7 Kg por habitante y día, lo que permite evaluar la producción de residuos sólidos urbanos de carácter orgánico en 1,5 MM Tm/año. En consecuencia, la Comunidad Autónoma Andaluza dispone de unos 8 MM Tm/año de residuos lignocelulósicos que pueden constituir una buena fuente de etanol, proteínas unicelulares (single cell protein, SCP), biogas, etc.

En la figura 2.1 se indican las principales vías para el aprovechamiento de estos residuos, divididas en dos grandes grupos:

- Procesos físico - químicos.
- Procesos bioquímicos o biotecnológicos.

Tabla 2.1

Composición de algunos residuos celulósicos, McGinnis y col. (1983).

Fuente	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Basuras urbanas (1)	61	2	9
Maderas blandas	45-50	25-35	25-35
Maderas duras	40-55	24-40	18-25
Forrajeras, paja de cereales, caña de azúcar	25-40	25-50	10-30

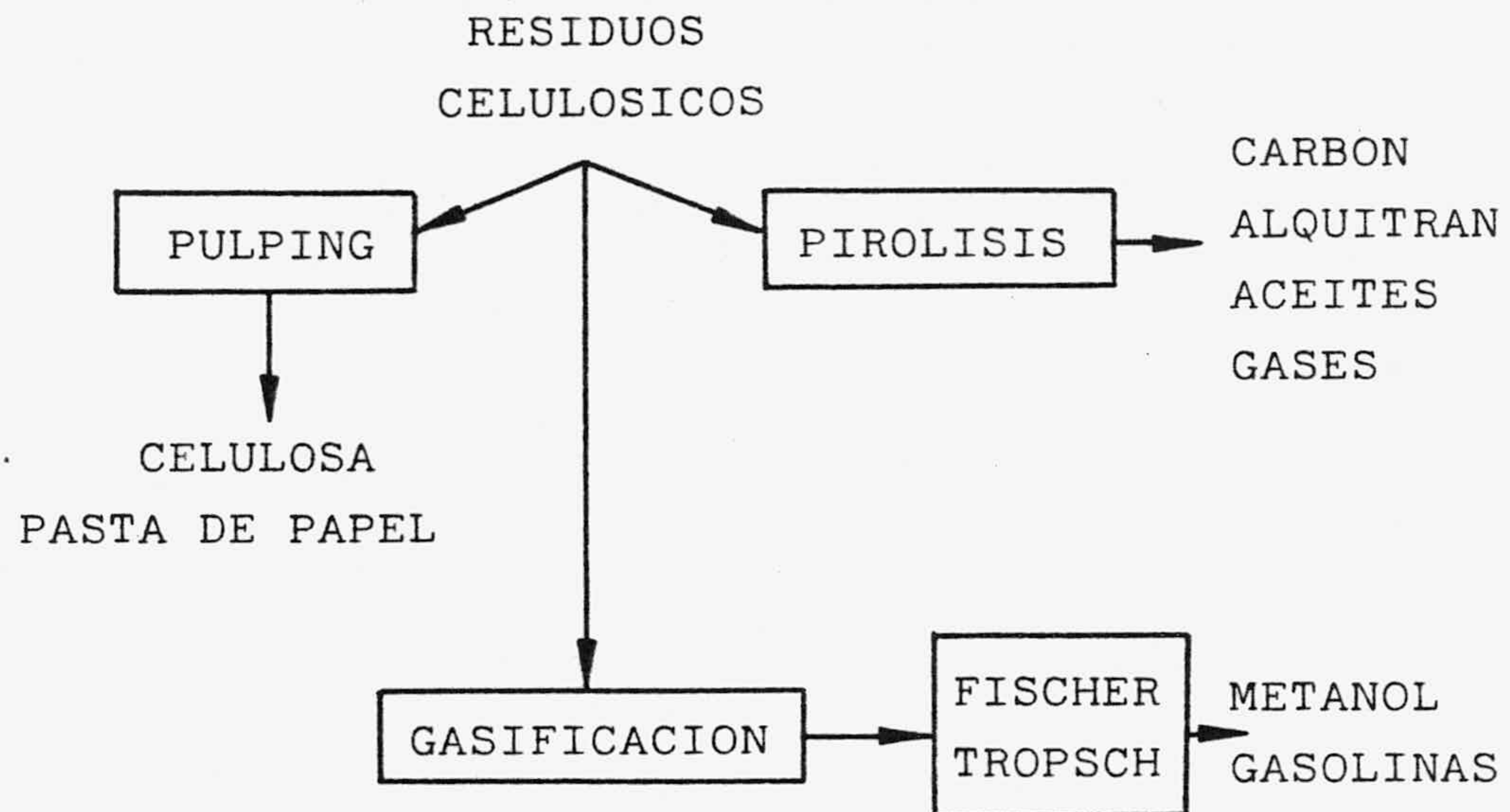
(1) Después de eliminar plásticos y metales.

Tabla 2.2

Residuos agrícolas y forestales estimados para Andalucía en Tm/año (Centro de Estudios de la Energía, 1980).

Origen	(Tm/año) 10^{-3}	Origen	(Tm/año) 10^{-3}
Paja de trigo	1196	Residuos de cultivos	
Paja de cebada	584	industriales:	
Paja de avena	90	Girasol	315
Paja de arroz	217	Algodón	247
Paja de maiz	696	Caña de azucar	157
Poda de naranjo	20	Residuos forestales	650
Poda del almendro	93	(podrían llegar a	
Poda del olivar	787	2 MM de Tm/año)	
Poda del viñedo	46		

PROCESOS FISICO-QUIMICOS



PROCESOS BIOQUIMICOS

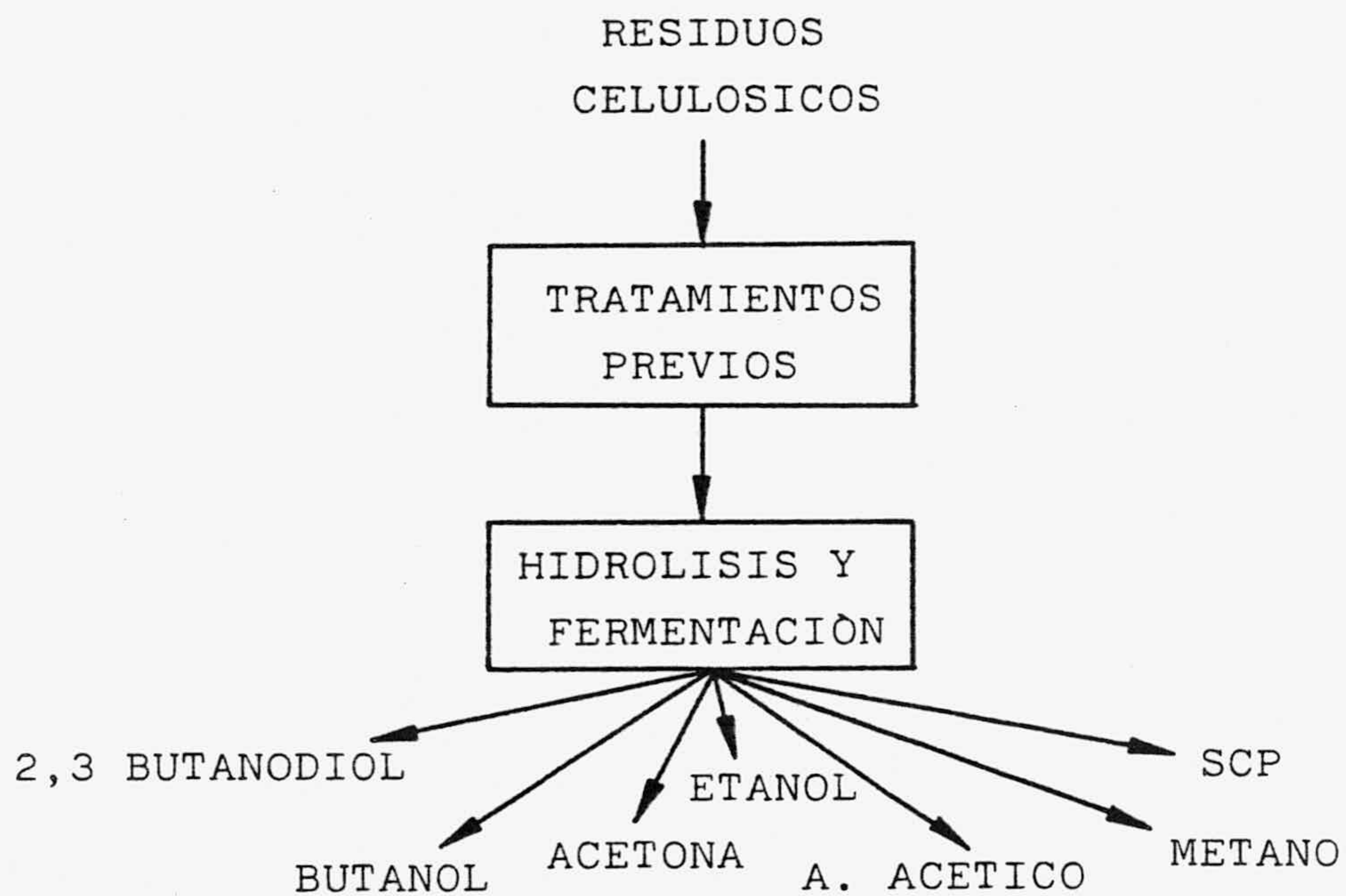


Figura 2.1.- Principales vias para el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos.

2.1.2. Procesos físico-químicos

Los más importantes son los procesos de "pulping" (obtención de celulosa y pasta de papel) y los de pirólisis y gasificación. El primero de ellos es sobradamente conocido y se puede seguir en los tratados clásicos de Química Industrial, por ejemplo en A. Vian: Curso de Introducción a la Química Industrial (1976). En cuanto a los dos restantes (pirólisis y gasificación), son técnicas conocidas de antiguo, sobre todo en su aplicación al carbón, Vian (1976), que casi se abandonaron al finalizar la II Guerra Mundial, pero que la crisis energética de 1973-74 ha puesto de actualidad, aunque evidentemente modernizadas por los avances tecnológicos de estos últimos cuarenta años.

En la actualidad son numerosos los estudios que tratan de obtener productos químicos y combustibles de alto poder calorífico y pequeña densidad a partir de residuos lignocelulósicos por procesos de pirólisis y gasificación, Bueno Cordero y col. (1985), Corella Tudanca y col. (1985), Bilbao Duñabeitia y col. (1985), Font y col. (1985) y Arias Ergueta y col. (1985). Estos estudios parecen coincidir en utilizar un lecho fluidizado como el más adecuado para los procesos de pirólisis, siendo necesario mezclar los residuos con arena o algún componente inerte y pesado, para conseguir una buena fluidización (Corella y col. y Font y col.). Los productos obtenidos son diversos y en cantidades muy variables según las condiciones experimentales utilizadas (temperatura, tamaño de partícula, velocidad de calentamiento, tiempo de residencia, presión, gas o gases que constituyen la atmósfera de reacción, etc) y del sustrato utilizado. La pirólisis de los residuos empieza a unos 200°C en que comienza la degradación de las hemicelulosas; la celulosa se degrada entre 240°C y 300°C (Bilbao y col.) produciéndose siempre una mezcla de CO y CO₂,

compuestos volátiles, hidrocarburos de cadenas cortas, furfural y un residuo sólido carbonoso. A medida que aumenta la temperatura desciende el rendimiento en líquidos y aumenta el de gases (Font y col.); a temperaturas superiores a 900°C se obtienen productos de alto contenido en H₂, CO₂, CO, CH₄ y C₂H₄.

La pirólisis de cáscara de almendras a 420°C en un lecho fluidizado (Font y col.) conduce a carbón vegetal (29,4%) de una potencia calorífica de 7.400 Kcal/Kg, líquidos, como ácido acético (10,3%), furfural (0,9%), gases, como CO₂ (9%), CO (3,8%) y CH₄ (0,4%), y un residuo seco, separado de los fluidos, de una potencia calorífica de 6.680 Kcal/Kg. Estos procesos pueden llevarse a cabo en atmósferas inertes de helio, helio/vapor de agua o CO, Ross y Fong (1981).

La utilización de catalizadores tales como NaOH, KOH, FeCl₃, CoCl₂, ZnCl₂, K₂CO₃, BaCO₃, K₂SO₄, etc, modifica notablemente la composición del residuo obtenido. Así, por ejemplo, la adición de CoCl₂ modifica la composición de la fase líquida obteniéndose hasta un 5,2% en furfural, Font y col. (1985).

También de la fracción lignínica es posible obtener productos químicos de gran interés como CO, CO₂, CH₄, C₂H₆, C₂H₂, C₂H₄, C₃H₆ y carbón con tiempos de residencia de 2-3 segundos, Antal (1983).

La obtención de hidrocarburos de cadena corta, CO y H₂ mediante un proceso de gasificación, seguido de la síntesis de Fisher-Tropsch produce hidrocarburos alifáticos de cadena lineal (gasolinas) y derivados oxigenados (metanol).

Existen otras posibilidades de aprovechamiento físico-químico de los residuos como es la oxidación

húmeda de la madera a altas temperaturas (170-280°C) para la obtención de productos orgánicos, fundamentalmente ácido fórmico, ácido acético, metanol, etc, McGinnis y col. (1983).

No obstante, si bien estos procesos reciben alguna atención, las vías más prometedoras parecen ser las basadas en procesos bioquímicos y fundamentalmente aquellas que conducen a la obtención de etanol y a la producción de biomasa, SCP.

2.1.3. Procesos bioquímicos o biotecnológicos

Como se indica en la figura 2.1 mediante estos procesos se somete a los residuos celulósicos a unos pretratamientos previos a fin de facilitar el acceso de las enzimas y/o microorganismos hasta las fibras de hidratos de carbono y para hacer más viable la hidrólisis y/o fermentación de estos componentes de la biomasa. Estos procesos dan lugar a la obtención de distintos productos químicos como butanol, acetona, ácido acético, metano, etanol, SCP, etc. De todos los procesos, los que sin duda han recibido mayor atención son la producción de metano (biogas), que se obtiene por digestión anaerobia con microorganismos adecuados, y sobre todo, la producción de etanol y SCP. En la figura 2.2 se esquematizan las etapas necesarias para la producción de estos productos; tras los pretratamientos se somete al residuo a una hidrólisis enzimática seguida de una fermentación aerobia para la obtención de SCP o anaerobia si se desea obtener etanol.

2.1.3.1. Producción de SCP

Los residuos lignocelulósicos se caracterizan por su bajo contenido en proteínas, baja digestibilidad, pobre palatibilidad y gran densidad aparente, por lo que su utilización directa en alimentación animal es poco recomendable; en todo caso, residuos cuyo contenido en proteína bruta sea inferior al 8% no son recomendables como piensos.

Así pues, la posible utilización de estos residuos como piensos implica aumentar al menos su contenido en proteínas y/o su digestibilidad. Lo segundo se consigue mediante pretratamientos adecuados y lo primero mediante la utilización de hongos y levaduras capaces de aprovechar estos sustratos para su nutrición y crecimiento.

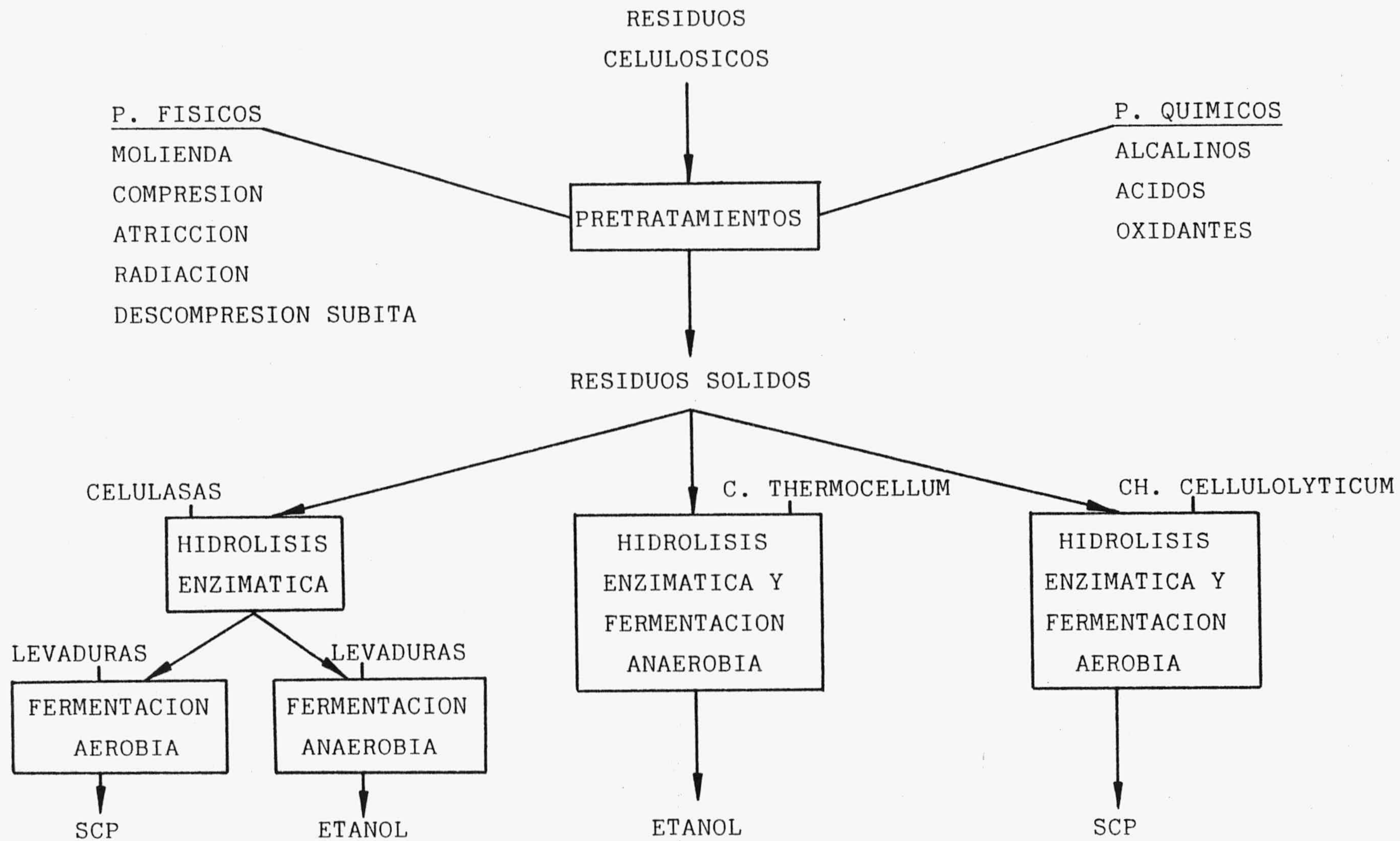


Figura 2.2.- Producción de etanol y SCP a partir de residuos lignocelulósicos.

Mediante los pretratamientos, como ya se ha comentado, tan sólo se consigue aumentar la digestibilidad, ya que al disminuir la cristalinidad y eliminar, en parte, la barrera física que supone la lignina, la celulosa es más fácilmente atacable por el rumen del jugo intestinal o por los microorganismos celulolíticos que se utilizan en la producción de SCP.

Estos pretratamientos pueden ser tan sencillos como, por ejemplo, macerar los residuos con disoluciones diluidas de NaOH, con lo que se consigue aumentar su digestibilidad notablemente, Miron y Ben-Ghedalia (1981), Buchholz y col. (1981), Neely (1984) y Aguilera (1984).

Este pretratamiento tiene hoy una amplia aplicación dada su simplicidad y economía, puesto que basta aplicar sobre el residuo la solución alcalina finamente pulverizada, Boza y col.. También se han empleado, con resultados variables, otros álcalis (KOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NH_4OH , etc), siendo el amoníaco anhidro el que presenta mayor interés ya que resulta económico y eleva el contenido de nitrógeno del material fibroso y, por otra parte, permite obviar el efecto negativo del exceso de NaOH. En términos generales, el tratamiento alcalino disuelve la hemicelulosa, lignina y sílice y no afecta a la celulosa, lo que se traduce en un aumento notable del valor nutritivo del residuo, Boza y col. (1982).

Sin embargo, parece más prometedor y racional utilizar el residuo lignocelulósico como sustrato de una fermentación aerobia para así aumentar su contenido en proteínas y, por tanto, su calidad como alimento o pienso, Cousin (1980), Chahal y col. (1981), Humphrey (1975), Thayer (1978), Srinivasan (1978) y Wilson y Thayer (1978). Esto permitiría paliar la sangría de divisas que supone en la actualidad la importación de

proteínas-pienso, fundamentalmente soja.

Como se muestra en la figura 2.2 la obtención de SCP (y etanol) puede hacerse utilizando microorganismos que realizan la hidrólisis y la fermentación de forma simultánea o realizando en primer lugar una hidrólisis enzimática con celulasas seguida de una fermentación aerobia.

Con respecto a la primera vía, en la tabla 2.3 se indican algunos de los microorganismos más utilizados para este fin y en la tabla 2.4 se muestran, a título de ejemplo, los resultados obtenidos por distintos investigadores con una serie de microorganismos. Si se observan los rendimientos en proteína bruta obtenidos, se comprende que existen unos microorganismos más adecuados que otros para este fin; destaca entre ellos el Chaetomium cellulolyticum. El Trichoderma viride da rendimientos medios en proteínas no demasiado pequeños; sin embargo, este microorganismo es más adecuado para la producción de celulasas (apartado 2.3.3). También se observa en la tabla 2.4 que el rendimiento en proteínas es más alto utilizando como sustrato Solka floc (una celulosa purificada de estructura fundamentalmente amorfa) que cuando se utiliza serrín tratado con NaOH del 1%; esto es debido a la presencia de lignina y a la mayor cristalinidad de la celulosa contenida en el serrín, Moo-Young y col. (1977).

Estos procesos de hidrólisis y fermentación aerobia simultáneos están recibiendo bastante atención y en ellos se basa el proceso propuesto por Moo-Young y desarrollado por la Universidad de Waterloo, cuyo esquema se muestra en la figura 2.3, Moo-Young y col. (1979). Mediante este proceso, patentado en Francia y Canadá, parece que se consigue un producto que contiene un

Tabla 2.3

Microorganismos celulolíticos más utilizados en la obtención de SCP, Srinivasan (1978).

Hongos	Bacterias	Actinomyces
Trichoderma	Cellulomonas	Streptomyces
Myrothecium	Pseudomonas	Thermomonospora
Chaetomiun	Celluvibrio	Thermopolyspora
Pestaloptia	Cytophaga	
Aspergillus		
Penicillum		

Tabla 2.4

Producción de SCP a partir de diferentes sustratos y microorganismos celulolíticos.

Microorganismo	Sustrato	Concentr. sustrato (w/v, %)	Rendimiento proteínas (%)	Concentr. proteínas (g/l)	Tiempo cultivo (h)	Product. proteínas (g/l/h.10 ³)	Ref.
<i>Myrothecium verrucaria</i>	Papel de periódico	4	9,8	3,3	144	22,9	Updegraff (1971)
<i>Thermomonospora fusca</i>	Fibras de celulosa	0,5	30,0	0,40	96	4,1	Crawford y col.(1973)
<i>Sporotrichum pulverulentum</i>	Polvo de celulosa	1	4,3	0,34	168	2,0	Eriksson y Larsson(1975)
<i>T. viride</i>	Paja de cebada NaOH 5,7%	1	23,8	1,84	48	38,3	Peitersen (1975)
<i>Brevibacterium</i> sp	Madera de mesquite	1	-	0,53	72	7,3	Fu y Thayer (1975)
<i>Cellulomonas</i> sp+ <i>Alcaligenes faecalis</i>	Paja de arroz NaOH 4%	1-5	-	1,76	120	14,3	Han y Callihan(1974)
<i>C.cellulolyticum</i>	Solka floc	1	40,3	2,7	36	75,0	Moo-Young y col.(1977)
<i>T. viride</i>	Solka floc	1	22,4	1,1	36	30,6	"
<i>C.cellulolyticum</i>	Serrín NaOH 1%	1	40,0	1,8	36	50,0	"



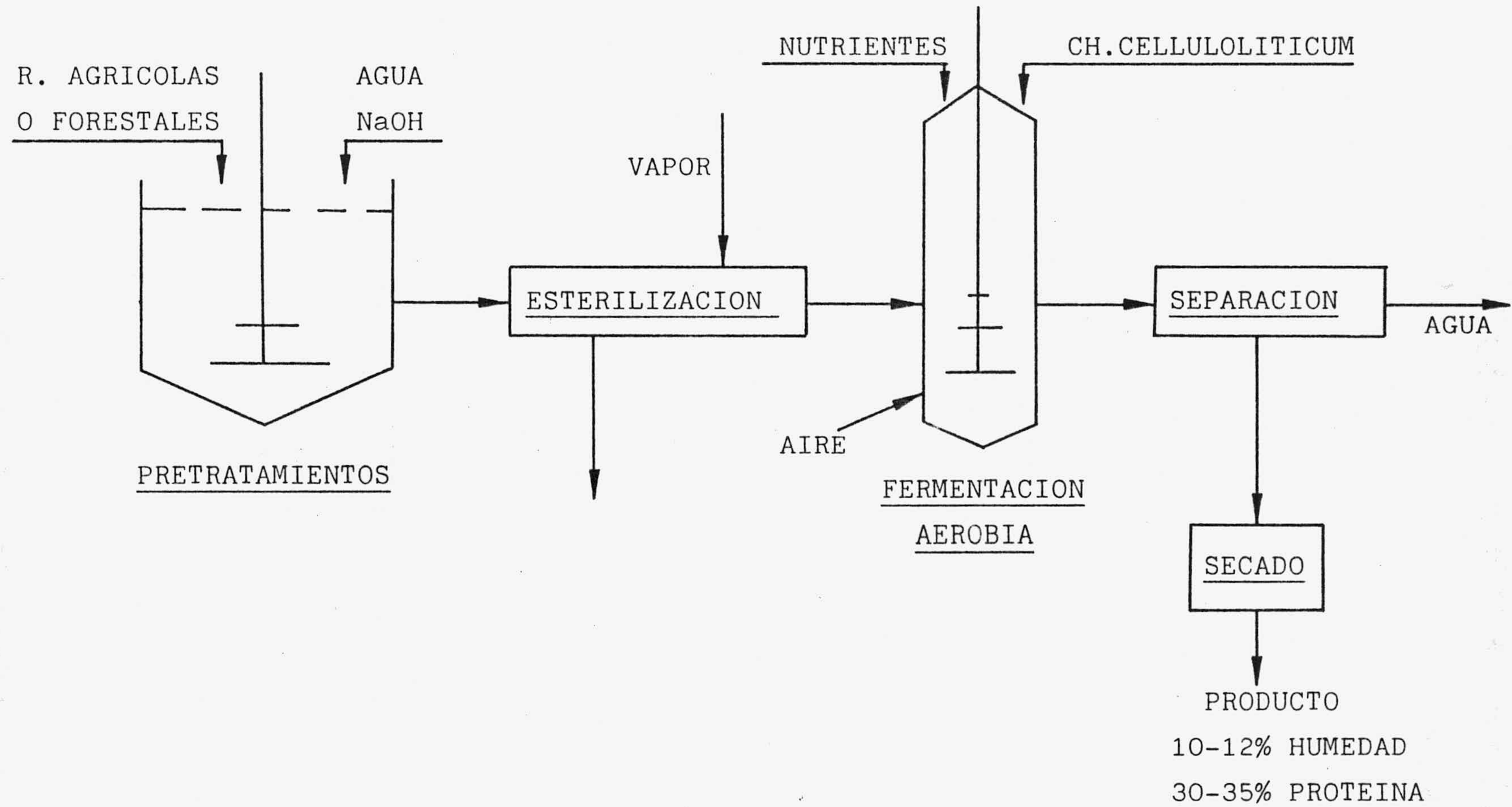


Figura 2.3.- Obtención de SCP mediante hidrólisis y fermentación simultáneas (proceso Waterloo).

35% en proteínas que se destina a piensos; como microorganismo celulolítico se utiliza el Chaetomium cellulolyticum. Sus etapas fundamentales son: pretratamientos, fermentación aerobia y recuperación y adecuación del producto. Los pretratamientos consisten en una digestión alcalina con NaOH diluido, seguida de una esterilización a 150°C y 3 min o 120°C y 15 min. A continuación se enfría la suspensión a 37°C y se le agregan nutrientes, ya que en el medio de fermentación la relación debe ser de N:P:K = 20:2:1. La fermentación aerobia se realiza a pH comprendido entre 5,5 y 6,0 y el tiempo de residencia, en función del sustrato utilizado, está comprendido entre 4 y 12 horas; la temperatura de operación es de 37°C, la concentración de alimento al fermentador es del 3% de sólidos y la relación C/N = 10/1. Dado que el proceso es exotérmico es necesario retirar calor para que la temperatura sea constante. La recuperación y adecuación del producto se realiza mediante una filtración o una centrifugación que separa el líquido sobrenadante de sólidos y SCP; a continuación se secan hasta un 10-12% de humedad y se obtiene un pienso con un 25-35% de proteínas, según el sustrato utilizado.

La obtención de SCP también puede hacerse según un proceso en dos etapas, como se muestra en la figura 2.2, Nishio y Nagai (1981) y Taniguchi y col. (1982). En este caso las etapas a seguir son: pretratamientos, hidrólisis enzimática con celulasas y finalmente una fermentación aerobia con levaduras. En este sentido se dirige el proceso propuesto por Humphrey, Joglekar y col. (1983) y Humphrey (1975), para el aprovechamiento de residuos sólidos urbanos. Las ventajas de este modo de operar estriban en que se utilizan levaduras como fuente de SCP, cuyo crecimiento es rápido; además el pH para la fermentación es 4,5-5,5, lo que minimiza la competición de bacterias y, por tanto, las condiciones de asepsia. Su mayor inconveniente puede

residir en la etapa de hidrólisis enzimática (o ácida) que es un proceso lento y caro.

En la tabla 2.5 se muestran, a título de ejemplo, los consumos de azúcares y pesos secos de células obtenidos con distintas levaduras, Taniguchi y col. (1982). Estos datos corresponden a la fermentación de hidrolizados de paja de arroz previamente tratada con NaClO_2 ; para esta hidrólisis se utilizaron celulasas de Pellicularia filamentosa y se obtuvo una solubilización del 49,1% con porcentajes de azúcares reductores y glucosa sobre los azúcares totales del 61,3 y 38,3%, respectivamente. En todos los casos las levaduras se hicieron crecer sobre hidrolizados que contenían un 2% de azúcares totales. Se comprobó que no todos los microorganismos pueden utilizar cualquier azúcar presente como fuente de carbono; así el S. cerevisiae sólo puede utilizar glucosa, el S. fragilis celobiosa y glucosa, la especie Candida parapsilosis puede utilizar glucosa, xilobiosa y arabinosa y el resto de las especies glucosa, celobiosa y xilobiosa. Como se muestra en la tabla 2.5 la glucosa es consumida prácticamente en su totalidad por todas las levaduras ensayadas, mientras que el consumo de los otros azúcares varía en un amplio rango; esto es debido a la presencia de sacáridos solubles, como celotriosa y otros derivados de la hemicelulosa (como xilobiosa) que no son utilizados por las levaduras como fuentes de carbono.

2.1.3.2. Obtención de etanol

La vía del etanol es interesante debido a las ventajas que en principio presenta esta sustancia como materia prima básica para la Industria Química Orgánica y por su posible utilización como combustible en motores de explosión, Yu y Miller (1980) y Morgan y col. (1981).

Tabla 2.5

Producción de células y consumo de azúcares con varias levaduras a partir de un hidrolizado de paja de arroz pretratada con NaClO_2 , obtenido con celulasas de Pellicularia filamentosa, Taniguchi y col. (1982).

	Consumo de azúcares (%)			Peso seco de células (%)
	Totales	Reductores	Glucosa	
<i>Saccharomices cerevisiae</i>	28,5	48,5	98,0	2,20
<i>Candida parapsilosis</i>	42,1	65,7	97,0	4,40
<i>Saccharomices fragilis</i>	48,5	73,6	98,4	4,27
<i>Rhodotorula glutinis</i>	55,2	81,4	98,4	5,84
<i>Torulopsis xylinus</i>	56,1	86,0	97,6	6,40
<i>Candida utilis</i>	73,1	88,7	98,8	5,88
<i>Candida tropicalis</i>	69,5	90,3	97,6	6,82
<i>Debaryomyces hansenii</i>	75,6	92,2	99,1	4,67
<i>Trichosporon cutaneum</i>	75,8	94,0	98,9	10,1
<i>Candida guilliermondii</i>	74,1	93,1	95,6	7,63

Si bien la bibliografía sobre el tema es abundante, existe poca información sobre procesos comerciales que partiendo de residuos celulósicos conduzcan a la obtención de etanol. No obstante, al igual que con la producción de SCP, los métodos utilizados parecen dividirse en dos grandes grupos según que la hidrólisis y la fermentación se realicen secuencialmente o simultáneamente en el mismo reactor (figura 2.2), Wilke y col. (1983) y Pye y Humphrey (1979).

En el primer grupo (hidrólisis y fermentación separadas) cabe mencionar los procesos desarrollados por el U. S. Army Natick Research and Development Comand (proceso Natick), el Departamento de Ingeniería Química de Berkeley (proceso Berkeley) y el propuesto por el Indian Institute of Technology (proceso IIT). El esquema general de estos procesos se muestra en la figura 2.4 y algunas de sus características se indican en la tabla 2.6. En todos ellos la hidrólisis se lleva a cabo en un tanque agitado y es de destacar que el proceso Natick no recupera la enzima, ya que al parecer utilizan mutantes del T. reesei que producen celulasas de gran selectividad y en cantidades apreciables. En cambio, los procesos IIT y Berkeley necesitan recuperar la enzima para que la operación sea económicamente viable; en el primero de ellos se recuperan las celulasas poniendo el jarabe de hidrólisis en contacto con la alimentación fresca y en el segundo mediante membranas.

La hidrólisis y fermentación simultáneas se realizan mediante dos métodos bien diferenciados: en el primero se agregan al fermentador celulasas que se han producido en un reactor externo, mientras que en el segundo se utiliza un microorganismo, o una mezcla, para producir el complejo celulolítico y llevar a cabo la fermentación.

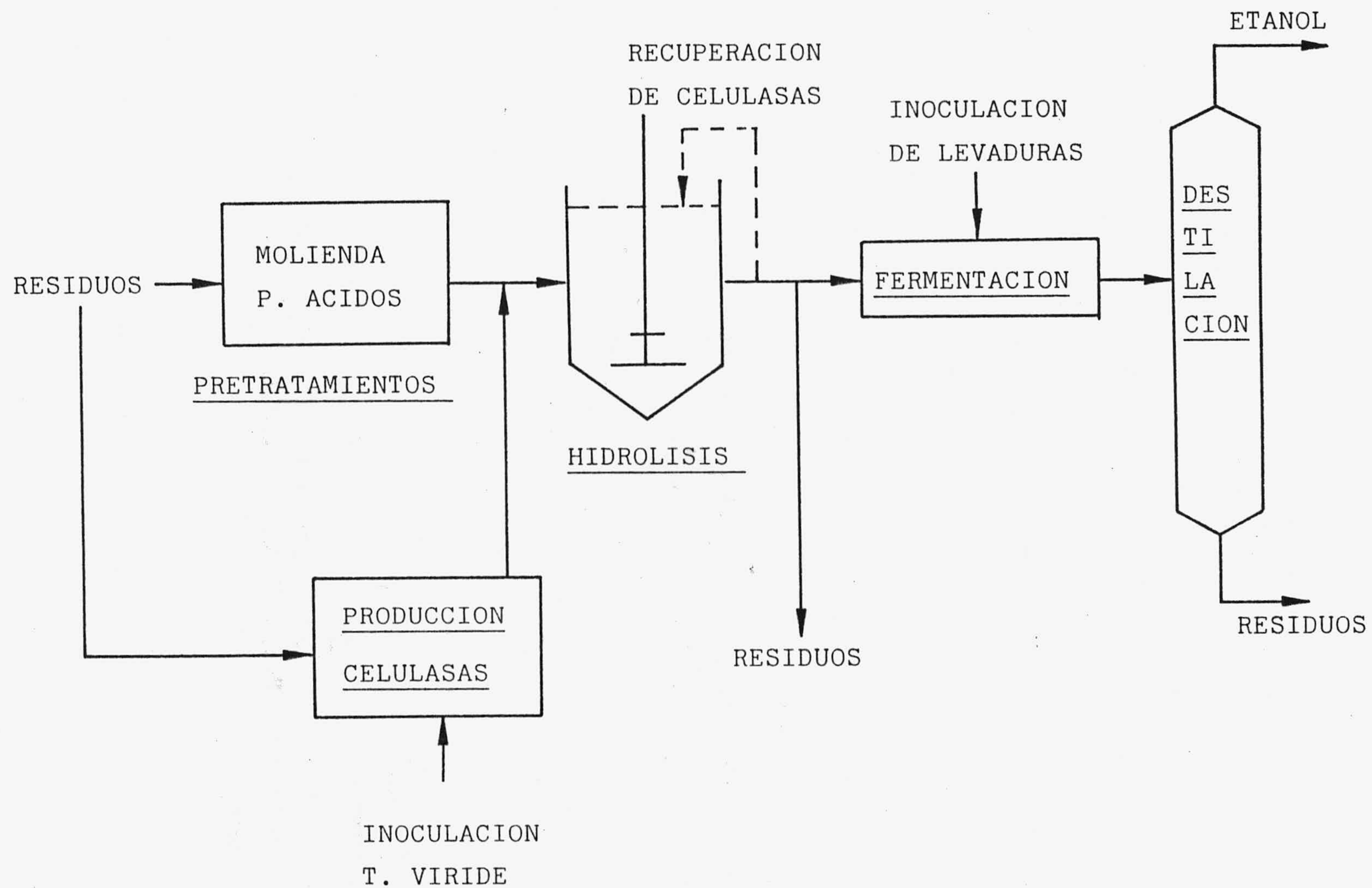


Figura 2.4.- Producción de etanol: hidrólisis y fermentación separadas.

Tabla 2.6

Producción de etanol: hidrólisis y fermentación separadas.

Datos del proceso	Natick	Berkeley	I.I.T.
Sustrato	Residuos urbanos	Caña de maiz Paja de trigo	Celulosas artificiales
Pretratamientos	Molienda	Molienda y t. ácido	Molienda
Celulasas	Trichoderma reesei	T. reesei	T. reesei
Fermentación	Saccharomices cerevisiae	S. cerevisiae	
Producto	Etanol	Etanol	Glucosa y celobiosa
Desarrollo	Planta piloto	Planta piloto	Laboratorio

El primero (hidrólisis con celulasas y fermentación con levaduras) se utiliza fundamentalmente para disminuir considerablemente la inhibición que sufren las celulasas por parte de los productos de la hidrólisis, ya que la concentración de éstos disminuye rápidamente por debajo de los niveles de inhibición. El etanol también inhibe tanto la acción de las celulasas como de las levaduras, aunque esta inhibición es bastante inferior a la que ejercen glucosa y celobiosa sobre las celulasas. Sin embargo, también es posible retirar el etanol por evaporación a vacío para mantenerlo por debajo del nivel de inhibición, tal como hacen Ghose y col. (1984). Estos autores han realizado la hidrólisis y fermentación de paja de arroz utilizando celulasas del T. reesei y el microorganismo Candida acidothermophilum. En estos procesos es necesario encontrar una solución de compromiso entre las condiciones óptimas de la hidrólisis y de la fermentación; Ghose y col. han adoptado 40°C como temperatura óptima de compromiso. A presión atmosférica obtuvieron 23 g/l de etanol en 14 horas, utilizando una concentración de sustrato del 10% (peso/volumen); después de este tiempo no fue posible aumentar más la concentración de etanol debido a la inhibición que éste ejerce sobre las celulasas y sobre la fermentación propiamente dicha; esta inhibición permitió tan sólo una utilización del 58% del sustrato. En las operaciones a vacío, el etanol se elimina cuando su concentración alcanza los 22,6 g/l, después de 10 ciclos se consigue una utilización del sustrato un 40% superior a cuando se opera a presión atmosférica. En la tabla 2.7 se muestran los resultados obtenidos por estos autores con los tres procedimientos operatorios utilizados.

La utilización de un sólo microorganismo para realizar la hidrólisis y fermentación implica que éste debe ser capaz de producir celulasas de alta eficacia y

Tabla 2.7

Obtención de etanol por hidrólisis y fermentación simultáneas con celulasas de T. reesei y el microorganismo Candida acidothermophilum, Ghose y col. (1984).

Proceso	Productividad (g/l/h)	Utilización de celulosa (%)	Rendimiento en etanol (g/g)
Sin vacío	1,25	58,6	0,32
Haciendo vacío en ciclos	1,80	98,0	0,49
Con vacío en ciclos y una etapa de ali- mento de sus- trato.	4,50	97,5	0,52

en cantidad suficiente para, en un medio aerobio, realizar la hidrólisis y la fermentación simultáneamente. Como se indica en la figura 2.2 el más adecuado es el Clostridium thermocellum; este microorganismo ha sido utilizado por Zertuche y Zall (1982) para la obtención de etanol a partir de celulosa pura (Solka floc). Cuando la fermentación se realizó en continuo los rendimientos obtenidos fueron de 0,45 y 0,75 g de etanol por gramo de celulosa, para concentraciones iniciales de sustrato de 1,5% y 3% respectivamente. Sin embargo, a pesar de la factibilidad de la fermentación, tanto en continuo como en discontinuo, el proceso ensayado por estos autores no resulta económicamente viable debido a la baja velocidad de generación obtenida para el microorganismo.

Entre los procesos comerciales que utilizan celulasas externas y levaduras destaca el proceso propuesto por Gulf/Arkansas y entre los que utilizan un mismo microorganismo para realizar la hidrólisis y fermentación, cabe mencionar los procesos M.I.T., GE/CRD y PEN/GE, Wilke y col. (1983). En la tabla 2.8 se recogen algunas de las características más importantes de estos procesos. Como se observa en ella el proceso Gulf/Arkansas utiliza celulasas producidas en un reactor externo y realiza la hidrólisis en presencia de levaduras, mientras que en los restantes se utilizan microorganismos que realizan conjuntamente la hidrólisis y la fermentación y, en consecuencia, se elimina el reactor para la producción de celulasas.

Los microorganismos utilizados en estos procesos son el Clostridium thermocellum y el Cl. thermosaccharolyticum; el primero hidroliza la celulosa a glucosa y celobiosa, la hemicelulosa a xilosa y xilobiosa y puede fermentar a las dos primeras sustancias a etanol, ácido láctico y ácido acético. Sin embargo, como ya se ha

Tabla 2.8

Producción de etanol: hidrólisis y fermentación simultáneas.

Datos del proceso	Procesos			
	Gulf/Arkansas	M.I.T. (1)	GE/CRD (2)	PEN/GE (3)
Sustrato	Residuos municipales	Solka Floc Caña de maiz	Astillas de álamo	Astillas de álamo
Pretratamientos	Atricción Esterilización	Molturación Esterilización	SO ₂ , 300 psi agua, 10-15 min	Extracción disolventes en caliente (etanol, butanol)
Microorganismos	T. reesei S. cerevisiae C. brasicae	C. thermocellum C. thermosaccharoliticum	C. thermocellum C. thermosaccharoliticum	Thermomonospora C. Acetobutilicum C. thermocellum
Productos finales	Etanol	Etanol	Etanol	Etanol, acetona butanol, piensos
Desarrollo	Planta piloto semi-industrial	Laboratorio planta piloto	Planta piloto	Laboratorio planta piloto

(1) Desarrollado por Massachusetts Institute of Technology. (2) Desarrollado por General Electric Corporate Research and Development. (3) Desarrollado por la Universidad de Pensilvania y General Electric.

comentado, los rendimientos que parecen obtenerse con los Clostridium son bajos, por lo que los procesos M.T.I., GE/CRD y PEN/GE, si bien introducen importantes innovaciones requieren más investigación para su total desarrollo comercial.

Los procesos Natick y Gulf/Arkansas son los que parecen estar más desarrollados, ya que según Wilke y col. (1983) estaba previsto que en 1983 entrara en funcionamiento una planta de 2000 Tm/día con tecnología Gulf/Arkansas y es posible su pronta comercialización. La mayor ventaja del proceso Natick es que utiliza celulasas muy eficaces y que han abaratado notablemente su costo de producción.

2.1.3.3. Dificultades para el aprovechamiento

Las dificultades más importantes que se presentan para realizar un tratamiento enzimático o con microorganismos son debidas a la baja actividad de las celulasas (que además resultan ser excesivamente caras), a la inexistencia de microorganismos capaces de realizar eficientemente la hidrólisis y la fermentación y, sobre todo, a la propia estructura de los sustratos.

Desde un punto de vista físico-químico las dificultades más importantes son las inherentes al sustrato, es decir, las debidas a la estructura cristalina de la celulosa y a la barrera física que supone la lignina. Mientras la cristalinidad afecta notablemente a la velocidad del ataque enzimático y/o microbiológico, la lignina dificulta el acceso de enzimas y/o microorganismos hasta las cadenas de celulosa, Millett y col. (1976).

Las hemicelulosas no suponen un inconveniente importante debido a su estructura amorfa, siendo hidro-

lizadas con más facilidad que la celulosa, tanto con enzimas como con ácidos. Sin embargo, la presencia de hemicelulosas puede impurificar los hidrolizados de celulosa por la presencia de pentosas y de productos de degradación de estas sustancias.

La lignina, como ya se ha comentado, dificulta extraordinariamente el acceso enzimático, microbiológico y químico a las moléculas de celulosa, contribuyendo mediante los enlaces celulosa-lignina a la compacidad de la estructura del residuo. Sin embargo, parece afectar poco a la velocidad de hidrólisis en comparación con la estructura cristalina de la celulosa, ya que determinadas maderas se hidrolizan mucho más rápidamente que el algodón (celulosa pura de elevada cristalinidad), Millett y col. (1976). Químicamente es un polímero tridimensional de fenil-propano con grupos fenólicos, siendo sus unidades fundamentales guayacil-propano y siringil-propano.

Desde un punto de vista químico la celulosa es un polímero homogéneo, lineal, de cadenas largas de glucosa en forma de piranosa unidas por enlaces β (1-4). Las fibras de celulosa nativa están constituidas por unidades estructurales primarias llamadas microfibrillas de aproximadamente 300 Å de largas por 150 Å de sección transversal; cada microfibrilla contiene varias fibrillas elementales de alrededor de 30 Å de sección transversal, estando éstas formadas por grupos de moléculas lineales de celulosa. Cada molécula está enlazada a la adyacente por puentes de hidrógeno, hasta dos por unidad de glucosa anhidra. Sin embargo, la forma en que las moléculas de celulosa se ordenan para formar las fibrillas no es bien conocida, habiéndose postulado diferentes modelos que coinciden en diferenciar entre una zona cristalina de gran ordenación y una zona amorfa. La celulosa nativa cristalina está consti-

tuida por una celda monoclinica unidad que contiene cuatro unidades de glucosa anhidra por celda.

Dado que para que se produzca la reacción enzimática, sustrato y catalizador deben estar en contacto físico, la velocidad de hidrólisis será función (en las mismas condiciones de operación) de la superficie interfacial. Este parámetro depende de los tamaños relativos de la enzima y los poros del sustrato, del número de éstos y del grado medio de polimerización de la celulosa, así como de la naturaleza, concentración y distribución de los grupos sustituyentes (en el caso de derivados solubles de la celulosa), Gilbert y Tsao (1983) y Puri (1984).

Por ello, para disminuir las dificultades inherentes a la naturaleza y estructura del sustrato, se realizan distintos pretratamientos sobre los residuos lignocelulósicos.

2.2. PRETRATAMIENTOS

Dado que, como ya se ha comentado, la celulosa contenida en los residuos lignocelulósicos es prácticamente inalcanzable para enzimas y/o microorganismos cuando aquellos se encuentran en su estado original, se comprende que cualquier aprovechamiento racional en el sentido de producir etanol o SCP, implica realizar pretratamientos capaces de alterar la barrera de lignina, reducir la cristalinidad y aumentar el área superficial de la celulosa contenida en los residuos.

El pretratamiento ideal debería reunir las siguientes características:

- 1.- Maximizar la susceptibilidad enzimática.
- 2.- Minimizar las pérdidas de hidratos de carbono.
- 3.- Maximizar la recuperación de lignina como subproducto.
- 4.- Mínimo consumo de energía, productos químicos y equipo.
- 5.- Poder ser utilizado a escala industrial.
- 6.- No impregnar al sustrato con productos químicos tóxicos que inhiban la acción posterior de enzimas y/o microorganismos.

Los pretratamientos pueden clasificarse en físicos y químicos, aunque es evidente que esta distinción no es siempre sencilla. En la tabla 2.9 se recogen algunos de los pretratamientos más usuales en bibliografía. En una primera aproximación puede decirse que los pretratamientos mecánicos incrementan el área externa, mien-

Tabla 2.9

Pretratamientos más usuales.

Físicos		Químicos	
Mecánicos	No mecánicos		
Atricción	Irradiación	<u>Alcalinos</u> NaOH, NH ₃	<u>Disolventes</u> H ₂ SO ₄ FeTNa
Desfibración	Descompresión súbita	<u>Acidos</u> H ₂ SO ₄	cadoxen zincoxen alcohol-
Molienda		<u>Oxidantes</u> H ₂ O ₂ , O ₃ , O ₂ , ácido peracético	catalizador

tras que los pretratamientos químicos son capaces de ensanchar (efecto "swelling") los capilares de las paredes celulares, incrementando aún más el área superficial, Gilbert y Tsao (1983); en cualquier caso, la bondad de cada pretratamiento viene dada por la facilidad de la hidrólisis posterior y en base a ello se determinan experimentalmente los valores más adecuados de las variables de operación: temperatura, concentración de reactivos, tiempo de pretratamiento, etc.

2.2.1. Pretratamientos físicos

2.2.1.1. Pretratamientos mecánicos

Los pretratamientos de carácter físico se suelen dividir en mecánicos y no mecánicos (tabla 2.9). En los primeros se utilizan fuerzas de impacto y cizalladura que conducen a materiales de baja cristalinidad, mayor superficie específica y mayor densidad aparente, lo que abarata su posible transporte, facilita la hidrólisis y disminuye el volumen del reactor. Entre estos pretratamientos cabe mencionar diferentes tipos de molienda (generalmente con molinos de bolas y rodillos), compresión y atricción, Neilson y col. (1982), Ryu y col. (1982) y Tassinari y col. (1982). Según éste último, cuando el algodón se somete a una compresión mediante rodillos de alta presión, su susceptibilidad enzimática aumenta hasta 8 veces y el grado de hidrólisis es tanto mayor cuantas más veces se somete al sustrato a este pretratamiento y más alta es la presión.

La trituración en molinos de bolas puede deslaminar, romper y exponer las partículas de celulosa al sistema enzimático, aumentando, por tanto, la extensión de la hidrólisis; sin embargo, la eficacia de la sacarificación es mucho mayor cuando la trituración y/o atricción del sustrato se realizan simultáneamente a la hidrólisis enzimática. La continua formación de nuevos puntos reactivos durante la hidrólisis enzimática contribuye a aumentar los procesos de sacarificación, obteniéndose velocidades de hidrólisis que casi duplican a las obtenidas cuando se hace una trituración en seco seguida de una hidrólisis enzimática, Neilson y col. (1982). Sin embargo, este tratamiento tiene el inconveniente de dar un alto grado de desnaturalización de la enzima, decreciendo la actividad enzimática a medida que aumenta la intensidad de la atricción.

También la trituración de los materiales celulósicos a partículas de tamaño muy pequeño eleva su susceptibilidad al ataque enzimático y/o microbiológico; por ejemplo algunas bacterias termofílicas son capaces de utilizar un 75% de los hidratos de carbono contenidos en una madera de abedul y el 53% de los contenidos en una madera de pino cuando estas se encuentran finamente divididas, Millett y col. (1976). La efectividad del tratamiento en molino de bolas parece ser mayor cuando se utiliza un molino de bolas vibratorio; con este tratamiento se eliminó prácticamente la cristalinidad en 30 minutos y se consiguió la completa digestión de la celulosa contenida en una madera de álamo (Forziati y col. (1950); sin embargo, sólo fue posible hidrolizar un 10% de esta misma madera sin pretratar, Pew y Weyna (1962).

Estos pretratamientos tienen los inconvenientes de su alto consumo de energía y de su baja efectividad con respecto a los pretratamientos químicos.

2.2.1.2. Descompresión súbita

Los pretratamientos físicos de carácter no mecánico (tabla 2.9) someten al residuo lignocelulósico a agentes externos que provocan la descomposición y solubilización de una fracción de lignina, celulosa y hemicelulosa. Entre estos se encuentran los tratamientos con radiaciones y la utilización de vapor a altas presiones y pequeños tiempos de residencia, seguido de una descompresión súbita que rompe la estructura del material craqueando lignina, celulosa y hemicelulosa.

La explosión con vapor (steam explosion) se realiza sometiendo a la madera, previamente troceada, a altas temperaturas ($> 200^{\circ}\text{C}$) y presiones; tras mantener unos instantes estas condiciones se provoca una descom-

presión súbita. Las condiciones de presión y temperatura utilizadas en cada caso son variables y dependen del tipo de sustrato y del equipo disponible. En el proceso Iotech, Vallander y Erikson (1985), el material se calienta rápidamente hasta 243-349°C con vapor de alta presión (40 atm) y se mantiene tan sólo un minuto en estas condiciones antes de realizar la descompresión súbita. La efectividad de la hidrólisis posterior es tanto mayor cuanto más altas son la presión y la temperatura, Saddler y col. (1982). Buchholz y col. (1980/81) utilizan vapor saturado a 180-220°C por lo que la efectividad ha de aumentarse incrementando el tiempo de residencia (15 min - 2 h).

Este pretratamiento se utiliza en determinados procesos comerciales (Iotech y Masonite Co.), Vallander y Erikson (1985), para aumentar la digestibilidad de residuos lignocelulósicos que se destinan a piensos para rumiantes. Según estos autores su efectividad es mayor que la de algunos pretratamientos de tipo mecánico, como la desfibración y de tipo químico, como la oxidación y "swelling" con H_2O_2 en medio alcalino.

No obstante, durante este tratamiento tanto la lignina como la celulosa se pueden degradar a productos solubles que inhiben la actividad enzimática, Tanahashi y col. (1982). Así Saddler y col. (1982) encontraron que tras someter a una madera de álamo a 250°C y 40 atm durante 20 s, el contenido en lignina descendió desde el 24,4% hasta el 13,4% después de una extracción con agua y álcali, y hasta un 6% cuando la extracción se realizó con $NaClO_2$ del 10%; por otra parte, el contenido en hemicelulosa descendió desde el 18,1% hasta el 3,6% y 3,9%, respectivamente, en las mismas condiciones experimentales.

Por otra parte, Saddler y col. (1982) han puesto



de manifiesto que hay poca o ninguna pérdida de cristalinidad tras la explosión con vapor, lo cual pone de manifiesto que este factor no es tan determinante de la extensión de la hidrólisis como indican un buen número de autores, Tsao y col. (1978) y Millett y col. (1976).

Así pues, parece evidente la gran eficacia de este pretratamiento, muy superior a los pretratamientos físicos y semejante a los de tipo químico. Además presenta la ventaja de ser energéticamente favorable frente a los pretratamientos mecánicos (que consumen mucha energía) y no origina los problemas de tipo ambiental y de corrosión que se presentan con los pretratamientos químicos, Buchholz y col. (1980/81). No obstante, este tratamiento ha de ser seguido de una extracción y lavado para eliminar parte de los productos liberados de la lignina y hemicelulosa que han sido craqueados y que inhibirían la acción enzimática posterior.

2.2.1.3. Irradiación

La irradiación de los residuos lignocelulósicos se hace usualmente con rayos γ procedentes de distintas fuentes (^{60}Co , ^{137}Cs) y con electrones, Kamakura y Kaetsu (1982) y Han y col. (1981). Estas radiaciones afectan a los enlaces β -1,4-glucosídicos que unen las unidades de anhidroglucosa de las moléculas de celulosa, por lo que disminuye notablemente el grado de polimerización, siendo esta disminución proporcional a las dosis de radiación. Las radiaciones también afectan al grado de polimerización de la lignina y de las hemicelulosas, así como a la estructura compacta que forman la celulosa y la lignina. Estos hechos indican que este tratamiento es útil, sobre todo, para residuos que contengan lignina, ya que relaja totalmente la estructura casi impenetrable de la celulosa-lignina nativas, permitiendo a las enzimas acceder a las moléculas de celulosa.

Kamakura y Kaetsu consiguieron reducciones del grado de polimerización de la celulosa de papel de filtro desde 1000 hasta 75, aproximadamente, con dosis de radiación de 10^8 rads. También Han y col. (1981) obtuvieron una alta degradación de los materiales lignocelulósicos contenidos en muestras de bagazo de caña de azúcar, papel de periódico, algodón y α -celulosa. La cantidad de sustrato disuelto depende directamente de las dosis de radiación; según Han y col. la descomposición y despolimerización de los hidratos de carbono ocurre usualmente a dosis entre 10^6 y 10^8 rads, siendo destruidos a dosis superiores.

Este tratamiento permite la total degradación de las hemicelulosas y de gran parte de la lignina, lo que permite extraer estos productos con disolventes adecuados y evitar así la presencia de pentosas y otros productos extraños en los hidrolizados finales.

Sin embargo, parece que el efecto de estos tratamientos sobre la cristalinidad no es demasiado intenso, por lo que a menudo se combinan con agentes de "swelling" que, por otra parte, permiten reducir las dosis de radiación necesarias para solubilizar los hidratos de carbono.

2.2.2. Pretratamientos químicos

2.2.2.1. Pretratamientos alcalinos

Los pretratamientos de carácter químico persiguen la deslignificación parcial del sustrato y la modificación de su estructura; por ello, los procesos clásicos de "pulping", proceso Kraft y sulfito, al estar diseñados para la deslignificación, pero respetando al máximo la estructura de la celulosa, no son los indicados en este caso.

Los pretratamientos químicos más usados son aquellos que utilizan disoluciones diluidas de NaOH y NH_4OH , Detroy y col. (1981 y 1983), Ben-Ghedalia y Miron (1981), Mishra y col. (1984) y Mandels y col. (1974); mediante ellos se consigue aumentar el área superficial debido a la separación de las fibras de celulosa por el esponjamiento ("swelling") que provocan.

Como ya se ha comentado, los pretratamientos alcalinos se utilizan ampliamente para aumentar la digestibilidad de determinados residuos y hacerlos así más aptos para el consumo animal. Esta técnica está muy extendida debido a su bajo coste y a sus aceptables resultados. Además, si se emplea NH_3 (gas o en disolución) se aumenta la digestibilidad de los residuos a la vez que se eleva su contenido en nitrógeno, aunque la efectividad de esta base es inferior a la del NaOH, Millett y col. (1976).

La eficacia de un tratamiento con NaOH a temperatura ambiente, con vistas a una hidrólisis enzimática posterior, parece ser inferior a la de pretratamientos mecánicos como la trituración en molino de bolas, Mandels y col. (1974), por lo que su aplicación es necesario realizarla en caliente (a temperaturas superiores a

100°C) a alta presión, en autoclave, seguida de una descompresión súbita de la mezcla álcali-sustrato. Así, al variar las condiciones experimentales desde temperatura ambiente y presión atmosférica hasta 129°C y 2,75 atm (con NaOH del 1% en peso) se obtiene un incremento de la deslignificación de la paja de trigo desde el 8,6% hasta el 43,5%; paralelamente también crece la efectividad de la hidrólisis enzimática desde una concentración de azúcares de 9,1 g/l hasta 20,5 g/l, frente a 2,1 g/l que fueron obtenidos al hidrolizar el sustrato no tratado, Fan y col. (1981). Sin embargo, la cocción con disolución de NaOH a ebullición y presión atmosférica da lugar a pérdidas ligeras de hemicelulosa y lignina, afectando también al contenido en celulosa. Camacho y col. (1987) han obtenido reducciones entre el 5% y el 15% del contenido de hemicelulosa de una paja de trigo cuando se trató con NaOH 2 M durante 2 h, y pérdidas de lignina entre el 3% y el 5% en las mismas condiciones.

Estos resultados, así como el bajo costo de estos tratamientos hacen que el pretratamiento alcalino con NaOH diluido sea el más utilizado a gran escala.

2.2.2.2. Pretratamientos ácidos

Estos pretratamientos se realizan fundamentalmente con H_2SO_4 , cuya acción sobre los residuos celulósicos se hace más energética a medida que aumentan la concentración y la temperatura.

El tratamiento con H_2SO_4 diluido a alta temperatura ($\geq 90^\circ C$), elimina la mayor parte de las hemicelulosas contenidas en un sustrato, a la vez que ejerce cierta modificación sobre toda la estructura lignina-celulosa, incrementando la accesibilidad enzimática, Detroy y col. (1981), Ben-Ghedalia y Miron (1981) y Tsao y col. (1978). Así, la hidrólisis enzimática de una paja de

trigo tratada con H_2SO_4 del 4,4% a $98^\circ C$, durante 1 h, se incrementa más de 4 veces, Fan y col. (1981).

A medida que se aumenta la concentración de ácido se incrementa el efecto "swelling" sobre la celulosa contenida en el residuo. Este efecto es el predominante hasta concentraciones del 55% aproximadamente (a baja temperatura), mientras que a concentraciones superiores (hasta el 75%) el H_2SO_4 puede actuar rompiendo los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de celulosa e incluso, si el tratamiento es más enérgico (mayor temperatura y mayores tiempos de tratamiento), puede catalizar la hidrólisis de los enlaces $\beta(1-4)$ de la celulosa. Ambos procesos conducen a una solubilización de la fracción celulósica; las cadenas disueltas de mayor grado de polimerización pueden ser reprecipitadas diluyendo el ácido o añadiendo metanol, obteniéndose una celulosa prácticamente amorfa de gran superficie específica y, por tanto, fácilmente hidrolizable. Este procedimiento puede incluso utilizarse para separar la celulosa y la lignina contenidas en un residuo, ya que ésta quedaría en su mayor parte como residuo sólido, Tsao y col. (1978).

El pretratamiento con H_2SO_4 concentrado a temperatura moderada tiene el inconveniente de degradar una fracción de la celulosa disuelta, por lo que no toda ella puede reprecipitarse posteriormente; según Tsao y col. (1978) con H_2SO_4 del 70% no se recupera un 8% de la celulosa inicial; esta fracción queda en disolución como azúcares reductores y productos de degradación de estos. Sin embargo, la hidrólisis enzimática posterior de la celulosa reprecipitada es más sencilla; así por ejemplo, si el pretratamiento se hace con H_2SO_4 del 70% se hidroliza hasta un 70% de la celulosa inicial en tan sólo una hora, mientras que si el pretratamiento se hace con H_2SO_4 del 50% se hidroliza sólo el 50% de la

misma, Tsao y col. (1978).

2.2.2.3. Pretratamientos oxidantes

Estos pretratamientos se fundamentan en la oxidación de la lignina y su posterior solubilización; los agentes oxidantes más utilizados son oxígeno o aire, McGinnis y col. (1983), Ryu y col. (1982) y McGinnis y col. (1983), ozono, Ben-Ghedalia y Miron (1981), Neely (1984) y Tock y col. (1982), y H_2O_2 en medio alcalino, Gould (1984) y Wey y Cheng (1985).

El pretratamiento con O_3 sólo se utiliza a escala de laboratorio y planta piloto debido a que el O_3 es caro y es necesario producirlo "in situ". No obstante, puede ser prometedor ya que no son necesarias altas temperaturas y presiones y, además, el O_3 es el único reactivo necesario. Por otra parte, este tratamiento ocasiona pocos residuos tóxicos o productos de degradación, por lo que incluso los pretratados pueden utilizarse para alimentación animal, Neely (1984).

El consumo de O_3 necesario para un buen grado de pretratamiento va desde un 4% a un 6% del peso seco de la biomasa. También parece ser importante el contenido en humedad del sustrato, que debe estar entre un 25% y un 35% en peso; una humedad excesivamente alta o baja da lugar a una velocidad de reacción pequeña, y esta es la razón según Neely, de que algunos autores obtengan un incremento relativamente pequeño de la susceptibilidad enzimática.

La deslignificación por este proceso puede llegar a ser del 60% según Binder y col. (1980), que encontraron un incremento de la susceptibilidad enzimática de 5 veces con respecto al sustrato no tratado.

Como se sabe, el tratamiento con H_2O_2 se utiliza ampliamente en la fabricación de papel como método de blanqueo; sin embargo, en ausencia de los estabilizantes que se usan en estos procesos, el H_2O_2 reacciona rápidamente con la lignina dando productos de degradación de bajo peso molecular; pero también parece haber algún ataque sobre unidades de glucosa de las cadenas de celulosa. Según Gould (1985) el porcentaje de glucosa modificada es pequeño (menos del 5%); pero estos pequeños ataques a las moléculas de celulosa podrían ser suficientes para romper enlaces de hidrógeno entre las cadenas y dar lugar así a una estructura abierta con una menor cristalinidad.

Gould (1984) ha realizado el pretratamiento de paja de arroz y residuos de maíz con H_2O_2 ; obtuvo la disolución de, aproximadamente, el 50% de la lignina y de casi toda la hemicelulosa presente, siendo posible la recirculación del sobrenadante hasta 6 veces después de cada pretratamiento. Esto permite obtener disoluciones concentradas en xilosa y productos de degradación de la lignina, casi libres de glucosa, que pueden ser fermentadas a etanol con las levaduras adecuadas. La caracterización de los productos de degradación de la lignina reveló una alta proporción de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, que son menos tóxicos que los ácidos fenólicos (característicos de la degradación de la lignina) y permiten la fermentabilidad de los hidrolizados de xilosa. La hidrólisis de la fracción insoluble con Trichoderma reesei, después del pretratamiento, dio glucosa con casi el 100% de eficiencia.

Parece que no todos los sustratos son igualmente susceptibles al pretratamiento alcalino con H_2O_2 ; así, los residuos de maíz y paja de arroz son más adecuados que las maderas duras. No obstante, en todos los casos

queda sin solubilizar un 40-45% de la lignina, aunque sufre algún grado de modificación química. Wei y Cheng (1985) llegaron a obtener una deslignificación del 60% cuando utilizaron H_2O_2 del 1% en peso, a $32^\circ C$, durante 5 h, en NaOH del 1% y puede llegar a un 80% si se usa NaOH del 5%.

Otro buen agente oxidante, aunque menos utilizado que el H_2O_2 , es el hipoclorito sódico. Este reactivo reacciona a temperaturas próximas a la ambiente con la lignina formando compuestos solubles en agua, pero a altas temperaturas y tiempos de contacto prolongados también reacciona con la celulosa. Fan y col. (1981) han utilizado disoluciones del 4% y del 6% de NaClO para tratar paja de trigo tanto a temperatura ambiente como en autoclave; en estas condiciones se obtuvieron incrementos en la extensión de la hidrólisis de 12 y 13 veces, respectivamente, con respecto al sustrato no tratado; la deslignificación fue del 40,9% a temperatura ambiente y del 16,6% a $129^\circ C$ (debido a las importantes pérdidas de hidratos de carbono a esta temperatura).

Finalmente, experimentos realizados con ácido peracético (mezcla de anhídrido acético y H_2O_2 del 35% en la proporción 1/1 en volumen) indican que se incrementa la velocidad de la hidrólisis enzimática de la paja de trigo hasta 10 veces con respecto al sustrato no tratado. Este incremento del grado de hidrólisis parece deberse al alto grado de deslignificación que se obtiene con este agente (76,2% a $100^\circ C$ y durante 30 min), así como a la total modificación estructural de la celulosa, Fan y col. (1981).

2.2.2.4. Disolventes de la celulosa

Un enfoque distinto del problema consiste en la separación de los tres componentes fundamentales de los

residuos lignocelulósicos (hemicelulosa, celulosa y lignina) utilizando disolventes específicos para cada uno de ellos.

En la figura 2.5 se esquematiza un procedimiento mediante el cual se separan hemicelulosa y celulosa mediante un disolvente específico de cada una de ellas, quedando la lignina como residuo sólido. El disolvente para la hemicelulosa (A) puede ser un álcali o un ácido diluido y en caliente, Kouklos y Valkanas (1982) y Tsao y col. (1978); los disolventes más usuales de la celulosa son H_2SO_4 del 70% y distintas disoluciones, generalmente alcalinas, de determinados cationes de metales de transición, que, por un lado, provocan un efecto "swelling" sobre las cadenas de celulosa y, por otro, un efecto individualizador de estas cadenas al romper los enlaces de hidrógeno entre ellas. En la tabla 2.10 se muestran los disolventes de este tipo más utilizados.

El mecanismo de actuación de los complejos de metales de transición incluye la formación de quelatos con los grupos hidroxilo C_2 y C_3 de las unidades de glucosa anhidra de la celulosa. Esta formación de quelatos da lugar a la rotura de los puentes de hidrógeno entre las moléculas de celulosa pasando estas a disolución. Estos disolventes se designan con el nombre genérico de CMCS (chelating metal caustic swelling); los ligandos que se utilizan pueden ser monodentados, como el amonio, o bidentados, como la etilendiamina y el tartrato; la efectividad de estos disolventes aumenta cuando se preparan en disoluciones de álcali concentrado (1M-2M) debido, posiblemente, a que el efecto "swelling" acrecenta el acceso del ión metálico hasta las fibras de celulosa. Una y otra acción contribuyen a romper de forma prácticamente total la estructura cristalina de la celulosa, Hamilton y col. (1984).

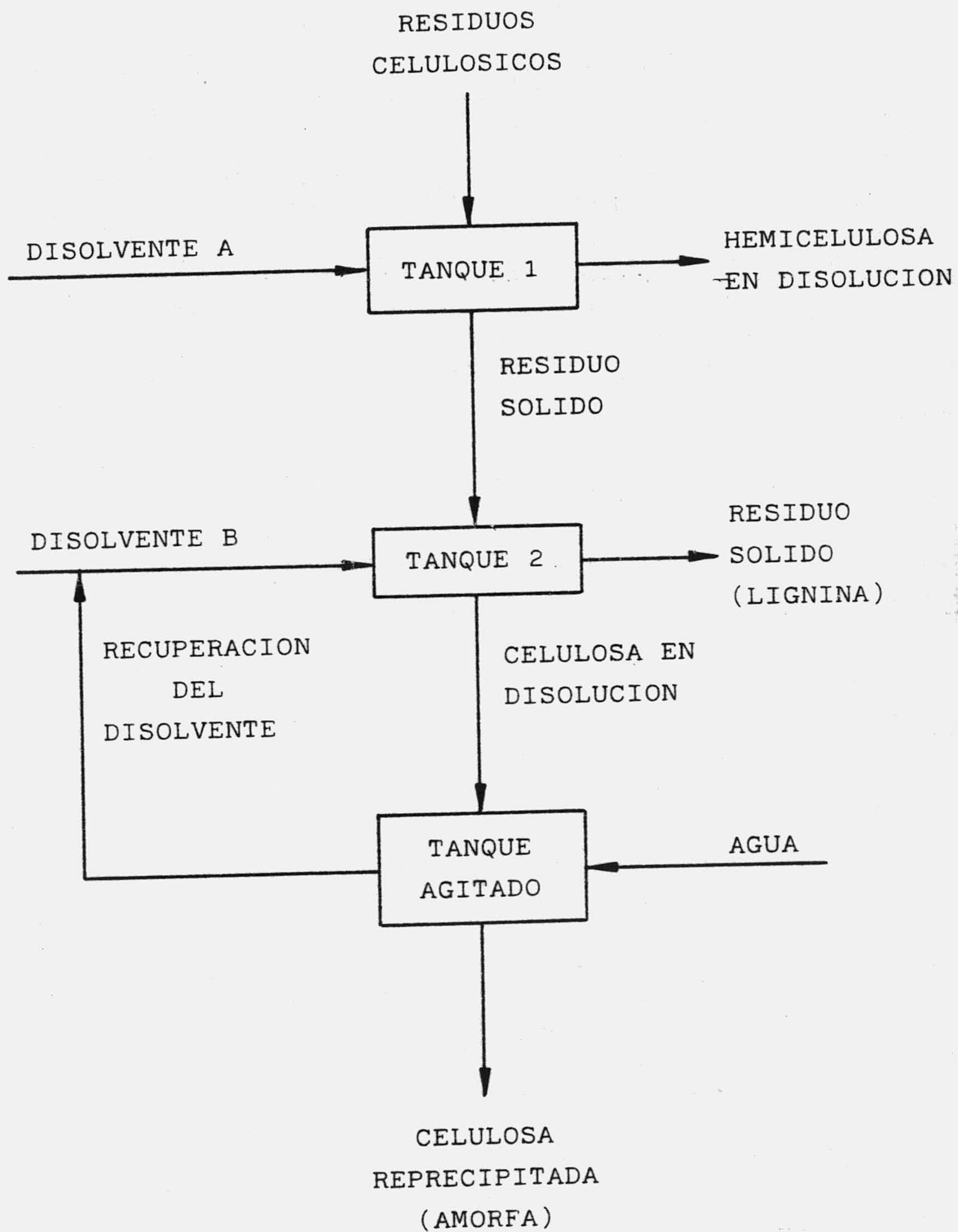


Figura 2.5.- Extracción selectiva de hemicelulosa y celulosa con disolventes.

Tabla 2.10

Disolventes de la celulosa formados por complejos de metales de transición, Hamilton y col. (1984).

Nombre común	Ion metálico	Ligando
Cadoxen	Cd^{2+}	Etilendiamina, En $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$
Cuen	Cu^{2+}	En
Zincoxen	Zn^{2+}	En
Nioxan	Ni^{2+}	NH_3
Cuoxan	Cu^{2+}	NH_3
FeTNa	Fe^{3+}	Acido tartárico $\text{COOH-CHOH-CHOH-COOH}$

Estos autores han realizado las separaciones esquematizadas en la figura 2.5 utilizando como disolvente A, H_2SO_4 del 5% a $90^\circ C$, durante 4 h, con una relación ácido/sustrato de 16/1 en peso. El hidrolizado resultante consistió fundamentalmente en xilosa (el 85% del total) con pequeñas cantidades de arabinosa, ácido urónico y glucosa. El análisis posterior del residuo sólido mostró que prácticamente todas las hemicelulosas fueron hidrolizadas a azúcares solubles. Este residuo, después de lavado, fue tratado con FeTNa a temperatura ambiente y a unos niveles entre 4/1 y 12/1 ml de disolvente/g de sustrato. Una vez disuelta la celulosa se reprecipitaba añadiendo agua. La hidrólisis posterior con celulasas de T. reesei dio conversiones del 90% a las 24 h que fueron 2 ó 3 veces más altas que la obtenida con sustrato sin pretratar.

Tsao y col. (1978) han utilizado cadoxen como agente de "swelling" y disolvente de la celulosa; este agente puede llegar a disolver hasta un 10% de su peso en celulosa y forma disoluciones estables a temperatura ambiente. El rendimiento en glucosa por hidrólisis enzimática se incrementó 6 veces, al cabo de 10 h, con respecto al sustrato sin pretratar.

Una limitación importante para el empleo de estos disolventes es la posible toxicidad de los cationes para enzimas y levaduras, por lo que, o bien se eligen cationes no tóxicos, o bien se ha de lavar perfectamente el sustrato una vez reprecipitado. Además, la utilización de estos disolventes sólo es posible, desde un punto de vista económico, si su recuperación es prácticamente total; esta recuperación ha de hacerse retirando los reactivos utilizados en la reprecipitación y lavado, por ejemplo mediante una evaporación parcial a vacío, Tsao y col. (1978).

También el H_2SO_4 concentrado, como ya se ha comentado al hablar de pretratamientos ácidos, puede utilizarse a baja temperatura como disolvente de la celulosa. Este ácido concentrado no sólo ejerce un efecto individualizador de las cadenas de celulosa, sino también un efecto hidrolítico haciendo descender drásticamente el grado medio de polimerización.

Como disolventes específicos de la lignina se han ensayado determinadas mezclas alcohol-catalizador que dejan inalteradas la celulosa y hemicelulosa. El catalizador parece actuar sobre los enlaces lignina-lignina y lignina-hidratos de carbono y el disolvente crea un medio orgánico en el cual se disuelve la lignina. Los disolventes orgánicos empleados son etanol, butanol, glicerol, dioxano, etilenglicol, trietilenglicol y fenol; como catalizadores se han empleado H_2SO_4 , NaOH, antraquinona, $FeCl_3$, NH_3 , $NH_4H_2PO_4$, Na_2CO_3 y $AlCl_3$. Las temperaturas utilizadas oscilan entre $160^\circ C$ y $190^\circ C$ y los tiempos de pretratamiento son del orden de 0,5 a 2 h. Los mejores resultados, en lo que respecta a la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática, se obtuvieron con el sistema NaOH-etanol, debido posiblemente al efecto "swelling" del NaOH, ya que una etapa de deslignificación solamente con NH_3 -etanol tuvo poco o ningún efecto sobre la hidrólisis enzimática, siendo necesario posteriormente un tratamiento con NaOH, Holtzapfle y Humphrey (1984).

Fan y col. (1981) han utilizado el sistema butanol-agua- $AlCl_3$ para tratar paja de trigo a $175^\circ C$, durante 1,5 h. Este tratamiento dio sólo un ligero aumento de la velocidad de hidrólisis y también una deslignificación baja. Sin embargo, el etilenglicol parece ser un buen disolvente para modificar la estructura de la paja de trigo y para retirar una cantidad importante de lignina; su utilización conduce a que el rendimiento de

la hidrólisis enzimática se incrementa en más de 8 veces con respecto al sustrato no tratado.

2.2.3. Comparación entre pretratamientos

Resulta extremadamente difícil hacer una comparación exhaustiva entre todos los pretratamientos que aparecen en bibliografía, dada la heterogeneidad de sustratos y condiciones experimentales utilizadas.

En general, la efectividad de los pretratamientos físicos es inferior a la de los químicos, con la posible excepción de la descompresión súbita con vapor a alta presión y temperatura, cuya eficacia puede compararse a la de los pretratamientos químicos.

Un caso aparte parecen ser los tratamientos por radiación que son escasamente utilizados debido a los especiales requerimientos de equipo que son necesarios y a los posibles efectos secundarios de las radiaciones.

Como se ha puesto de manifiesto, la mayoría de los pretratamientos tratan de incidir en la deslignificación de los sustratos, por ser la lignina el principal inconveniente que se opone al acceso de enzimas y microorganismos hasta las cadenas de celulosa; por otra parte, la deslignificación también lleva consigo una degradación apreciable de la estructura lignina-celulosa, lo que supone un incremento del área superficial de la celulosa. Prácticamente la totalidad de los pretratamientos químicos inciden pues en la deslignificación o separación de los componentes fundamentales de los residuos, mientras que los pretratamientos físicos tan sólo persiguen la rotura de la estructura íntima del residuo y/o la reducción del tamaño de partícula.

Desde un punto de vista económico también es preciso tener en cuenta el alto consumo de energía de los pretratamientos físicos. Los pretratamientos químicos tienen la desventaja de necesitar equipos de espe-

cial resistencia a la corrosión, lavados y producción de residuos químicos contaminantes. Los pretratamientos físicos son más limpios, aunque si se desean obtener hidrolizados de glucosa libres de sustancias extrañas es preciso realizar una extracción química de hemicelulosas y lignina.

De cualquier forma los pretratamientos que parecen imponerse, por su simplicidad y bajo coste, son los alcalinos con NaOH diluido a altas temperaturas. Estos se realizan a sustratos que previamente se han sometido a una reducción del tamaño de partícula mediante algún pretratamiento mecánico de bajo consumo energético.

Aún están por desarrollarse los pretratamientos con disolventes, cuyo interés actual es solamente analítico, ya que se trata de pretratamientos limpios que dan una celulosa altamente accesible a la hidrólisis enzimática. No obstante, como ya se ha comentado, es necesaria la recuperación total del disolvente tras cada pretratamiento para hacerlos viables económicamente.

También parecen tener futuro los pretratamientos con H_2SO_4 ya que mediante este ácido es posible llevar a cabo un proceso en etapas: disolución de las hemicelulosas, separación de la celulosa y lignina por disolución de la primera e hidrólisis ácida. Este proceso y cada una de sus etapas ya han sido objeto de alguna atención y más adelante incidiremos en él.

2.3. CELULASAS

Una vez realizados los pretratamientos adecuados, el paso siguiente, tanto para producir etanol como SCP, es hidrolizar la celulosa a formas que sean más fácilmente aprovechables por los microorganismos; esta hidrólisis puede ser enzimática o ácida.

La hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos parece ser, a medio plazo, el camino más prometedor; ésta se lleva a cabo poniendo el sustrato en contacto con las celulasas en un medio acuoso. Las celulasas constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces β -1,4-glucosídicos que unen las unidades de anhidroglucosa en las moléculas de celulosa. Pueden proceder de distintos microorganismos celulolíticos (T. viride y T. reesei entre otros) y están formadas fundamentalmente por tres grupos de enzimas:

endo- β -1,4-glucanasa	EC. 3.2.1.4.
exo- β -1,4-glucanasa	EC. 3.2.1.91.
β -1,4-glucosidasa	EC. 3.2.1.21.

En general las celulasas son ricas en aminoácidos de tipo ácido (aspártico y glutámico) y en aminoácidos polares (serina, glicina y tionina), mientras que los aminoácidos básicos y con azufre se encuentran en pequeñas cantidades. Así, la exoglucanasa de T. viride contiene un 21% de aminoácidos ácidos, el 5,5% de básicos y el 6% de cistina por molécula, Berghem y Petterson (1975). En la tabla 2.11 se indican algunas características de estas enzimas.

Tabla 2.11

Algunas propiedades de las celulasas de Trichoderma viride.

Componente	Pesos moleculares estimados	pI (1)	Contenido en hidratos de carbono (%)
β -1,4-glucosidasa	76000		
	47000	5,74	0
Exoglucanasas	46000		3,3
	41800	3,79	9,2
	48900		11,3
	53000		1,4
	53000		10,4
Endoglucanasas (bajo peso molecular)	18000		
	12500	4,60	21
Endoglucanasas (alto peso molecular)	58900		17
	62400		16
	60200		10
	50000	3,39	12
	37000		4,5

(1) pH al cual una molécula de proteína no tiene carga eléctrica neta.

2.3.1. Mecanismos de actuación de las celulasas

La purificación y caracterización de las diferentes enzimas que componen el complejo celulolítico ha permitido estudiar la acción de cada una de ellas sobre la celulosa. En este sentido son de destacar los trabajos de Berghem y Petterson (1975) y Clarke y Stone (1965).

El mecanismo admitido usualmente es el siguiente:

- Las endoglucanasas, E_1 , forman complejos intermedios con las cadenas de celulosa y las hidrolizan al azar, dando lugar a cadenas de menor grado de polimerización y azúcares reductores solubles cuyo grado de polimerización (DP) es inferior a seis, $DP \leq 6$. En esta fracción soluble es frecuente encontrar celobiosa y glucosa.

- Las exoglucanasas, E_2 , se unen a los extremos no reductores de las cadenas de celulosa y oligosacáridos provenientes de ella, separando celobiosa.

- Finalmente se admite que la β -1,4-glucosidasa, E_3 , hidroliza en fase homogénea la celobiosa a glucosa. Por tanto si, como es usual, las celulasas son deficientes en esta enzima el producto final de la hidrólisis será mayoritariamente celobiosa.

Por otra parte, se ha comprobado que el mecanismo anterior se completa con un sinergismo entre E_1 y E_2 ; es decir, que la conversión obtenida por la actuación conjunta de E_1 y E_2 es mayor que la suma de las conversiones a que ambas enzimas conducen por separado. Este efecto sinérgico ha sido comentado, entre otros, por Wheatley y Moo-Young (1977) Wood y McCrae (1979) y ha sido ampliamente estudiado, en sus aspectos experimentales por Mandels (1982), Gilbert y Tsao (1983) y

Mandels y col. (1981).

El sinergismo entre E_1 y E_2 ha sido incorporado por diversos autores a sus modelos cinéticos, Wheatley y Moo-Young (1977), Okazaki y Moo-Young (1978) y Fujii y col. (1981). En este sentido Okazaki y Moo-Young (1978) han definido un parámetro para cuantificar el efecto sinérgico, DSE (degree of synergistic effect) por la relación entre los azúcares totales formados por la acción conjunta de ambas enzimas (E_1 y E_2) y la cantidad a que cada una de ellas conduce por separado. Según estos autores DSE parece depender de las concentraciones de E_1 y E_2 , de su relación (E_1/E_2), de la concentración de sustrato, de los productos de reacción que ejerzan una acción inhibitoria sobre E_1 y E_2 y del grado de polimerización.

La acción individual o conjunta de E_1 y E_2 y su correspondiente efecto sinérgico se ha intentado explicar por la necesidad de que E_1 y E_2 se adsorban en un mismo centro activo de la celulosa, Wood y McCrae (1979) y Mandels (1982), o en lugares muy próximos, Wood y McCrae (1972 y 1975), de forma que los extremos no reductores liberados por las endoglucanasas sean rápidamente ocupados por las exoglucanasas que evitan la recomposición del enlace β -1,4-glucosídico y en su acción liberan celobiosa. Este razonamiento, de difícil comprobación experimental, explica cualitativamente la actuación de E_1 y E_2 y su sinergismo.

2.3.2. Condiciones de operación: pH y temperatura

La estabilidad térmica y los valores óptimos de temperatura y pH, para una adecuada utilización de las celulasas, dependen del microorganismo celulolítico que la produce y en ocasiones del sustrato utilizado.

En general, la temperatura óptima de operación para las celulasas oscila entre 40°C y 60°C y fuera de estos márgenes se presentan disminuciones bruscas en la actividad celulolítica; así, las celulasas de A. terreus son estables hasta los 55°C, pero a 75°C presentan una actividad prácticamente nula, Garg y Neelakatan (1982). Lo mismo ocurre con las celulasas de T. viride a 78°C, ya que se desactivan en sólo 3 min a esta temperatura. Como ya se ha comentado, a veces la temperatura óptima también depende del tipo de sustrato; por ejemplo las celulasas de A. terreus presentan una actividad máxima a 60°C si el sustrato es CMC y a 50°C si es papel de filtro.

También los valores óptimos del pH parecen depender del tipo de sustrato, ya que, por ejemplo, las celulasas de A. terreus presentan una actividad máxima a pH = 4,5 con CMC y a 5,5 si el sustrato es papel de filtro, lo que parece indicar (como en los valores óptimos de la temperatura) que las endo y exoglucanasas tienen condiciones de operación diferentes. En general, el pH óptimo para las celulasas oscila alrededor de 5,0, Mandels (1982).

2.3.3. Microorganismos celulolíticos

Las celulasas más activas son aquellas que provienen del Trichoderma viride, Arrieta y col. (1982), Montenecourt y Eveleigh (1977) y Binder y Ghose (1978), T. reesei, Shirkot y col. (1982), Mishra y col. (1982), Allen y Mortensen (1981), Mandels y col. (1981) y Ghosh y col. (1982), T. lignorum, T. koningii, T. pseudokoningii y T. longibrakiatum, Mandels (1982).

El microorganismo más adecuado es el T. reesei, ya que es capaz de segregar celulasas de alta actividad y en cantidades apreciables. Este microorganismo crece rápidamente en cultivos sumergidos que incluyen NH_4OH como fuente de nitrógeno; las máximas velocidades de crecimiento sobre glucosa oscilan entre 0,12 y 0,24 g/g.h (pH = 4,0 y T = 35°C) y los rendimientos en celulasas entre 0,4 y 0,5 g/g de glucosa consumida, Ryu y col. (1979) y Sternberg y Dorval (1979). Usualmente la fuente de carbono influye sobre el rendimiento en celulasas; así, los cultivos de T. reesei sobre celulosa contienen de 5 a 6 veces más celulasas que los realizados sobre lactosa, ya que el sustrato ejerce un efecto inductor sobre la actividad celulolítica del microorganismo, Mandels y col. (1981).

Las celulasas de T. viride también son muy utilizadas, ya que su composición y actividad es análoga a la del T. reesei. En ambos casos existe represión por parte de la glucosa y de productos del metabolismo celular, así como por distintos catabolitos, Mandels (1982), Montenecourt y Eveleigh (1977) y Whitaker.

Las celulasas obtenidas de T. reesei y T. viride son relativamente equilibradas en cuanto a su composición, aunque suelen presentar deficiencias en β -1,4-glucosidasa, no son capaces de hidrolizar la lignina y

tienen, en comparación con otras hidrolasas, una baja actividad. Por todo ello, continúa la búsqueda de nuevas y mejores fuentes para la producción de celulasas.

En este sentido, las celulasas obtenidas de Aspergillus son ricas en endoglucanasas y β -1,4-glucosidasa, pero su contenido en exoglucanasas es escaso. Por ello se utilizan fundamentalmente para suplementar la actividad celobiasa de las obtenidas de T. viride y T. reesei, Sternberg y col. (1977). Otros microhongos como el Sporotrichum pulverulentum segregan, además de los componentes usuales de las celulasas, xilanasas, lactonas, glucosa-oxidasa, celobiosa-oxidasa, catalasas, etc y otras capaces de degradar la estructura de la lignina, Erikson (1978). Sin embargo, las cantidades producidas deben ser insignificantes ya que su utilización en procesos comerciales es prácticamente nula.

También se ha investigado la producción de celulasas a partir de Actinomicetes termofílicos como el Thermomonospora curvata, Thermomonospora sp, etc, Crawford y McCoy (1972), Meyer y Humphrey (1982); sin embargo los resultados no son excesivamente brillantes en cuanto que las celulasas producidas o son térmicamente inestables o deficientes en alguno de sus componentes fundamentales. No obstante, existe un interés creciente por el estudio y utilización de bacterias anaerobias celulolíticas y termoresistentes, fundamentalmente por el Clostridium thermocellum, Zertuche y Zall (1982), Herrero y Gómez (1980) y García Martínez y col. (1980) y el Thermoanaerobium brockii, Ben-Bassat y col. (1981) y Lamed y Zeikus (1980), debido a la posibilidad de utilizarlos en procesos de conversión de la celulosa a etanol mediante un sólo microorganismo (procesos MIT, GE/CRD y PEN/GE, ya comentados).

Después de estos breves comentarios se deduce

que el futuro de la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos depende en gran parte de que la Ingeniería Genética sea capaz de lograr microorganismos celolíticos capaces de producir celulasas activas y equilibradas en cuanto a su composición, de una manera económica.

2.4. HIDROLISIS ENZIMATICA

Dado que la celulosa es un sustrato insoluble, las etapas necesarias para su hidrólisis, como en cualquier reacción heterogénea, son:

- Transferencia de las moléculas de enzima desde el seno de la fase acuosa hasta la superficie de las partículas de celulosa.

- Formación del complejo enzima-sustrato (ES) por adsorción de las moléculas de enzima.

- Adsorción del agua sobre los centros activos del complejo ES y reacción superficial entre H_2O y la celulosa.

- Transferencia de los productos de reacción solubles (glucosa y celobiosa fundamentalmente) hasta el seno de la fase acuosa.

- Hidrólisis en fase homogénea de la celobiosa a glucosa por acción de la β -1,4-glucosidasa.

Por tanto, la descripción cuantitativa del proceso de solubilización es complicada, especialmente porque todas las enzimas actúan conjuntamente y existe un sinergismo entre E_1 y E_2 . La mayor parte de los autores consideran que todas estas etapas tienen lugar en serie, por lo que la hidrólisis estará controlada por la cinética de la etapa más lenta; esta etapa es, en todos los casos, la hidrólisis heterogénea que generalmente tiene lugar según un mecanismo de Michaelis-Menten.

En cualquier caso la cinética de la hidrólisis enzimática de la celulosa dependerá fundamentalmente de cuatro factores; a) la estructura íntima del sustrato,

b) la naturaleza del sistema enzimático, c) de las interacciones enzima-sustrato y d) del efecto inhibitor que pueda existir por parte de los productos, del sustrato o de las sustancias extrañas presentes en el medio.

Analizando una a una las etapas necesarias para que tenga lugar la hidrólisis, tenemos en primer lugar la transferencia de las moléculas de enzima hasta la superficie del sustrato, fenómeno que es prácticamente olvidado por la mayoría de los investigadores que estudian la cinética de la hidrólisis enzimática. Esta transferencia puede ser relativamente rápida cuando el sustrato presenta un área superficial grande y/o los tamaños de los poros son lo suficientemente grandes como para que las enzimas se adsorban sin dificultad en torno a los enlaces β -1,4-glucosídicos; sin embargo, el proceso puede ser lento cuando las enzimas no pueden llegar o lo hagan mediante difusión molecular hasta las moléculas de celulosa, por ser los poros pequeños o no ser el sustrato suficientemente poroso. En estos casos habría que incorporar la velocidad de transporte a la cinética enzimática propiamente dicha.

Una vez la enzima alcanza la molécula de celulosa ha de adsorberse en una posición adecuada para la formación de un complejo activo enzima-sustrato. Esta etapa, junto con la incorporación de una molécula de agua y la hidrólisis de la celobiosa a glucosa en fase homogénea, constituyen la reacción hidrolítica propiamente dicha, en la cual inciden todos los investigadores; sobre ellas se plantean prácticamente todos los modelos cinéticos para ajustar los resultados experimentales obtenidos.

Una vez la reacción heterogénea ha tenido lugar los productos formados han de transferirse desde la superficie del sustrato hasta el seno de la fase acuosa. Al igual que en el caso anterior, muy pocos inves-

tigadores han tenido en cuenta esta etapa para la formulación de sus modelos, aunque en este caso puede suponerse, con más fundamento, que tiene lugar a una velocidad relativamente alta debido al bajo peso molecular de los productos solubles obtenidos.

2.4.1. Modelos cinéticos

Los modelos cinéticos existentes en bibliografía pueden diferenciarse entre si según la forma de considerar la naturaleza del sustrato, de la enzima y la utilización o no dentro del modelo de la etapa de adsorción, así como las de transferencia de enzimas y productos. En la tabla 2.12 se muestra un resumen de las características de los diferentes modelos propuestos en bibliografía.

Se considera que el sustrato es simple cuando no se hace distinción entre las fracciones amorfa y cristalina de la celulosa nativa, las cuales se hidrolizan a muy diferente velocidad y pueden representar, respectivamente, un 15% y un 85% de la celulosa total; en cuanto a la enzima se dice que es simple si no se considera la actuación diferenciada de sus distintos componentes (E_1 , E_2 y E_3). Las interacciones enzima sustrato se han clasificado según que la cinética se represente tan sólo por una ecuación tipo Michaelis-Menten o se considere además una etapa previa de adsorción de la enzima y transporte de ésta y de los productos de reacción. También en la tabla 2.12 se hace mención de los autores que de alguna manera contemplan la existencia del sinergismo entre E_1 y E_2 en la formulación de su modelo. Por otra parte también se han propuesto algunos modelos empíricos que no se recogen en la tabla pero de los que se tratará más adelante.

Como ya se ha indicado, muy pocos autores han incluido en su formulación las etapas de transporte; en este sentido Suga y col. (1975) han planteado un modelo de difusión con reacción química para partículas de celulosa preparadas artificialmente. De cualquier forma, su aplicabilidad es escasa ya que depende, entre otros parámetros, de la distribución de tamaños para las

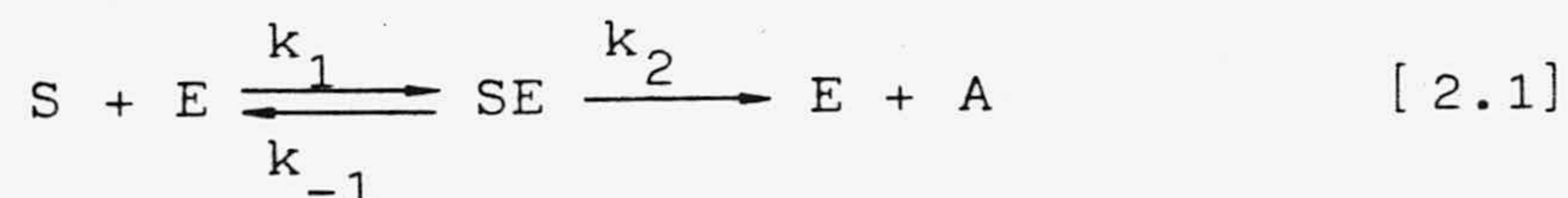
Tabla 2.12

Modelos cinéticos para la hidrólisis enzimática de celulosa.

Autores	Estructura del sustrato	Naturaleza de la enzima	Interacciones enzima-sustrato	Efecto sinérgico
Suga y col. (1975)	Simple	Simple	Transporte y Michaelis-Menten	-
Howell y Mangat (1978)	"	"	Michaelis-Menten	-
Mangat y Howell (1978)	"	"	"	-
Howell y Stuck (1975)	"	"	"	-
Lee y Fan (1982)	"	"	"	-
Suga y col. (1975)	"	Compleja	"	si
Lee y col. (1978)	"	"	"	"
Okazaki y Moo-Young (1978)	"	"	"	"
Beltrane y col. (1984)	"	"	"	"
Caminal y col. (1985)	"	"	"	-
Huang (1975)	"	Simple	Adsorción (M-M)	-
Holtzaple y col. (1984)	"	"	"	-
Holtzaple y col. (1984)	"	"	"	-
Ryu y col. (1982)	Compleja	"	"	-
Wald y col. (1984)	"	Compleja	"	-

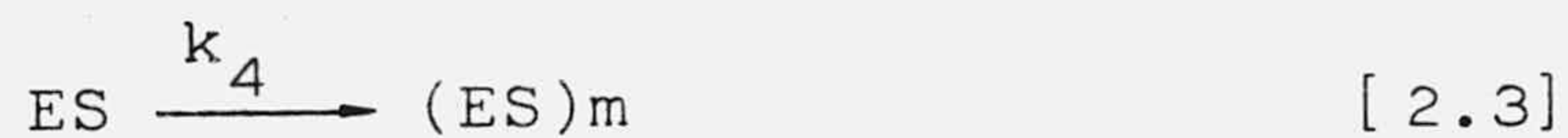
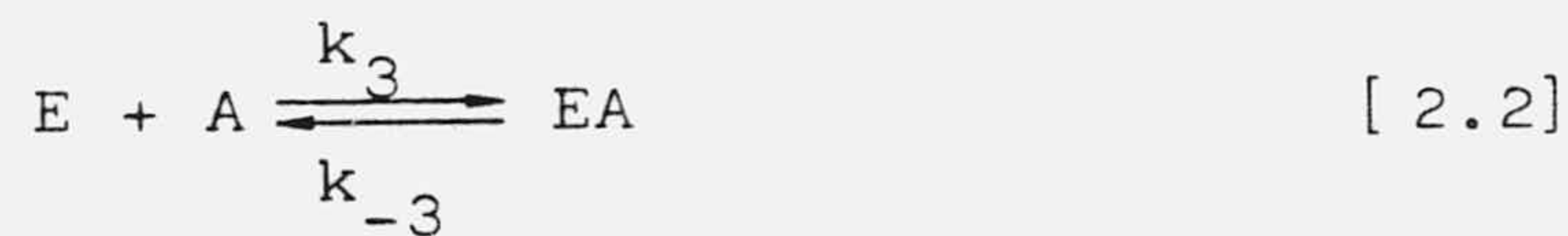
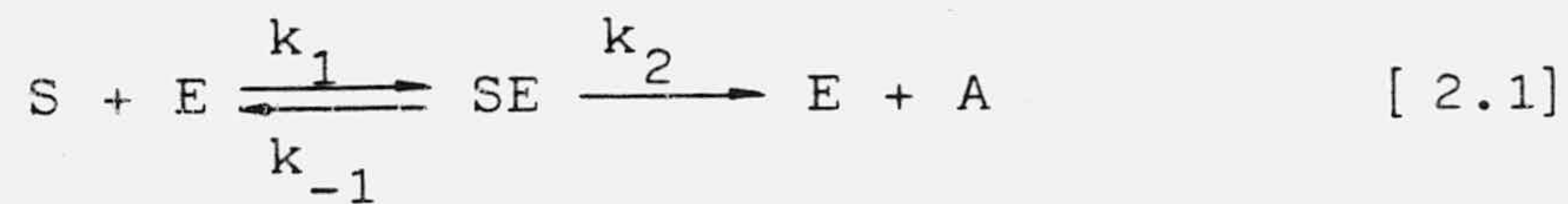
cadena intermedias producidas durante la hidrólisis, del tamaño de los poros, del peso molecular de las enzimas, etc.

Los modelos cinéticos más sencillos consideran una cinética enzimática simple con inhibición competitiva de producto; es decir, se admite que la reacción transcurre según el mecanismo



donde SE es un intermedio enzima-sustrato y EA es un complejo responsable de la inhibición de la enzima por parte del producto.

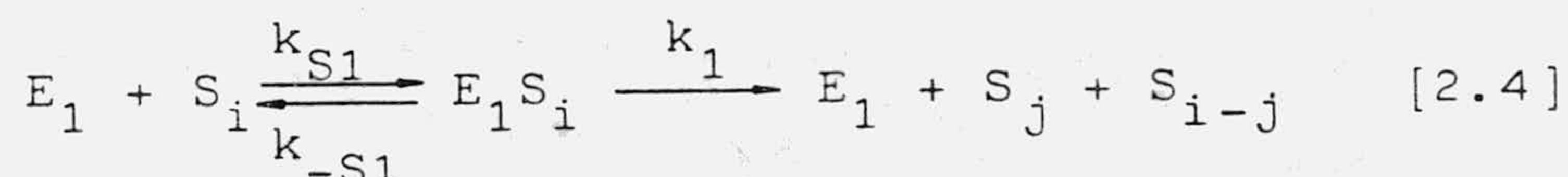
Así explican sus resultados Howell y Stuck (1975) y Howell y Mangat (1978). Las hipótesis simplificativas más importantes, además de las ya mencionadas (sustrato y enzima como sustancias únicas) son la existencia de una inhibición única por todos los productos de la reacción y que la etapa de adsorción de las celulasas tiene lugar con una velocidad alta por lo que no es controlante. En cierta forma estas limitaciones implican que se está tratando a un sistema heterogéneo como pseudohomogéneo y además se desprecia la acción de la β -1,4-glucosidasa. El modelo ajusta los resultados experimentales de Howell y Mangat (1978) hasta tiempos de hidrólisis de 12 h, es decir, a conversiones bajas (del orden del 60%). Para explicar las desviaciones encontradas a tiempos de reacción elevados, en los que el modelo representado por [2.1] y [2.2] conduce a resultados por exceso, proponen el mecanismo siguiente:

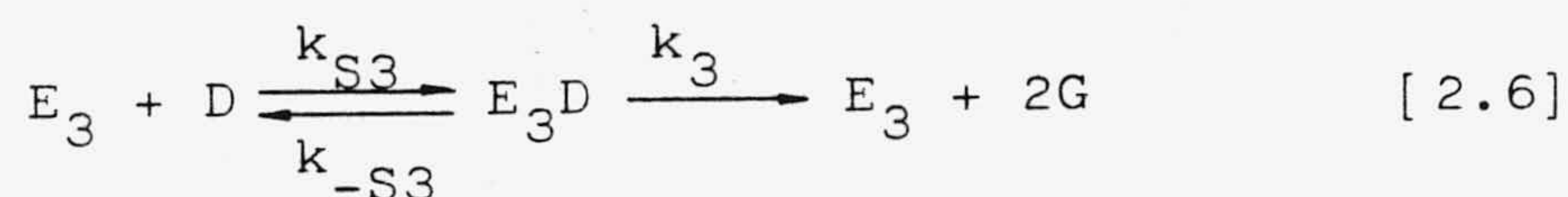
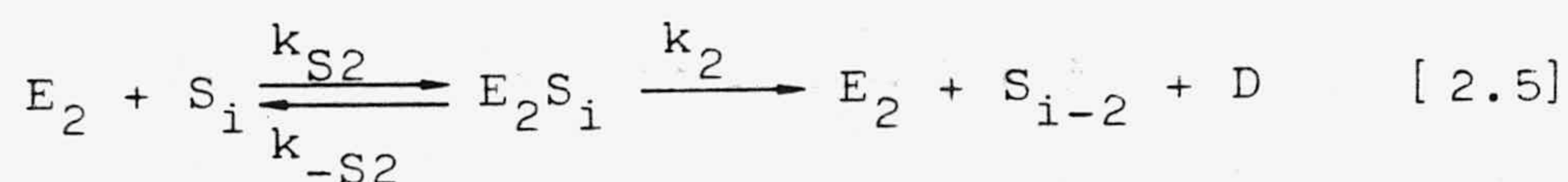


donde [2.3] representa la formación de un complejo muerto enzima-sustrato, lo que no deja de ser un artificio para justificar unos resultados a partir de una cinética excesivamente simple.

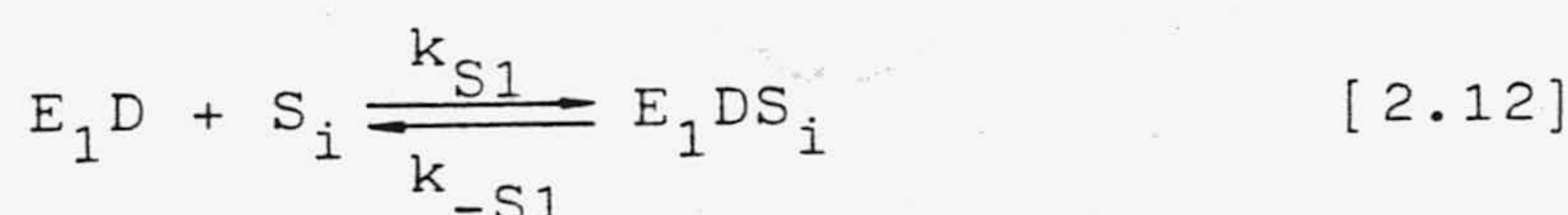
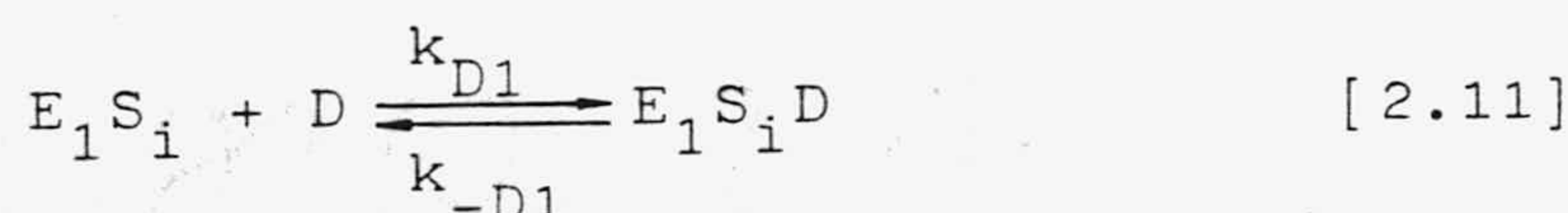
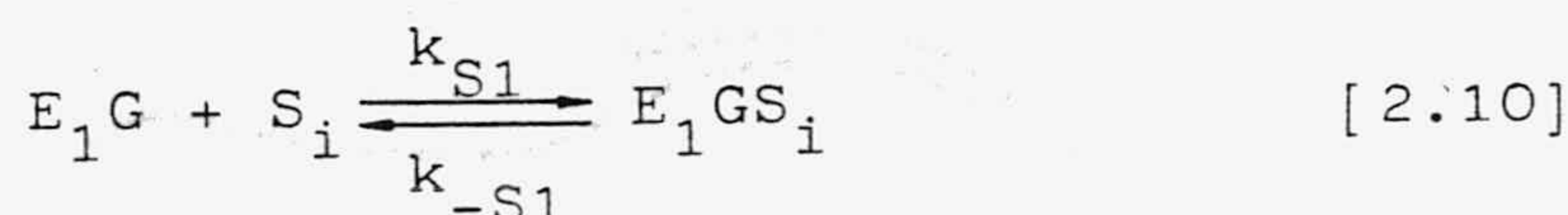
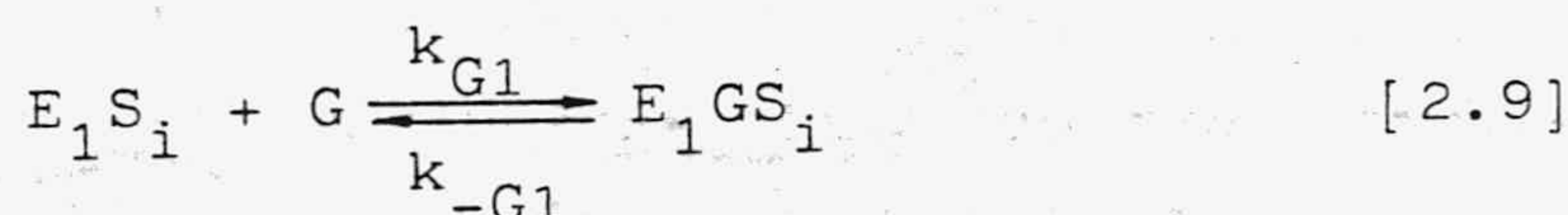
En general, el modelo mencionado ajusta, en sus dos vertientes, los resultados experimentales para aquellos sistemas enzimáticos deficientes en β -1,4-glicosidasa, ya que en estas condiciones el producto, A, estará formado casi exclusivamente por celobiosa y la reacción en fase homogénea es prácticamente inexistente.

Un segundo grupo de modelos consideran la actuación diferenciada de cada una de las enzimas. En cuanto al sustrato estiman que, independientemente de su naturaleza y estructura inicial (es decir, no suponen la existencia de celulosa cristalina y amorfa), se hidroliza a cadenas más cortas, a celobiosa y a glucosa, por la acción simultánea de E_1 , E_2 y E_3 . A este grupo pertenecen los modelos propuestos por Suga y col. (1975), Lee y col. (1978) y Okazaki y Moo-Young (1978). El esquema propuesto por estos últimos autores es el más completo de todos y recoge las sugerencias de Suga y col. y Lee y col.. El mecanismo para la formación de productos es





Además estas enzimas pueden estar inhibidas competitivamente o no competitivamente por los productos de reacción; así por ejemplo, para una inhibición no competitiva por productos de E_1 las ecuaciones [2.4] a [2.6] se completan con las siguientes:

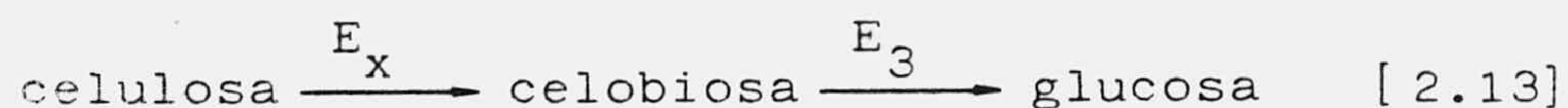


Análogas expresiones se obtendrían para E_2 y E_3 .

Este modelo, si bien supone una aproximación razonable y fundamentada a la hidrólisis enzimática de celulosa, es de difícil aplicación por la multitud de parámetros que sería necesario conocer a "priori" y las concentraciones intermedias a determinar. Por ello su utilización requiere simplificaciones notables; en este

sentido Beltrane y col. (1984) han aplicado con éxito una simplificación del modelo de Okazaki y Moo-Young (1978) a la hidrólisis enzimática de algodón pretratado utilizando celulasas de T. viride y β -1,4glucosidasa de A. niger. No obstante, la existencia de, al menos, doce parámetros hace que el modelo no sea excesivamente atractivo.

Una solución intermedia es la propuesta por Caminal y col. (1985). Estos autores han considerado que la hidrólisis tiene lugar según un proceso de dos reacciones en serie:



donde las endo y exoglucanasas (E_x) actúan sobre la celulosa liberando productos intermedios y celobiosa, sobre la cual actúa la β -1,4-glucosidasa (E_3) liberando glucosa. Estos autores ajustan sus datos experimentales a seis modelos cinéticos que se diferencian entre sí en la posibilidad de inhibición competitiva o no competitiva por productos y sustrato. De todos los modelos ensayados tan sólo dieron resultados adecuados los correspondientes a inhibición competitiva de producto para ambas reacciones e inhibición competitiva y no competitiva de producto para la primera y segunda reacción, respectivamente; en ambos casos se ha supuesto que la celobiosa inhibe a las endo y exoglucanasas y la glucosa a la β -1,4-glucosidasa. Las velocidades de formación de celobiosa y glucosa según el modelo con inhibición competitiva de producto en ambos casos vendrán dadas, respectivamente, por las expresiones

$$r_D = \frac{r_m C_S}{K_M \left(1 + \frac{C_D}{K_i} \right) + C_S} \quad [2.14]$$

$$r_G = \frac{r'_m C_D}{K'_M \left(1 + \frac{C_G}{K'_i} \right) + C_D} \quad [2.15]$$

Por otra parte, ningún modelo con inhibición de sustrato sobre la β -1,4-glucosidasa ajusta los resultados obtenidos por estos autores.

Otro grupo de modelos son los que junto a la cinética de la reacción hidrolítica consideran la adsorción de las enzimas sobre el sustrato, Huang (1975), Peitersen y col. (1977), Ryu y col. (1982) y Wald y col. (1984). En estos casos lo más frecuente es considerar que el equilibrio de adsorción se produce muy rápidamente y en la mayoría de los casos está dado por el modelo de adsorción de Langmuir

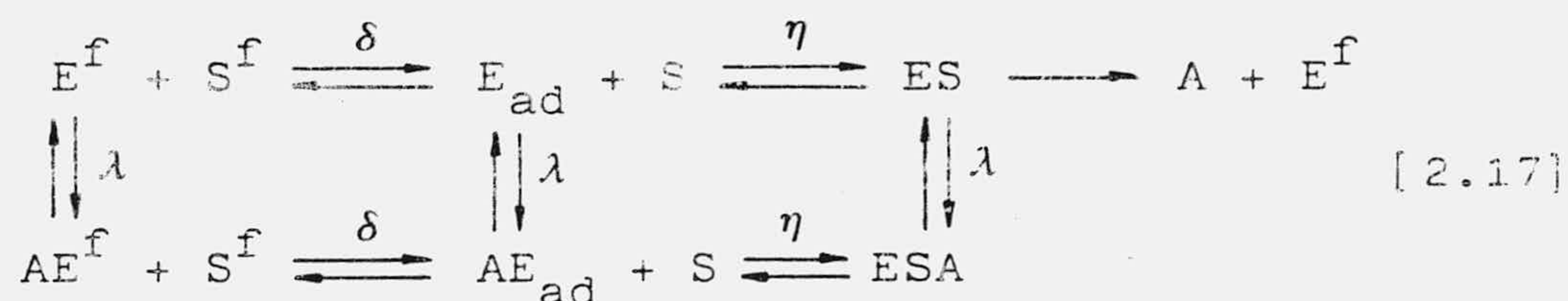
$$\frac{(ES)_{ad}}{(ES)_{sat}} = \frac{K E}{1 + K E} \quad [2.16]$$

donde $(ES)_{ad}$ es la enzima que está adsorbida sobre el sustrato en un instante dado y $(ES)_{sat}$ es la cantidad de enzima adsorbida correspondiente a la saturación. Esta hipótesis de equilibrio instantáneo está fundamentada en las medidas de la concentración de enzima en la fase acuosa, que han demostrado que prácticamente toda la enzima se encuentra adsorbida independientemente del momento en que se realice el análisis.

Huang (1975) considera al sustrato y enzima como sustancias únicas, supone una inhibición competitiva de producto (ecuaciones [2.1] y [2.2]) y establece una adsorción según el equilibrio de Langmuir. Este modelo correlaciona aceptablemente los resultados de la hidrólisis con celulasas de T. viride de una celulosa comercial pretratada con un agente de "swelling", hasta con-

versiones del 70%. Las discrepancias a altas conversiones pueden ser debidas, según Huang (1975), a que $(ES)_{ad} \ll (ES)_{sat}$, puede no ser cierto a tiempos de reacción elevados, aunque en realidad parece más lógico suponer que este modelo es deficiente en cuanto que no se tiene en cuenta la complejidad del sistema enzimático, al igual que en los casos ya comentados de Howell y Mangat y Howell y Stuck, por lo que parece que la consideración de la adsorción no mejora los resultados obtenidos al aplicar el modelo.

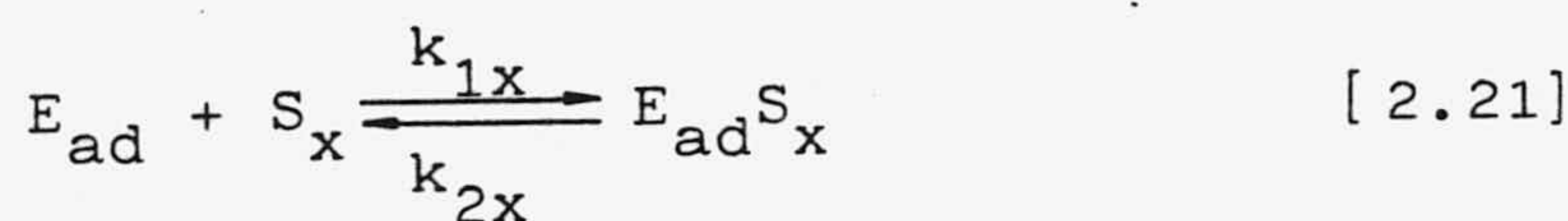
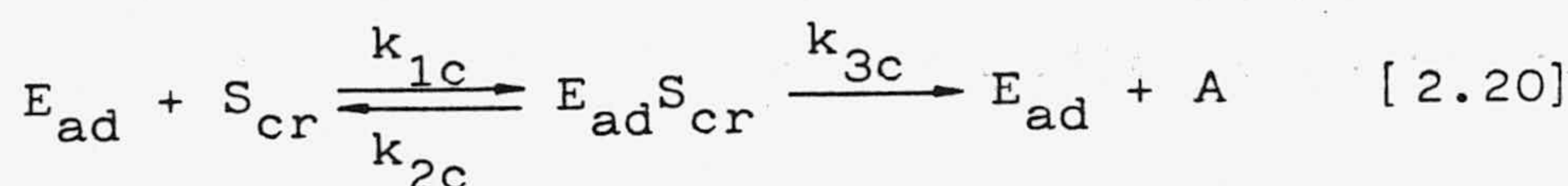
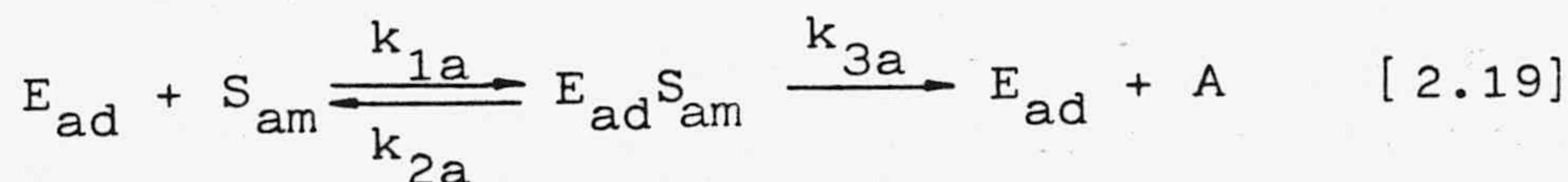
Holtzapple y col. (1984) intentan dar una explicación a los diferentes tipos de inhibición que pueden existir admitiendo un mecanismo de adsorción en el que una fracción de las enzimas está adsorbida físicamente y otra forma parte del complejo enzima-sustrato. En ambos casos puede acomplejarse con los productos inhibiendo, por tanto, su actividad; es decir:



Este modelo parece ajustar los resultados con errores inferiores a los obtenidos con los modelos propuestos por Howell y Mangat, Howell y Stuck y Huang.

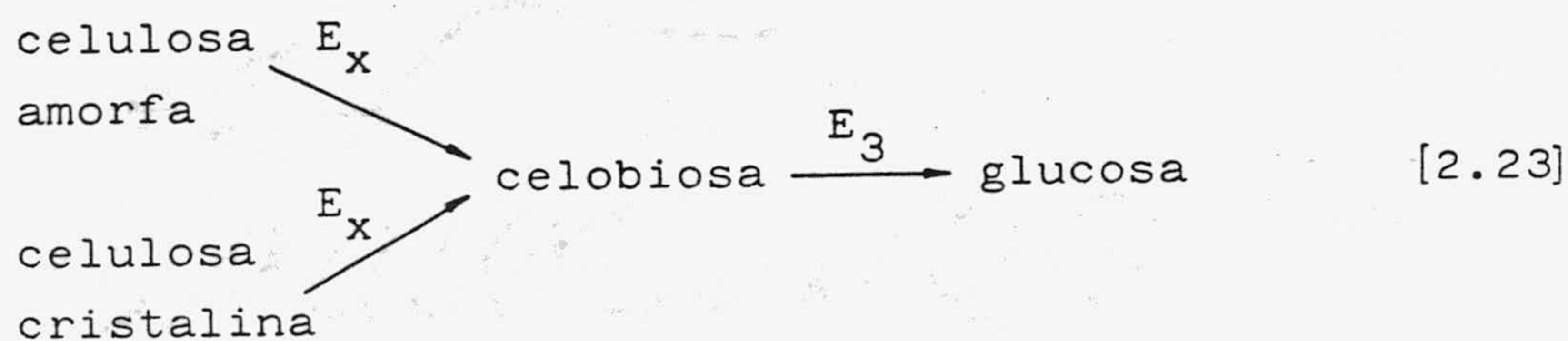
Un cuarto grupo de modelos cinéticos son los que tienen en cuenta la existencia en la celulosa nativa de una fracción amorfa y otra cristalina, que por sus características se hidrolizan a diferente velocidad. Ryu y col. (1982) proponen un mecanismo de hidrólisis basado en esta idea, admitiendo una degradación simultánea de ambas fracciones (aunque con diferente velocidad) por las celulasas consideradas como un todo. También admiten el equilibrio entre la enzima adsorbida y en

disolución mediante una isoterma de Langmuir. El esquema del modelo es



donde [2.21] representa la inhibición de las celulasas por parte de otras sustancias que acompañan a la celulosa en los residuos lignocelulósicos.

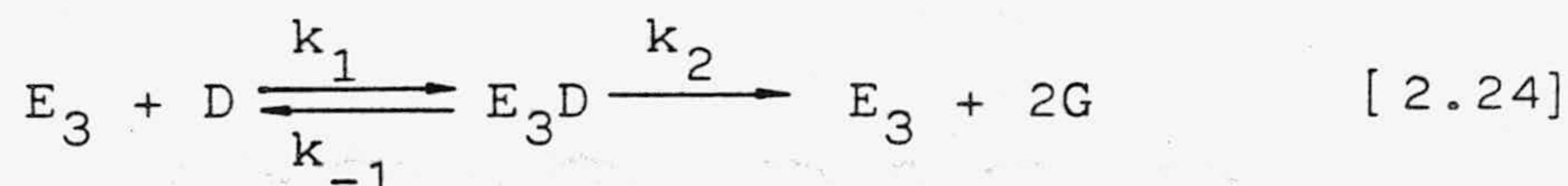
Wald y col. (1984) proponen un esquema de reacción análogo al representado por [2.18] a [2.22] pero lo completan al distinguir entre la acción conjunta de las endo y exoglucanasas y la correspondiente a la β -1,4-glucosidasa, es decir



En las etapas heterogéneas admiten, al igual que Ryu y col. (1982), la inhibición competitiva de producto

y en la homogénea una inhibición mixta (competitiva y no competitiva). Según sus autores este modelo presenta la ventaja de predecir bien los resultados experimentales a muy altas concentraciones de sustrato y enzima. Sin embargo, para el ajuste de los resultados experimentales, ha de recurrirse a una expresión semiempírica para la hidrólisis enzimática de la celobiosa.

Hasta ahora todos los modelos comentados parecen coincidir en la existencia de una inhibición de producto tanto para las endo y exoglucanasas como para la β -1,4-glucosidasa; sin embargo, existen algunos autores que también proponen la existencia de una inhibición de sustrato por parte de la celobiosa sobre la β -1,4-glucosidasa, Grous y col. (1985), Hong y col. (1981) y Camacho y col. (1984). Grous y col. hidrolizan celobiosa con celobiasas de T. reesei y A. niger y proponen el modelo cinético siguiente:



La ecuación [2.26] representa una inhibición de la celobiosa D sobre el complejo activo E_3D . Esta inhibición se da fundamentalmente a altas concentraciones de celobiosa, mientras que a bajas concentraciones basta con las ecuaciones [2.24] y [2.25] para correlacionar los resultados experimentales.

Un último grupo de modelos lo constituyen los de tipo empírico, que si bien pueden describir adecua-

damente los resultados experimentales, no tienen una base teórica, aunque pueden presentar características que son consistentes con los modelos teóricos de hidrólisis de la celulosa. Estos modelos son fundamentalmente dos, el potencial, propuesto por Walseth (1952), cuya ecuación es

$$X = K t^n \quad [2.27]$$

y el hiperbólico, Holtzapple y col. (1984)

$$X = X_{\max} \frac{t}{t_{1/2} + t} \quad [2.28]$$

donde X es la conversión del sustrato y K, n, X_{\max} y $t_{1/2}$ parámetros cinéticos que, en el caso del modelo hiperbólico, tienen un claro significado físico: X_{\max} representa la máxima conversión que puede alcanzarse y $t_{1/2}$ es el tiempo necesario para que $X = \frac{1}{2}(X_{\max})$. En el caso del modelo potencial se ha propuesto el valor $n = 0,5$ y que K puede correlacionarse con la concentración de enzima mediante

$$K = K_0 E^m \quad [2.29]$$

Holtzapple y col. (1984) han utilizado ambos modelos para correlacionar los resultados de la hidrólisis de madera de álamo con celulasas de Thermomonospora sp., resultando ambos adecuados para correlacionar estos datos. Mediante la expresión [2.29] es posible ajustar la concentración de enzima con K (pendientes de las líneas X vs $t^{0,5}$) pero modificando [2.29] en el sentido de que no toda la enzima presente es activa, sino que parte de ella está inhibida por la celobiosa, es decir, que [2.29] ha de transformarse en

$$K = K_0 \left[\frac{E}{1 + \phi D} \right]^m \quad [2.30]$$

siendo ϕ la constante de inhibición de la celobiosa.

También con el modelo potencial fue posible correlacionar los resultados encontrándose que X_{\max} es una función de la concentración de enzima activa.

Ambos modelos resultan ser adecuados para correlacionar los datos experimentales en el rango en que éstos se han obtenido y tienen características que los hacen consistentes con los modelos teóricos de la hidrólisis de la celulosa; así, a tiempo cero los modelos teóricos predicen una velocidad de reacción finita, lo que también predice el modelo hiperbólico, aunque no el potencial (que da velocidad inicial cero). Sin embargo, a tiempos grandes ningún modelo coincide adecuadamente con la predicción implícita en los modelos teóricos, ya que éstos preveen que a tiempo infinito es posible la hidrólisis total del sustrato, mientras que el modelo potencial conduce a una conversión infinita y el modelo hiperbólico a una conversión finita máxima, X_{\max} , lo que está más cerca de la realidad.

2.4.2. Nuevas tecnologías en la hidrólisis enzimática de celulosa

En la descripción de los modelos que tratan de definir el proceso de hidrólisis enzimática ha quedado patente la existencia de fenómenos de inhibición de producto que conducen a una escasa utilización real de las enzimas y por tanto a rendimientos bajos en glucosa y otros azúcares fermentables. Se ha tratado de atenuar esta inhibición mediante la adición de β -1,4-glucosidasa para evitar la acumulación de celobiosa que inhiba a las celulasas, Pemberton y col. (1980) y Desrochers y col. (1981). En este sentido la obtención de β -1,4-glucosidasa a partir de Aspergillus es interesante, ya que este microorganismo es más económico para su producción. También, como ya se comentó al hablar de la obtención de etanol o SCP, puede evitarse la inhibición de las celulasas fermentando simultáneamente la glucosa a etanol, con lo que la concentración de azúcares reductores se mantiene por debajo de los niveles de inhibición. Pero este proceso, además de las dificultades ya señaladas, puede tener el inconveniente de que sean atacadas las paredes celulares de las levaduras por las celulasas, Pemberton y col. (1980), Ghose y col. (1984) y Reese y Mandels (1980).

Así pues, la inhibición de producto unida a la baja actividad de las celulasas y a su precio actual, hacen que sea necesario idear nuevos métodos para que la utilización de la enzima durante los procesos de hidrólisis sea óptima. En este sentido se han propuesto, además de los ya mencionados con respecto a la inhibición de producto, las siguientes posibilidades:

- Inmovilización de β -1,4-glucosidasa. La inmovilización de celulasas es poco útil ya que la celulosa es un sustrato insoluble y, en consecuencia, la superfi-

cie de contacto enzima-sustrato será pequeña; por tanto sólo es posible hidrolizar los jarabes de celobiosa, obtenidos durante la etapa heterogénea, con celobiasas inmovilizadas, y de esta forma se puede reducir la inhibición producida por la celobiosa sobre E_1 y E_2 y de la glucosa sobre E_3 ; además, esto permite utilizar β -1,4-glucosidasa para sucesivas sacarificaciones. Estas inmovilizaciones se pueden hacer sobre soportes como carbonato de celulosa, CNBr-celulosa activada (chitosan), Bissett y Sternberg (1978), Srinivasan y Bumm (1974), alginato cálcico, Jain y Ghose (1984), o materiales inorgánicos como alúmina, resinas de cambio iónico (Amberlita), etc, Sundstrom y col. (1981).

Sin embargo, la inmovilización de β -1,4-glucosidasa da lugar a variaciones en su estabilidad térmica y en su actividad, que dependen del soporte utilizado. Así, la inmovilización de celobiasa del Aspergillus phoenicis sobre CNBr-celulosa activada da lugar a un descenso de la actividad del 90%, pero la estabilidad térmica de la enzima a 65°C (temperatura óptima) se multiplicó por 100 (con respecto al tiempo). Por el contrario, la inmovilización de esta enzima sobre alúmina mantuvo un 90% de la actividad enzimática, no dándose variaciones en la estabilidad térmica, Woodward y Wiseman (1982).

- Reactores de ultrafiltración. La reutilización de las enzimas que permanecen en el sustrato de hidrólisis, recuperándolas por precipitación, adsorción sobre sustrato fresco o por ultrafiltración, Castanon y Wilke (1980), Peitersen y col. (1977) y López Leiva (1983), presenta el inconveniente de que las enzimas se adsorben fuertemente sobre el sustrato, por lo que sólo una pequeña fracción de endo y exoglucanasas permanecen en disolución. No obstante, a pesar de esto, la degradación de la celulosa a celobiosa por una exoglucanasa de T.

viride se incrementó desde un 45% hasta un 80% cuando se retiraron los productos a través de una membrana de ultrafiltración, Berghem y col. (1975). Ohlson y col. (1984) mejoraron también el grado de conversión desde un 40% hasta un 95% mediante una membrana de ultrafiltración para retirar de forma continua los productos de la hidrólisis, ya que de esta forma se evita la inhibición por los productos. Ohlson y col. obtuvieron hasta 25 g de azúcares reductores/g de enzima, mientras que sin membrana el rendimiento fue de 4,7 g/g.

2.5. HIDROLISIS ACIDA DE RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS

Como ya se ha comentado, la hidrólisis enzimática de celulosa presenta actualmente los inconvenientes de una baja velocidad de reacción y un alto costo de las enzimas, si bien es un proceso limpio que tiene lugar en condiciones moderadas de pH y temperatura. La hidrólisis ácida, por el contrario, transcurre con una alta velocidad de reacción y los ácidos utilizados, HCl y H_2SO_4 fundamentalmente, son baratos si se comparan con el costo de las celulasas. Sin embargo, los productos de degradación de la materia prima pueden ser abundantes y las condiciones de operación (temperatura y presión) enérgicas, sobre todo si se utilizan ácidos diluidos. Todo esto encarece el costo del equipo, ocasiona problemas de corrosión y puede dificultar la fermentación de los hidrolizados debido a la presencia de iones metálicos provenientes del equipo utilizado y a que algunos productos de degradación son tóxicos para las levaduras, Leonard y Hajny (1945) y Chung y Lee (1985).

En la figura 2.6 se esquematizan las vías y los productos intermedios y finales que es posible obtener de la hidrólisis de hemicelulosa y celulosa. En general los hidrolizados de la biomasa residual contienen azúcares, furfural y otros productos de degradación de la lignina. También se han detectado cantidades significativas de los ácidos acético, levulínico y fórmico, así como 2-hidroximetil-5-furaldehído (HMF), Church y Wooldrige (1981) y Rubio y col. (1985).

La hidrólisis de las hemicelulosas se realiza en condiciones bastante más suaves que las necesarias para hidrolizar celulosa. Por ello, si se quieren paliar los inconvenientes debidos a los productos de degradación de las hemicelulosas, que se van a presentar siempre en

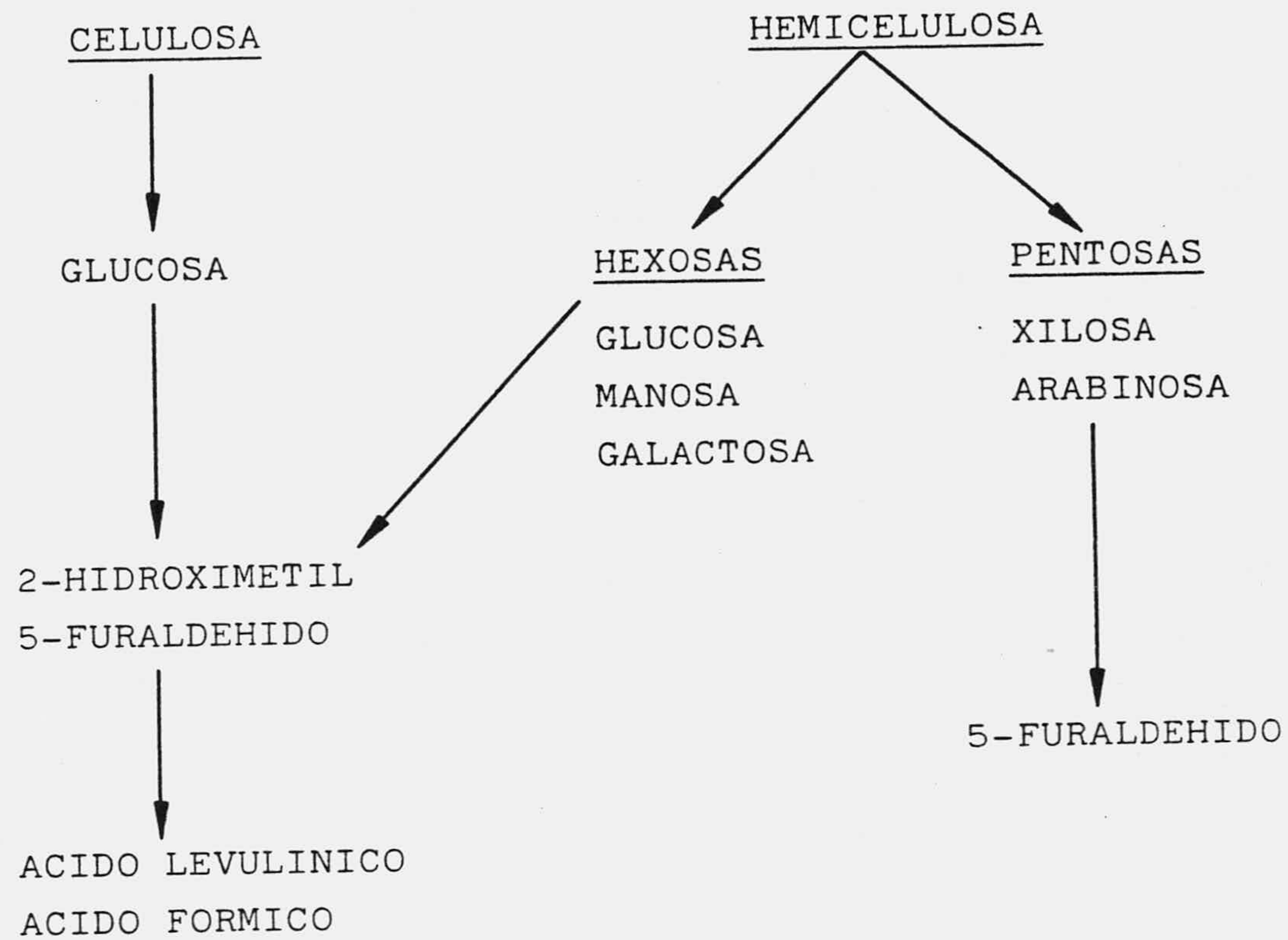


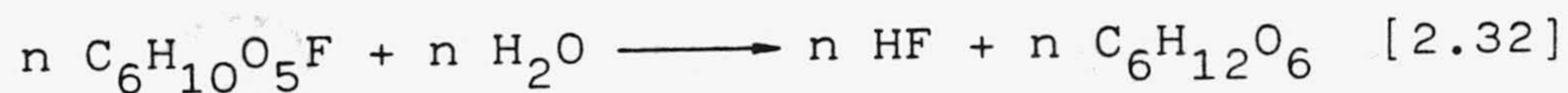
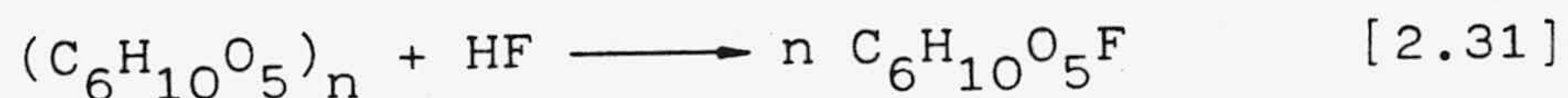
Figura 2.6.- Hidrólisis ácida de celulosa y hemicelulosa: productos intermedios y finales más importantes que se obtienen.

la hidrólisis conjunta de los residuos lignocelulósicos, y realizar simultáneamente un pretratamiento del sustrato, es conveniente separar las distintas fracciones que componen el residuo lignocelulósico. En este sentido, es interesante comentar el proceso propuesto por Tsao y col. (1978). En él se realiza una hidrólisis ácida de las hemicelulosas con H_2SO_4 diluido (0,5 - 5% en peso) a temperaturas moderadas (90 - 100°C). A continuación se solubiliza la celulosa con H_2SO_4 concentrado y a temperatura ambiente; por tanto queda un residuo sólido que está formado fundamentalmente por lignina, si bien esta sustancia puede haber sido degradada parcialmente debido a la pérdida de los grupos metoxilo y de cadenas de base fenólica unidas débilmente al núcleo central, Rubio y col. (1985). A continuación se reprecipita la celulosa y finalmente se hidroliza con H_2SO_4 diluido a altas temperaturas.

Otra diferencia entre las hidrólisis ácida y enzimática es el diferente grado de polimerización medio que se obtiene en uno y otro caso. Así por ejemplo, la hidrólisis de una celulosa de DP inicial 900 con HCl 4 N hace decrecer su DP hasta 200 y, en cambio, sólo se solubiliza el 15% del sustrato. Sin embargo, su hidrólisis enzimática con celulasas sólo hace decrecer el DP medio hasta 800 mientras que se solubiliza el 40% de la celulosa inicial, Nisizaws (1973). Estos hechos se pueden explicar en función de los tamaños relativos de los dos catalizadores y de la mayor selectividad del complejo enzimático.

Los ácidos más utilizados en la hidrólisis son HCl y H_2SO_4 , fundamentalmente este último debido a su costo y baja volatilidad. No obstante, aunque es conocido de antiguo, se está comenzando a utilizar HF, líquido o gas, para la hidrólisis de los residuos celulósicos, Hardt y Lamport (1982) y Selke y col. (1982).

Las reacciones que se producen en este caso son:



Las ventajas que parece presentar este procedimiento son su alto rendimiento en glucosa (del orden del 90%), tiempos de reacción pequeños (30 minutos) y bajas temperaturas de hidrólisis (0 - 25°C); por otra parte, es posible reciclar HF, eliminando así la posterior neutralización, y se obtiene una lignina altamente reactiva para usos químicos. Sin embargo, presenta los inconvenientes del coste del HF y su posible toxicidad, por lo que es necesaria su recuperación total. No obstante parece ser económicamente viable y es posible la fermentación posterior, sin grandes inconvenientes de los hidrolizados de glucosa.

2.5.1. Hidrólisis ácida de hemicelulosa

A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa puede encontrarse con estructuras y composiciones diferentes; lo más frecuente es que sea amorfa, por lo que las condiciones necesarias para su hidrólisis son más suaves que para la celulosa; en cuanto a su composición la forma más usual es arabinoxilano, que es un heteropolímero de unidades de xilosa unidas por enlaces β -1,4-glucosídicos y residuos de arabinosa enlazados a la cadena principal, González y col. (1986). La hidrólisis ácida de estas pentosas produce xilosa y arabinosa que por degradación dan lugar a furfural (5 - furaldehído) (figura 2.6).

Un modelo cinético de la hidrólisis ácida de la hemicelulosa debería considerar los múltiples intermedios producidos por la rotura de los distintos tipos de enlaces, González y col. (1986). Tal esquema de reacción implica la existencia de especies intermedias que conducen a xilosa y arabinosa como productos principales, que posteriormente serían degradados; el análisis matemático con todos los productos intermedios es difícil y la mayoría de los autores, Ranganathan y col (1985) y Bhandari y col. (1984), ajustan sus datos a un modelo simplificado de la forma



González y col. (1986) contemplan también la formación de arabinosa mediante el mecanismo



En [2.34] no se consideran los productos de degradación

debido a las suaves condiciones de operación utilizadas. En todos los casos las reacciones se consideran de primer orden, Ranganathan y col. (1985), Bhandari y col. (1984) y González y col. (1986).

Los rendimientos en xilosa obtenidos dependen de las condiciones utilizadas y del tipo de ácido. Según González y col. se obtiene una completa solubilización de la hemicelulosa de la paja de trigo utilizando H_2SO_4 del 0,5 al 2% (peso/volumen) a $90^\circ C$ y en este caso las cantidades de furfural no son significativas.

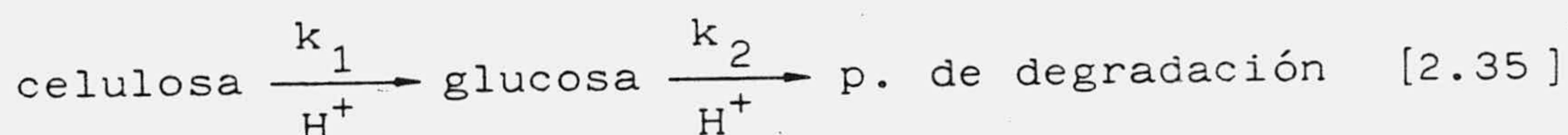
Fanta y col. (1984) hidrolizan el 80% de la hemicelulosa contenida en un sustrato similar con ácido trifluoroacético 1 N durante 7 h a $99^\circ C$. La descomposición de la xilosa fue mínima si se compara con el mismo tratamiento realizado con HCl. Según estos autores la ventaja de utilizar ácido trifluoroacético en lugar de H_2SO_4 estriba en que el primero se puede separar de los hidrolizados por destilación a vacío; los resultados de la fermentación de estos hidrolizados con la levadura Pachisolem tannofilus son semejantes a los obtenidos al fermentar xilosa pura, aunque el tratamiento con ácido trifluoroacético solubilizó un 10% de la lignina presente.

2.5.2. Hidrólisis ácida de celulosa

La hidrólisis ácida de la celulosa ha sido objeto de una intensa investigación durante estos últimos años; en la tabla 2.13 se muestran una serie de trabajos realizados con diferentes sustratos y diferentes condiciones experimentales, así como los rendimientos obtenidos para la glucosa. A continuación se comentan los modelos propuestos para reproducir los datos de hidrólisis así como la influencia de las condiciones de proceso sobre el rendimiento en glucosa.

2.5.2.1. Modelo cinético

El mecanismo de la hidrólisis ácida de la celulosa se puede considerar que transcurre mediante dos reacciones en serie, homogéneas y de primer orden, si los tamaños de partícula son suficientemente pequeños para que pueda despreciarse la difusión del ácido hacia el interior de la partícula y de los azúcares formados hacia el exterior, Thomson y Grethlein (1979), Church y Wooldridge (1981), Rubio y col. (1985), etc.



Así pues, el modelo aplicable es

$$\frac{dC_G}{dt} = k_1 C_S - k_2 C_G \quad [2.36]$$

donde C_S y C_G son, respectivamente, las concentraciones de celulosa y glucosa. La ecuación [2.36] puede ser integrada a temperatura y concentración de ácido constantes para un sustrato de fracción inicial de celulosa conocida, C_{S0} , obteniéndose que

Tabla 2.13

Rendimientos en glucosa obtenidos por diversos autores con distintos sustratos y diferentes condiciones experimentales.

Sustrato	Contenido carbohidr. (%)	Alimento sólidos (%)	Reactor	T (°C)	H ₂ SO ₄ (% peso)	tiempo resid. (min)	Glucosa hidrol. (%)	Jarabe glucosa (%)	Ref.
Solka floc	88,2	13,5	FP	240	1	0,22	50	6,2	Thomson (1979)
Papel	48,6	5	FP	232	1,21	0,274	51,9	1,7	"
"	48,6	5	FP	226	1,22	0,275	49,3	-	"
Serrín de roble	43,1	35	FP	205	1,8	4,5	40	5-6	Church y col.(1981)
Papel	58,2	18	FP	204	2,2	3,3	38	-	"
"	58,2	8	FP	216	1,4	1,8	40	-	"
"	58,2	8	FP	202	1,4	6,5	35	-	"
Bagazo de maiz	31,7	33,3	Autoc	169- -240	0,49	44	17	-	Bhandari y col.(1984)
"	34,9	33,3	Autoc	"	0,92	36	26,4	-	"
"	34,9	33,3	Autoc	"	1,47	39	24,5	-	"
Paja de trigo	50	5	Autoc	120- -210	0,5- -1,5	40	18	-	Ranganathan y col.(1985)

FP: reactor continuo (flujo de pistón).

Autoc: reactor discontinuo (autoclave).

$$C_G = C_{S_0} \frac{k_1}{k_1 - k_2} (\exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t)) + C_{G_0} \exp(-k_2 t) \quad [2.37]$$

C_{G_0} representa la pequeña fracción de celulosa amorfa que se hidroliza de inmediato a glucosa y que pasa a ser degradada.

Las constantes cinéticas (k_1 y k_2) pueden relacionarse con la temperatura por ecuaciones de tipo Arrhenius

$$k_1 = K_{10} \exp(-E_1/RT) \quad [2.38]$$

$$k_2 = K_{20} \exp(-E_2/RT) \quad [2.39]$$

donde E_1 y E_2 son las energías aparentes de activación y K_{10} y K_{20} dos factores preexponenciales función de la concentración de ácido

$$K_{10} = K_{11} C_a^u \quad [2.40]$$

$$K_{20} = K_{21} C_a^v \quad [2.41]$$

donde C_a es la concentración de H_2SO_4 expresada usualmente en tanto por cien en peso.

Los factores preexponenciales K_{11} y K_{21} , las energías de activación E_1 y E_2 y los exponentes u y v se determinan experimentalmente; en la tabla 2.14 se dan algunos valores para estos parámetros obtenidos con diferentes sustratos y condiciones experimentales. En esta tabla se observa que el modelo cinético ha sido ampliamente utilizado y que los valores de los parámetros cinéticos difieren para cada sustrato y condiciones experimentales utilizadas, así como para cada tipo de reactor empleado.

Tabla 2.14

Valores obtenidos por diversos autores para los parámetros que relacionan las constantes cinéticas de formación (k_1) y degradación de glucosa (k_2) con la temperatura (E_1 y E_2) y con la concentración de ácido (u y v) (ecuaciones [2.38] a [2.41]).

Sustrato	K_{11} (h^{-1})	u	E_1 (KJ/mol)	K_{21} (h^{-1})	v	E_2 (KJ/mol)	Condiciones experimentales	Referencia
Madera de abeto	$1,04 \cdot 10^{21}$	1,34	179,5	$1,43 \cdot 10^{16}$	1,02	137,5	170-190°C/Autoc	Saeman (1945)
Papel kraft	$1,70 \cdot 10^{23}$	1,78	188,7	$2,90 \cdot 10^{16}$	0,56	137,2	180-230°C/Autoc	Fagan y col. (1981)
Solka floc	$7,32 \cdot 10^{20}$	1,16	177,8	$2,30 \cdot 10^{16}$	0,69	136,8	180-240°C/FP	Thompson y col. (1979)
Serrín de roble	$2,60 \cdot 10^{20}$	1,00	179,5	$1,70 \cdot 10^{14}$	1,80	125,5	200-225°C/FP	Church y col. (1981)
Bagazo de maiz	$1,60 \cdot 10^{21}$	2,74	189,5	$1,21 \cdot 10^{16}$	1,86	137,2	160-240°C/Autoc	Bhandari y col. (1984)
Paja de trigo	$4,13 \cdot 10^{16}$	1,16	138,0	$2,57 \cdot 10^{11}$	0,60	87,9	100-120°C/Autoc	Ranganathan y col. (1985)
Chopo	$3,67 \cdot 10^{17}$	0,99	147,1	$2,38 \cdot 10^{10}$	0,57	87,9	190-240°C/FP	Grethlein (1982)
Pino	$3,48 \cdot 10^{19}$	1,28	165,0	$1,08 \cdot 10^{16}$	0,88	134,3	180-220°C/Autoc	Guha (1981)



2.5.2.2. Influencia de las condiciones experimentales

a) Temperatura de hidrólisis

Como se muestra en la tabla 2.14 la energía de activación aparente correspondiente a la formación de glucosa, E_1 , es siempre mayor que la necesaria para su degradación, E_2 , luego un aumento de la temperatura incrementará más la velocidad de formación que la velocidad de descomposición. Sin embargo, la aplicación de estos parámetros debe hacerse exclusivamente en el rango en que han sido calculados, ya que un aumento excesivo de la temperatura da lugar a la aparición de nuevos fenómenos que hacen que los resultados se alejen de lo previsto por el modelo. Así Church y Wooldridge (1981) observaron que a temperaturas superiores a 215 - 225°C se obtiene una excesiva deposición de residuos carbonosos y no se incrementa el rendimiento en glucosa tal como indica el modelo cinético. Según estos autores, parece como si a altas temperaturas ocurriera una rápida polimerización de los productos de hidrólisis y en definitiva una compleja secuencia de degradación de la glucosa que reduce la validez del modelo de reacciones de primer orden (ecuación [2.35]). Este hecho está relacionado con la temperatura de transición vítrea, que para la celulosa se encuentra en el intervalo de 230 - 240°C; por tanto, una extrapolación del modelo a estas temperaturas puede no ser válida ya que cuando el polímero alcanza el estado vítreo la reología de la suspensión cambia considerablemente, Rubio y col. (1985). Además, otro factor limitante es la posible pirólisis de la celulosa que puede iniciarse a temperaturas del orden de los 250°C.

b) Concentración de ácido

En la tabla 2.14 se observa que todos los valores

de u son superiores a los correspondientes de v , excepto en el caso de los resultados de Church y Wooldridge (1981). Este hecho indica que en la mayoría de los casos un aumento de la concentración de ácido favorece más la velocidad de formación de glucosa que su velocidad de degradación. Según Church y Wooldridge el valor de u obtenido en su trabajo puede estar relacionado con las altas concentraciones de sólidos en el alimento (del orden del 35%), ya que es posible que estos niveles de concentración den como resultado cambios en el mecanismo de destrucción de la glucosa.

También destacan en la tabla 2.14 los altos valores de u y v encontrados por Bhandari y col. (1984); estos datos indican que las velocidades de hidrólisis y degradación del bagazo de caña de maíz aumentan con la concentración de ácido más rápidamente que las de otros sustratos; según estos autores esto puede ser debido a la formación de ácidos orgánicos, tales como el acético, (detectados entre los productos de reacción) que incrementan el efecto catalítico del H_2SO_4 . Otra razón para estos altos valores de u y v es, quizás, la posible aceleración de la velocidad de reacción por la presencia de sales de sodio, potasio y hierro que incrementan la actividad aparente del H_2SO_4 (efecto de sal primaria). En este sentido los pretratamientos con ácidos para hidrolizar y separar las hemicelulosas antes de realizar la hidrólisis de la celulosa, pueden retirar también del sustrato determinadas sales inorgánicas impidiendo el efecto de sal primaria.

La hidrólisis ácida de la fracción celulósica también puede realizarse a bajas temperaturas (25 - 40°C) y altas concentraciones de ácido ($\approx 70\%$), Tsao y col. (1978). En estas condiciones el H_2SO_4 se comporta más como un disolvente de la celulosa que como un agente de hidrólisis; no obstante, para tiempos prolon-

gados y temperaturas medias, el efecto hidrolítico puede llegar a ser importante.

c) Tipo de contactor

En cuanto al tipo de reactor Grethlein (1975 y 1978) ha revisado la bibliografía en este campo y ha concluido que la hidrólisis ácida en continuo es probablemente el proceso más económico y aconseja el uso de temperaturas altas y tiempos cortos de residencia, Brenner y col. (1979). También Rubio y col. (1985) comparan los resultados obtenidos con un reactor flujo de pistón y otro de mezcla perfecta basándose en datos cinéticos de la bibliografía; estos autores ponen de manifiesto, como era de esperar, la superioridad del reactor flujo de pistón para el esquema de reacción representado por [2.35] [2.36] y [2.37], ya que ha de evitarse el mezclado de reactivos y productos para aumentar los rendimientos del componente intermedio, en este caso glucosa.

2.5.3. Procesos industriales

La viabilidad económica de la obtención de hidrolizados de celulosa para su fermentación posterior a etanol depende fundamentalmente del rendimiento en etanol, de los costos de las materias primas y equipo y del precio del etanol en el mercado.

El rendimiento en etanol está relacionado, en lo referente a la hidrólisis ácida, con la concentración en azúcares fermentables obtenidos en los hidrolizados finales, la cual depende, fundamentalmente, del tipo de sustrato y del proceso seguido. Como se indica en la tabla 2.13 Church y Wooldridge (1981) obtuvieron hidrolizados cuyo contenido en glucosa es del 5% - 6%. También en la URSS existen aproximadamente 30 plantas que hidrolizan diferentes tipos de madera con un rendimiento del 50%, obteniéndose jarabes de aproximadamente el 3% en glucosa, que son fermentados a etanol con una conversión alta, Grethlein (1977).

También el FRI (Forest Research Institute) de Nueva Zelanda ha puesto en marcha un proceso a escala de planta piloto (figura 2.7) en el cual se obtienen hidrolizados de madera de pino con un 2% - 2,5% en azúcares; estos jarabes son fermentables a etanol obteniendo rendimientos de 245 - 260 litros de etanol anhidro/tonelada de madera seca. El diseño de la planta se ha hecho para realizar la hidrólisis ácida en dos etapas: prehidrólisis a 150°C e hidrólisis a 190°C, ambas con H_2SO_4 del 0,5%. Según el balance económico realizado por sus autores, la competitividad del etanol producido frente a las gasolinas depende en gran medida de factores tales como la escala de la planta, la venta de otros productos secundarios como la lignina, la posible fermentación a etanol de las pentosas, etc, Wayman y Dzenis (1984).

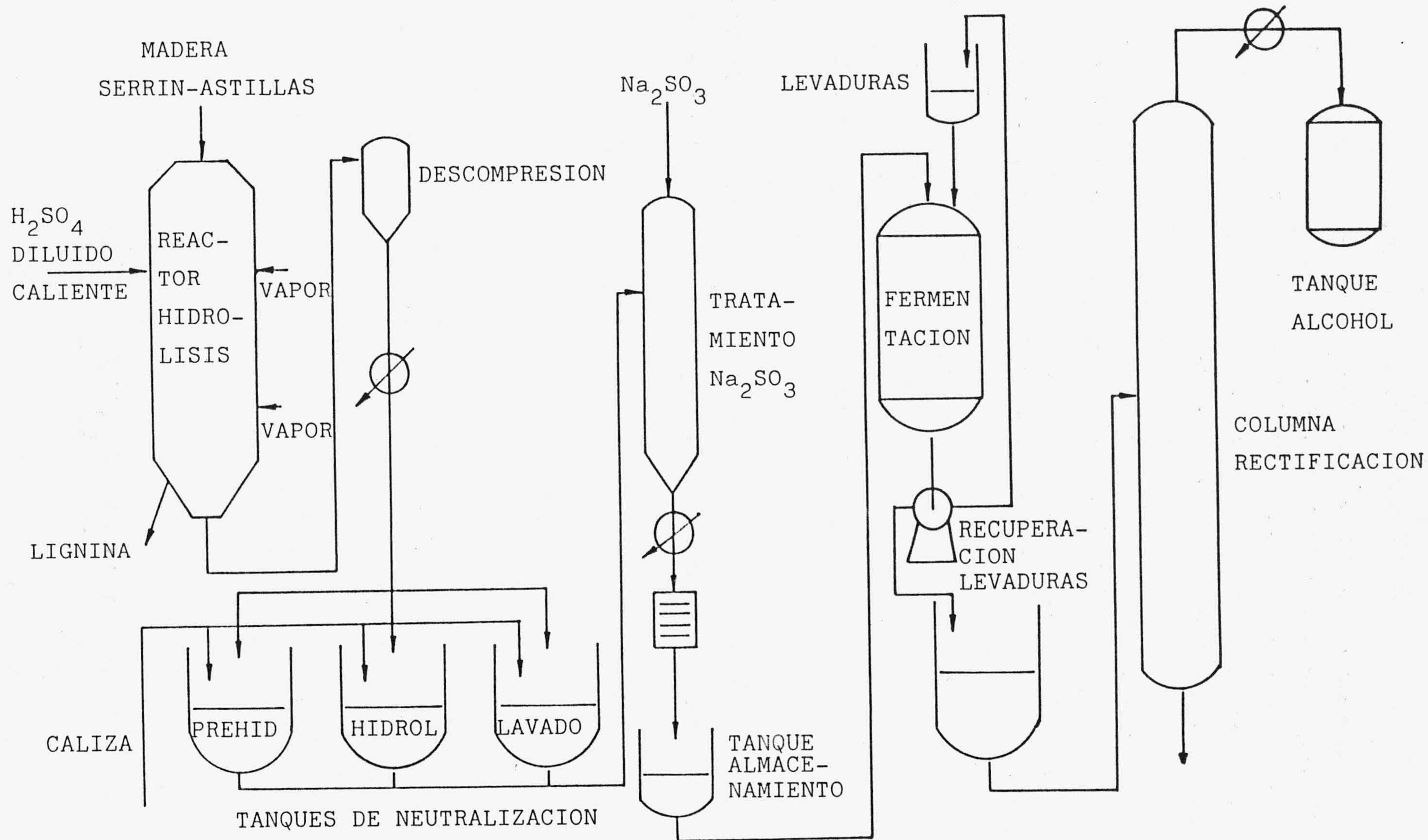


Figura 2.7.- Obtención de etanol a partir de hidrolizados ácidos de madera (proceso FRI), Wayman y Dzenis (1984).

En este sentido, también Church y Wooldridge estimaron que puede ser rentable la obtención de etanol siempre que se produzca furfural como producto secundario y se quemen los residuos sólidos resultantes de la hidrólisis para la obtención de vapor.

Tsao y col. (1978) proponen un proceso en etapas (figura 2.8) para la separación de los tres componentes principales de los residuos lignocelulósicos y para la hidrólisis de hemicelulosas y celulosa: en una primera etapa se separan e hidrolizan las hemicelulosas con H_2SO_4 diluido (0,5% - 5% en peso); el sustrato sólido obtenido se seca hasta un 10% de humedad y se agita con H_2SO_4 de aproximadamente el 70% en peso para disolver la celulosa quedando la lignina como residuo sólido; la celulosa solubilizada se precipita en forma amorfa con metanol, que se retira posteriormente mediante varios lavados con agua; a continuación se realiza la hidrólisis de la celulosa con H_2SO_4 diluido a temperatura elevada. La rentabilidad del proceso exige una completa recuperación y reutilización de todos los subproductos y reactivos.

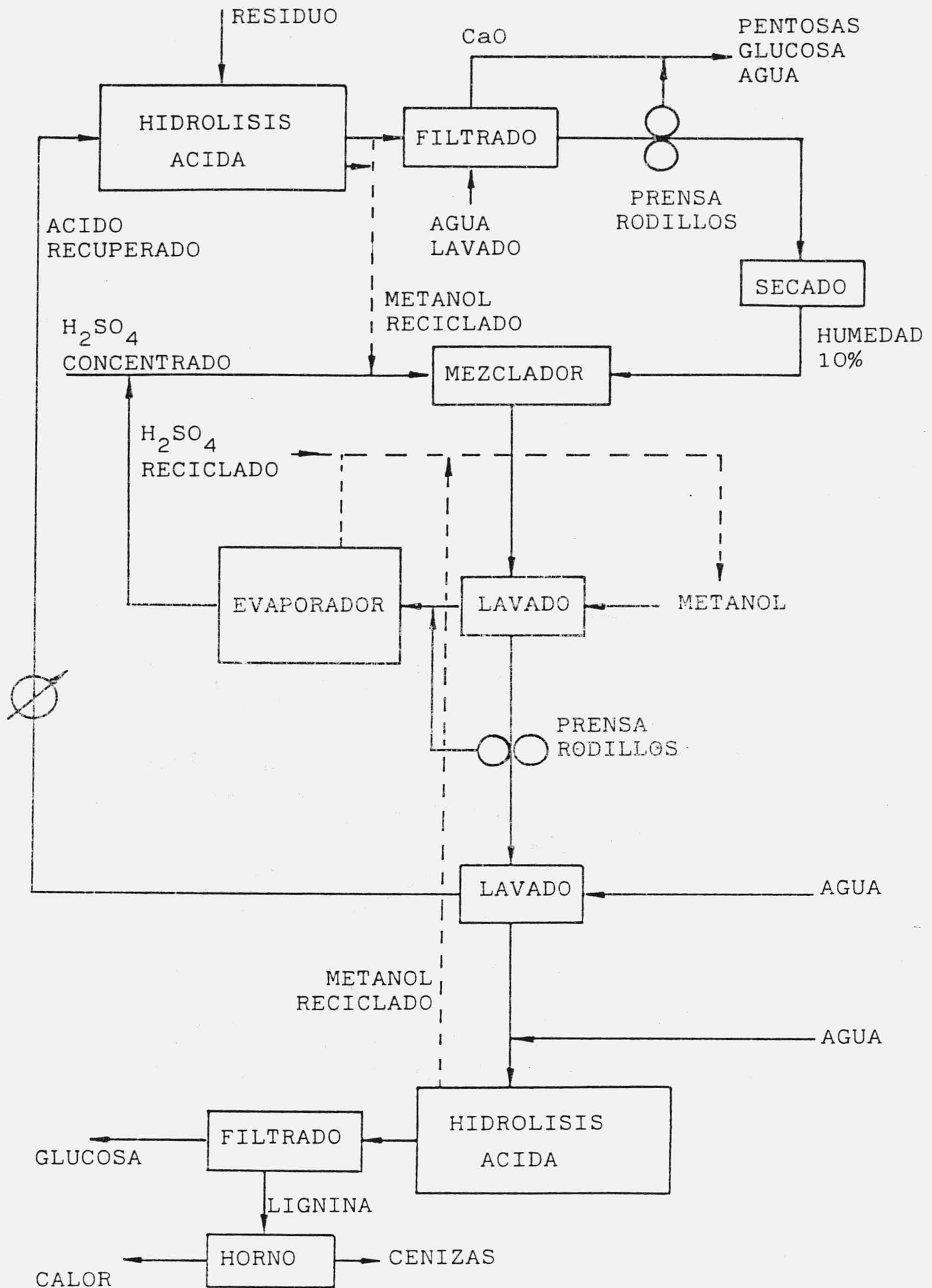


Figura 2.8.- Obtención de glucosa por hidrólisis ácida de residuos lignocelulósicos, Tsao y col. (1978).

3. TECNICA EXPERIMENTAL

3.1. METODOS ANALITICOS

3.1.1. Análisis de azúcares reductores

Para la determinación de la concentración de azúcares reductores, liberados en la hidrólisis de los sustratos celulósicos, se ha utilizado el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) propuesto por Miller (1959).

Para esta determinación se mezclan dos volúmenes definidos de la disolución de azúcares reductores y de reactivo DNS en un tubo de ensayo que se mantiene en agua hirviendo 15 minutos, con lo que se alcanza el desarrollo del color. A continuación se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente y se mide su absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 2000). Como blanco se ha utilizado una disolución de idéntica composición y volumen que la problema, sometida a los mismos tratamientos que ésta, pero de concentración nula en azúcares reductores. Los valores de la absorbancia se llevan a una recta patrón en la que se relacionan concentraciones de glucosa y absorbancias a 640 nm, por lo que los azúcares reductores se han determinado en glucosa equivalente.

Las líneas patrón se han obtenido preparando disoluciones de glucosa de concentraciones comprendidas entre 100 y 700 mg/l; a continuación se realiza el ensayo de azúcares reductores descrito anteriormente mezclando la disolución de glucosa y el reactivo DNS en la misma proporción en que posteriormente se van a preparar

las muestras problema. Las rectas patrón utilizadas han sido obtenidas cada vez que se ha preparado el reactivo DNS; en la figura 3.1 se muestra, a título de ejemplo, una recta patrón para 2 ml de reactivo DNS con 2 ml de disolución de glucosa; la ecuación obtenida es

$$C_G = 1078 A_{640} \quad [3.1]$$

donde A_{640} es la absorbancia medida a 640 nm y C_G la concentración de glucosa en mg/l.

El reactivo DNS está compuesto por: 20 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 4 g de fenol, 1 g de Na_2SO_3 y 400 g de tartrato sódico potásico, que se disuelven en un litro de disolución de NaOH del 2%, diluyendo a continuación hasta un volumen de 2 litros con agua destilada.

En los experimentos de hidrólisis enzimática y/o ácida en que se ha utilizado H_2SO_4 , se realiza el análisis de azúcares reductores en muestras que contienen Na_2SO_4 (proveniente de la neutralización del ácido con NaOH). Para comprobar las posibles interferencias de esta sal sobre la determinación de azúcares reductores se han realizado análisis a disoluciones de concentración de glucosa conocida y de $[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 8 \text{ g/l}$, que es la concentración máxima estimada en los hidrolizados; las absorbancias se han comparado con las correspondientes a las mismas concentraciones de glucosa y concentración nula de Na_2SO_4 . En la tabla 3.1 se muestran los resultados obtenidos para estos análisis; como se observa, la presencia de Na_2SO_4 no parece afectar al método analítico.

La utilización de H_3PO_4 en lugar de H_2SO_4 como agente de pretratamiento de sustratos lignocelulósicos y su posterior neutralización con NH_4OH permitiría obte-

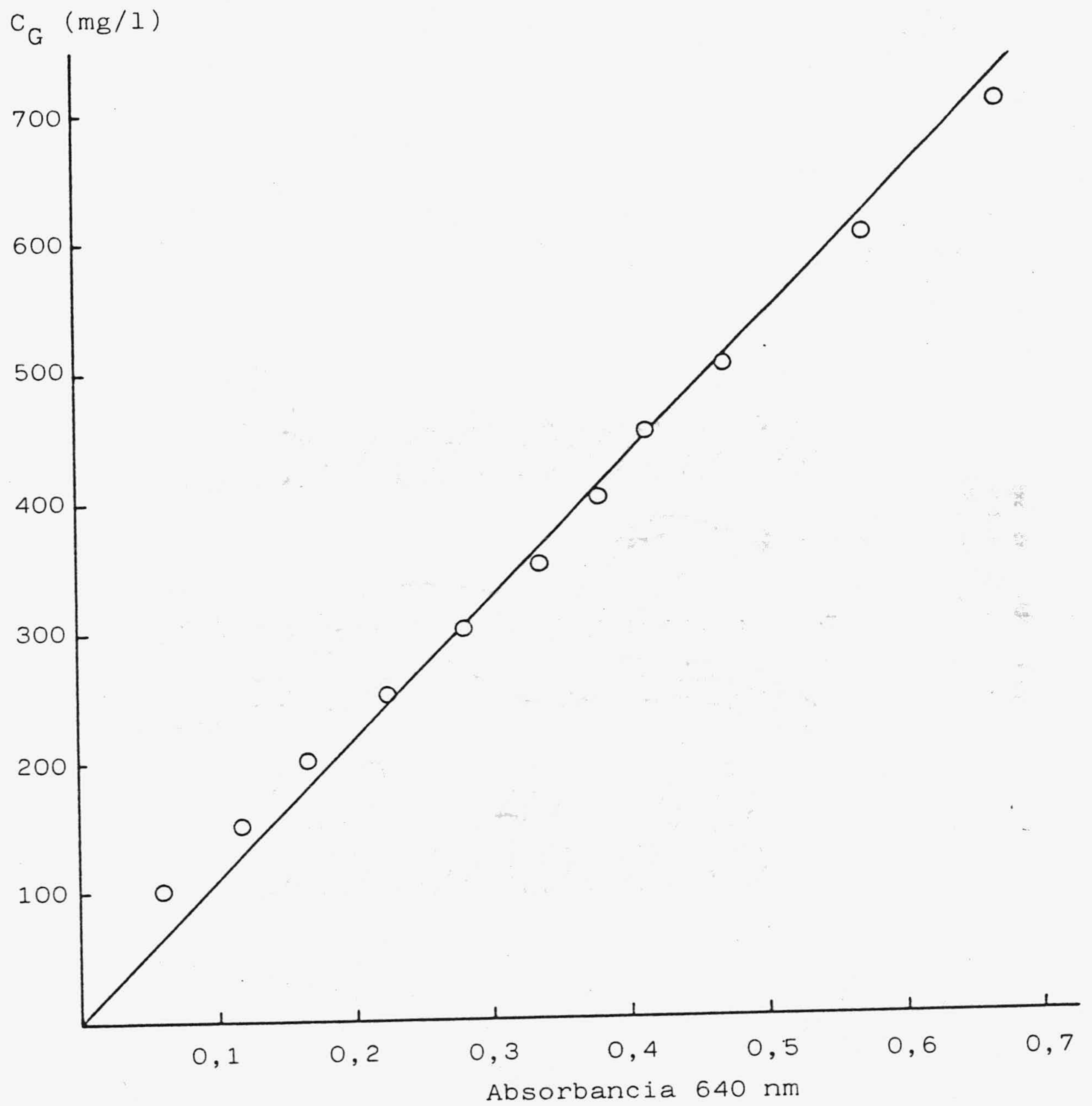


Figura 3.1.- Recta patrón para la determinación de azúcares reductores por el método del DNS.

Tabla 3.1

Influencia de la concentración de Na_2SO_4 sobre la determinación de azúcares reductores por el método del DNS.

C_G (mg/l)	A_{640}	
	$[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 0$	$[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 8 \text{ g/l}$
167	0,147	0,142
250	0,235	0,239
336	0,352	0,352
448	0,474	0,484
500	0,494	0,505
700	0,795	0,758

ner hidrolizados ricos en fosfatos y NH_4^+ , productos que serían útiles como nutrientes en la fermentación posterior; por ello se han realizado ensayos para comprobar las posibles interferencias de fosfatos y NH_4^+ en el método de análisis. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.2. En este caso se observa que las interferencias debidas a ambos iones (sobre todo al NH_4^+) son importantes, por lo que el método de Miller no es útil en presencia de fosfatos y NH_4^+ ; este hecho también ha sido puesto de manifiesto por Dighe y col. (1985).

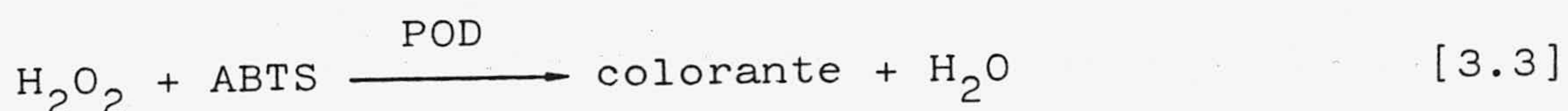
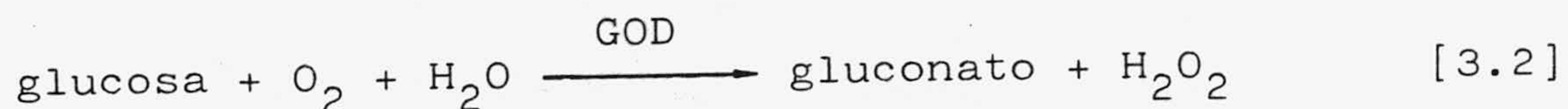
Tabla 3.2

Influencia de las concentraciones de PO_4^{3-} y NH_4^+ sobre el análisis de azúcares reductores por el método del DNS.

C_G (mg/l)	Sustancia	Concentración (g/l)	A_{640}	Desviación (%)
500			0,563	
500	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,01	0,517	-8,2
500	Na_2HPO_4	0,01	0,568	0,9
500	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,01	0,441	-21,7
500	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8,00	nula	-100
500	Na_2HPO_4	8,00	0,342	-39,3
500	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	8,00	nula	-100

3.1.2. Análisis de glucosa

En estos ensayos se ha utilizado el método de la glucosa-oxidasa, método GOD-Perid, propuesto por Werner y col. (1970) basado en las reacciones



donde GOD es la enzima glucosa-oxidasa, POD la enzima peroxidasa y ABTS es el 2,2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolina-ácido sulfónico-(6)] -sal diamónica. Esta última sustancia es incolora mientras que su forma oxidada, producida por la reacción [3.3], es de color verde.

La determinación de glucosa se ha realizado en todos los casos en un tubo de ensayo añadiendo 0,2 ml de disolución problema, medidos con una micropipeta "Brand", a 5 ml de reactivo; esta disolución se incuba durante 15 minutos a 37°C y se mide su absorbancia a 610 nm frente a un blanco compuesto por 5 ml de reactivo y 0,2 ml de una disolución de la misma composición que la problema pero exenta de glucosa.

Del mismo modo que en la determinación de azúcares reductores, se ha obtenido la recta patrón realizando el ensayo descrito previamente a una serie de disoluciones de glucosa de concentraciones comprendidas entre 50 y 250 mg/l. En la figura 3.2 se muestra, a título de ejemplo, una de estas rectas cuya ecuación es

$$C_G = 312,9 A_{610} \quad [3.4]$$

El reactivo utilizado es un preparado comercial (Boehringer Mannheim GmbH, No. 124036) que contiene, en proporciones definidas, las enzimas GOD y POD, el com-

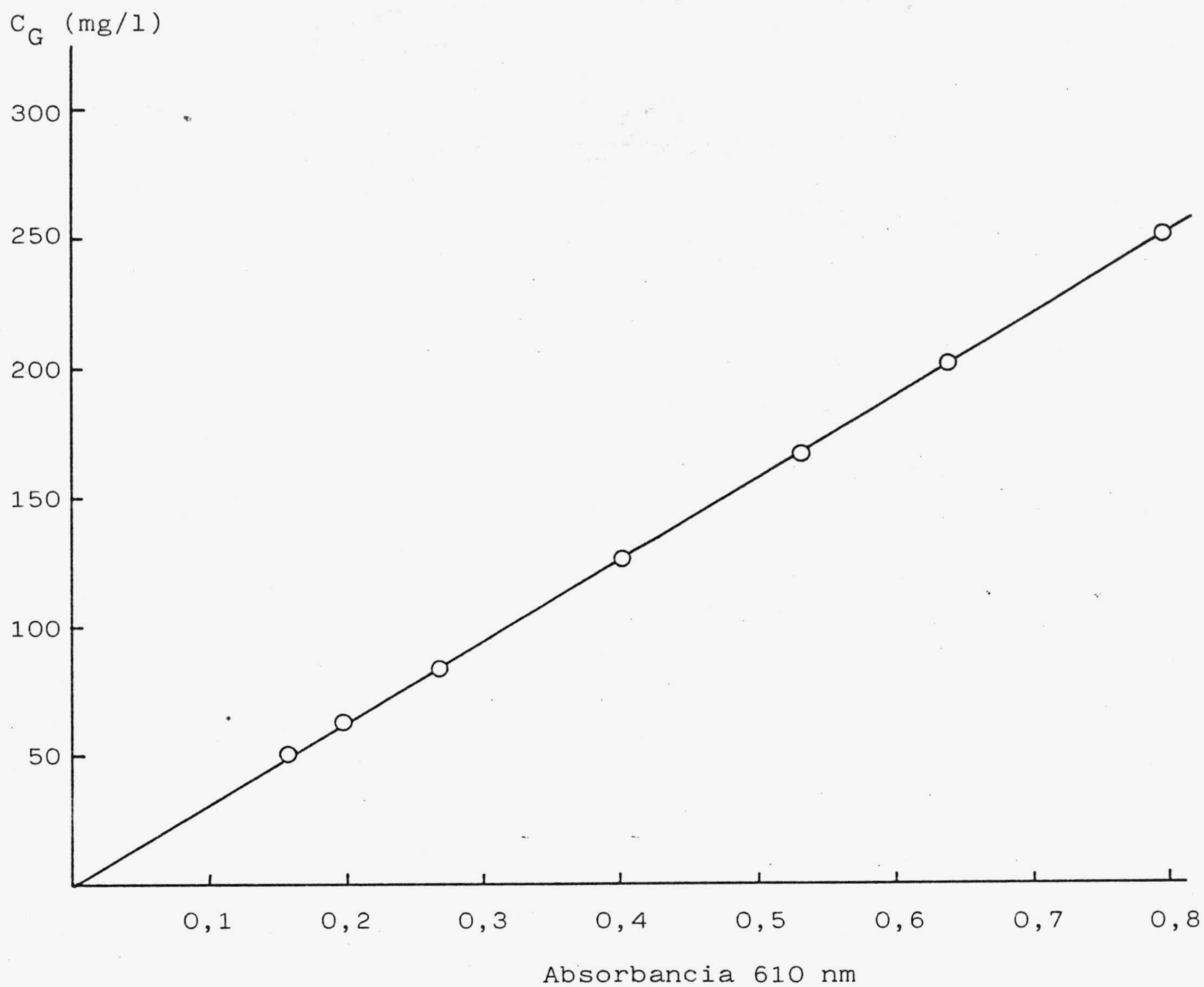


Figura 3.2.- Recta patrón para la determinación de glucosa por el método de la glucosa-oxidasas.

puesto ABTS y un tampón de fosfato, siendo necesario tan sólo diluirlo con agua destilada a un volumen definido. Para cada nuevo preparado de reactivo se obtuvo una recta patrón.

También para este método analítico se ha realizado un estudio de las posibles interferencias que puede presentar el Na_2SO_4 . En la tabla 3.3 se muestra una comparación entre las absorbancias obtenidas para disoluciones de glucosa de concentraciones nulas y 8 g/l en Na_2SO_4 , respectivamente; como se observa en esta tabla las desviaciones encontradas no son significativas, por lo que parece que esta sustancia no interfiere en este método analítico.

Los reactivos utilizados, tanto para la determinación de azúcares reductores como de glucosa, se han conservado a 4°C y periódicamente se ha comprobado su estabilidad.



Tabla 3.3

Influencia de la concentración de Na_2SO_4 sobre la determinación de glucosa por el método de la glucosa-oxidasa.

C_G (mg/l)	A_{610}	
	$[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 0$	$[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 8 \text{ g/l}$
112	0,359	0,362
167	0,534	0,525
200	0,636	0,645
250	0,764	0,767

3.2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA CELULASAS

La actividad enzimática es una medida que se utiliza para caracterizar cinéticamente a las enzimas. En bibliografía se encuentran métodos para medir la actividad celulolítica sobre sustratos insolubles como Avicel, Wood y McCrae (1979), papel de filtro, Mandels y col. (1981), algodón, Wood (1969), etc, sustratos solubles como carboximetilcelulosa (CMC), Wood y McCrae (1979), Mandels y col. (1981) y Wood (1969), y celobiosa, Mandels y col. (1981), Saddler y Khan (1981) y Sternberg y col. (1977).

Las enzimas utilizadas en este trabajo han sido celulasas de Trichoderma viride, Sigma C-8758. La caracterización de este complejo enzimático se ha realizado con tres tipos de sustrato: celulosa microcristalina, Merck 2330 (Avicel), CMC de baja viscosidad, Sigma C-8758, y celobiosa, Sigma G-5000.

Dado que no existe un criterio único para fijar las condiciones experimentales en las que ha de medirse la actividad de un complejo celulolítico, se han elegido las condiciones de pH y temperatura que posteriormente se han utilizado en los experimentos cinéticos (4,9 y 40°C, respectivamente) y los tiempos de incubación y concentraciones de sustrato más usuales en la bibliografía (tabla 3.4). Los experimentos se han llevado a cabo en un reactor termostatzado y agitado, 200 rpm, y al final de cada ensayo se han determinado azúcares reductores mediante el método de Miller, en el caso de los sustratos CMC y celulosa, y glucosa por el método de la glucosa-oxidasa en la medida de la actividad celobiasa. Cuando se ha utilizado Avicel como sustrato, dado su carácter insoluble, la suspensión se ha filtrado a presión mediante un microfiltro (Sartorius, No. 481), de tamaño de poro 0,45 μm . Las

Tabla 3.4

Condiciones más usuales encontradas en bibliografía para la medida de la actividad de las celulasas (1 mg de cultivo).

Sustrato	C_S	t_i (h)	Celulasas	Refer.
Papel de filtro	0,33%	1,0	T. reesei	Mandels y col. (1976)
Avicel	10 g/l	1,0	Acetivibrio cellulolyticus	Saddler y Khan (1981)
CMC	0,5%	0,5	T. reesei	Mandels y col. (1976)
CMC	0,5%		β -1,4-glucosidasa	Sternberg (1976)
CMC	10 g/l	0,5	Acetivibrio cellulolyticus	Saddler y Khan (1981)
Celobiosa	2,57 g/l	0,5	T. reesei	Mandels y col. (1976)
Celobiosa	2,57 g/l	0,5	β -1,4-glucosidasa	Sternberg (1976)
Celobiosa	10 g/l	0,5	Acetivibrio cellulolyticus	Saddler y Khan (1981)

actividades obtenidas en estos ensayos, expresadas en unidades internacionales (UI), se muestran en la tabla 3.5. La UI se define como los μ moles/min de glucosa o μ moles de azúcares reductores/min, expresados como glucosa equivalente, liberados por la enzima.



Tabla 3.5

Medidas de actividad de las celulasas de Trichodema viride (Sigma C-8758). pH = 4,9 y 40°C.

Sustrato	C_{Si} (g/l)	C_{Eo} (mg/l)	t_i (h)	Actividad (UI/mg)
CMC	5,00	64,0	0,5	2,61
celulosa microcristalina	3,30	100,0	1,0	0,13
celobiosa	2,57	100,0	0,5	0,13

3.3. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE OPERACION SOBRE LA ACTIVIDAD CELULOLITICA

Las enzimas son proteínas globulares que pueden sufrir cambios en su estructura y por tanto pérdida de actividad catalítica; los cambios estructurales pueden estar originados por agentes físicos, como la temperatura, o químicos, como variaciones del pH y/o modificaciones de la fuerza iónica de la disolución. En este trabajo se han realizado experimentos destinados a determinar la posible pérdida de actividad de las celulasas debido, por un lado, a la prolongada permanencia de éstas en las condiciones de operación utilizadas (pH = 4,9 y 40°C) y la presencia de Na₂SO₄ por otro.

Para comprobar la influencia del tiempo de permanencia a pH = 4,9 y 40°C de temperatura sobre la actividad enzimática, se han utilizado disoluciones de enzima comprendidas entre 0,35 y 5 g/l en tampón de CH₃COONa 0,1 M y pH = 4,9. Estas disoluciones se han mantenido en las condiciones de operación durante distintos periodos de tiempo; a intervalos regulares se han tomado 0,2 ml de estas disoluciones y se han añadido sobre 2 ml de disolución de CMC de 10 g/l; esta mezcla se incubó durante 10 minutos a 40°C en tubos de ensayo; a continuación se detiene la reacción introduciendo los tubos de ensayo en agua hirviendo. Posteriormente se determinan las concentraciones de azúcares reductores liberados. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.6; en ella se observa que la actividad enzimática permanece prácticamente constante en las condiciones de operación ensayadas hasta tiempos de 96 h, ya que las desviaciones encontradas están dentro de los errores experimentales. Este resultado parece indicar que la enzima no ha sufrido desnaturalización por efecto de la temperatura y del pH utilizados.

Tabla 3.6

Influencia del tiempo de permanencia del complejo celulolítico del T. viride a 40°C y pH = 4,9 sobre la actividad enzimática. Medidas de actividad: $C_{Si} = 9,09$ g/l y $t_i = 10$ min.

C_{Eo} (mg/l)	C_A (mg/l)				
	31,8	40,9	50,0	54,5	454,5
t (h)					
0,08				398	
0,10			369		
0,12	281				
0,17					2173
0,58	289		378		
1,00		331	377	402	
1,50	284		383		
2,00	295		375	409	
2,50	296		377		
3,00	299			395	
4,00				402	
5,00		346		399	
7,00		342			
12,50		331			
14,00		341			
15,00		343			
24,00					1779
49,00					1824
96,00					2048

También se ha comprobado la posible influencia de la fuerza iónica, debida a concentraciones crecientes de Na_2SO_4 , sobre la actividad celulolítica. Para ello se han realizado una serie de experimentos en tubos de ensayo en los que se han puesto en contacto 2 ml de disolución de CMC de 4,44 g/l y 0,2 ml de disolución de enzima de 0,22 g/l; el tiempo de reacción ha sido de una hora. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.7; en ella se observa que concentraciones crecientes de Na_2SO_4 no ejercen un efecto apreciable sobre las cantidades de azúcares reductores y glucosa liberados.

Tabla 3.7

Influencia de la fuerza iónica sobre la actividad enzimática de las celulasas de T. viride, pH = 4,9 y 40°C.

$$C_{Si} = 4,036 \text{ g/l}$$

$$C_{Eo} = 20,0 \text{ mg/l}$$

$$t_i = 1 \text{ h}$$

[Na ₂ SO ₄] (g/l)	C _A (mg/l)	C _G (mg/l)
0	795	183
44,44	828	181
62,22	824	182
80,00	826	178
88,89	831	177

3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.4.1. Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa

El sustrato utilizado ha sido carboximetilcelulosa (CMC) de baja viscosidad, Sigma C-8758, y el complejo celulolítico, celulasas de T. viride cuya caracterización ya ha sido descrita.

Los experimentos se han realizado en tubos de ensayo de 1 cm de diámetro interno y 15 ml de capacidad. En todos los casos la mezcla reaccionante ha estado formada por 2 ml de disolución de CMC de distintas concentraciones (1,2; 2,0; 3,0; 5,0; 10,0; 20,0 y 25,0 g/l) y 0,2 ml de la disolución de enzima (50 mg/l a 4 g/l), mantenidas ambas a pH = 4,9 con tampón 0,1 M en CH₃COONa. Estas muestras se han incubado en un baño termostaticado a 40°C durante tiempos de hidrólisis no superiores a 15 h. La reacción se detiene introduciendo los tubos de ensayo en un baño de agua hirviendo para desnaturalizar la enzima. A continuación se añaden 3 ml de reactivo DNS y la muestra se mantiene durante 15 min en agua hirviendo, se deja enfriar a temperatura ambiente y se mide su absorbancia a 640 nm frente a un blanco compuesto por 2 ml de disolución de CMC, 0,2 ml de tampón y 3 ml de reactivo DNS, que ha sido sometido a los mismos tratamientos que la disolución problema.

Los resultados experimentales obtenidos se muestran en las tablas 4.1 a 4.15. Las tablas 4.1 a 4.7 corresponden al estudio de la variable que representa la intensidad del tratamiento enzimático ($C_{E_0}t$); la tabla 4.8 a los experimentos de hidrólisis total y, finalmente, las tablas 4.9 a 4.15 muestran los resultados obtenidos en los experimentos cinéticos propiamente dichos.

3.4.2. Pretratamientos e hidrólisis enzimática de celulosa.

3.4.2.1. Pretratamientos

Se ha estudiado la influencia que distintos disolventes y/o agentes de "swelling" de la celulosa tienen sobre la hidrólisis enzimática de una celulosa microcristalina (Merck 2330) con celulasas del T. viride (Sigma 2274).

Los disolventes y/o agentes de "swelling" utilizados han sido H_2SO_4 del 70% en peso, una disolución alcalina del complejo Fe (III) - tartrato sódico (FeTNa), NaOH 1,5 M y el complejo Zn (II) - etilendiamina (zincocoxen).

El FeTNa se ha preparado según el procedimiento propuesto por Hamilton y col. (1984). Para ello 253,1 g de tartrato sódico dihidratado se disuelven calentando en 400 ml de agua; posteriormente esta disolución se enfría a temperatura ambiente. Al mismo tiempo se disuelven en un matraz 81,1 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ en 160 ml de agua; a continuación se mezclan ambas disoluciones agitando vigorosamente durante 30 min y protegiéndolas de la luz. La disolución resultante se refrigera en un baño de hielo hasta una temperatura de 10 - 15°C y se le añade lentamente una disolución de NaOH (98 g de NaOH/ 200 ml de agua) procurando que la temperatura no exceda de 15°C. La disolución resultante se transfiere a un matraz de un litro en el cual se han puesto 50 g de Na_2SO_3 ; una vez disuelto éste, se ajusta el volumen a un litro. Si en este punto aparece un precipitado de $Fe(OH)_3$ se filtra y se retira. La disolución resultante tiene la siguiente composición en peso: 6,5% en $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 20,4% en tartrato sódico dihidratado, 7,9% en NaOH y 4,0% en Na_2SO_3 .

Para la preparación del zincoxen se toman 18,2 g de $Zn(OH)_2$ y se disuelven en 100 ml de una disolución de ácido acético del 22%. A continuación se agregan 18 ml de etilendiamina del 98% y se agita intensamente hasta la aparición de un color amarillento (30 - 60 min). La disolución resultante contiene el 5,5% de Zn (II) (como hidróxido) y el 32,0% de etilendiamina.

En todos los casos el pretratamiento se ha realizado en un reactor de 250 ml, a temperatura ambiente (25 - 30°C) y agitando a 300 rpm. Las relaciones volumen de disolvente/masa de sustrato, D/S, los tiempos de pretratamiento, t_p , y el agente utilizado para reprecipitar la celulosa disuelta se indican en la tabla 3.8. La cantidad de celulosa inicial ha sido, en todos los casos, de 5 g, excepto en los pretratamientos numerados del 8 al 10 en los que se han utilizado 3 g.

En los pretratamientos realizados con los agentes alcalinos (FeTNa, zincoxen y NaOH 1,5 M), la acción de éstos se detiene añadiendo un volumen de CH_3COOH (cuya concentración se indica en la tabla 3.8) igual al volumen de disolvente (o agente de "swelling"); posteriormente se ajusta a $pH \approx 5$ mediante la adición gota a gota de la disolución de CH_3COOH ; la mezcla se agita hasta homogeneización y a continuación se centrifuga a 8000 rpm durante 30 min. Una vez decantada la fase líquida, se somete el sustrato a una serie de lavados hasta la desaparición del color. Estos lavados consisten en una agitación intensa con agua durante aproximadamente 15 min, seguida de una centrifugación a 8000 rpm durante 20 min.

El sustrato pretratado con H_2SO_4 del 70% y posteriormente reprecipitado con metanol (1 vol de metanol: 1 vol de H_2SO_4 del 70%) se centrifuga a 8000 rpm durante 30 min y se lava repetidas veces con una

Tabla 3.8

Pretratamientos realizados y condiciones de operación; 300 rpm y temperatura ambiente (25-30°C).

Nº	Agente	D/S (ml/g)	t _p (h)	Agente precipitante	Sustrato recuperado, %
1	zincoxen	5	6	CH ₃ COOH 1,0M	100
2	zincoxen	20	6	CH ₃ COOH 1,0M	100
3	NaOH 1,5M	5	6	CH ₃ COOH 1,3M	100
4	NaOH 1,5M	20	6	CH ₃ COOH 1,3M	100
5	FeTNa	5	6	CH ₃ COOH 1,3M	96,0
6	FeTNa	20	6	CH ₃ COOH 1,3M	96,0
7	H ₂ SO ₄ 70%	5	1	metanol	44,0
8	H ₂ SO ₄ 70%	2	6	NaOH (1)	-
9	H ₂ SO ₄ 70%	2	3	NaOH (1)	-
10	H ₂ SO ₄ 70%	1	6	NaOH (1)	-

(1) Agente neutralizante.

disolución débilmente básica (con agitación seguida de una centrifugación) hasta $\text{pH} \approx 5,0$ en las aguas de lavado. El sustrato reprecipitado y lavado se destina bien a hidrólisis enzimática o bien se lleva a sequedad total para estimar la cantidad de celulosa recuperada tras las operaciones de pretratamiento y lavado; las cantidades medias recuperadas se indican en la tabla 3.8. El secado se realiza en una estufa de vacío a 50 mm de Hg y 50°C , hasta pesada constante, que se alcanza aproximadamente a las 12 h. Los resultados obtenidos (tabla 3.8) indican que existen pérdidas de celulosa del orden del 56%. Este sustrato, que no reprecipita al añadir metanol, queda en disolución como sacáridos de pequeño grado de polimerización, lo que indica que existe una hidrólisis ácida.

Con el fin de aprovechar la acción hidrolítica del H_2SO_4 del 70% se han realizado otros experimentos en los que se ha variado la relación D/S y el tiempo de pretratamiento y, a diferencia de los ensayos anteriores, el H_2SO_4 ha sido neutralizado con NaOH hasta $\text{pH} 5,0$, llevando directamente la suspensión a hidrólisis enzimática; es decir, se han eliminado las etapas de centrifugación y lavado. Este sustrato contiene azúcares provenientes de la acción hidrolítica del ácido y Na_2SO_4 cuya influencia sobre los métodos analíticos y sobre la actividad ya ha sido descrita.

3.4.2.2. Hidrólisis enzimática

Los sustratos obtenidos después de cada pretratamiento se arrastran con tampón de CH_3COONa 0,1 M, $\text{pH} 4,9$, a un reactor encamisado de 250 ml, y la hidrólisis enzimática se lleva a cabo con celulasas de T. viride, manteniendo constante en todos los experimentos la relación enzima/sustrato ($\text{E/S} = 2 \text{ mg/g}$), el pH , el grado de agitación y la temperatura ($4,9$; 300 rpm y 40°C res-

pectivamente). En todos los experimentos, antes de añadir la enzima, se toma una muestra de 6 ml para la determinación de los azúcares reductores y glucosa liberados en el pretratamiento previo; estas muestras se centrifugan a 3000 rpm y tras decantar, la fase sólida se devuelve al reactor. Después se añade la enzima, se ajusta el volumen a 200 ml y se inicia la hidrólisis enzimática; para seguir la cinética se toman muestras de 3 ml a intervalos regulares de tiempo en las que, después de centrifugar y desnaturalizar la enzima, se determinan azúcares reductores y glucosa.

Para comparar los incrementos obtenidos en la velocidad de hidrólisis después de los distintos pretratamientos, se ha realizado la hidrólisis enzimática de celulosa microcristalina sin pretratar; la cantidad de celulosa inicial ha sido de 5 g y las condiciones utilizadas idénticas a las descritas anteriormente.

Los resultados experimentales se muestran en las tablas 4.16 a 4.26.

3.4.3. Hidrólisis ácida de celulosa

Se ha realizado la hidrólisis ácida de celulosa microcristalina (Avicel, Merck 2330) con H_2SO_4 de diferentes concentraciones (31,0; 45,0; 58,5; 62,0; 65,0 y 70,0% en peso), a las temperaturas de 25, 30, 35 y 40°C y con las relaciones volumen de ácido/masa de celulosa, D/S, de 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 y 5,0 ml/g.

En todos los experimentos se toma 1 g de celulosa, se deposita en un vaso de precipitados de 100 ml y se introduce en un baño termostatzado a la temperatura deseada. Paralelamente se introduce en este baño un volumen de H_2SO_4 de la concentración deseada. Una vez ambas sustancias se encuentran a la temperatura de trabajo, se toma un volumen definido de H_2SO_4 y se mezcla intensamente con la celulosa, permaneciendo esta mezcla termostatzada y en reposo durante el tiempo de pretratamiento deseado. En todos los casos la reacción se detiene neutralizando el ácido con una disolución 1,3 M de NaOH. La suspensión resultante, de volumen conocido, se agita intensamente durante 15 min y a continuación se toma una muestra que se centrifuga a 3000 rpm durante 15 min; en ésta se determinan las concentraciones de azúcares reductores (expresados como glucosa equivalente) y de glucosa.

Los resultados experimentales obtenidos en estos ensayos se muestran en las tablas 4.27 a 4.32.

Por otra parte, el sustrato prehidrolizado a 40°C, 6 h y D/S = 3 ml/g se ha sometido a hidrólisis enzimática con celulasas de T. viride. Para ello se ha neutralizado con NaOH 1,3 M hasta $pH \approx 5,0$ y a continuación se arrastra la suspensión con tampón de CH_3COONa 0,1 M ($pH = 4,9$) hasta un reactor encamisado de 250 ml; para determinar la glucosa liberada en la hidrólisis

ácida se toman 2 ml de muestra que se centrifugan a 3000 rpm durante 15 min para separar la fase líquida de la fase sólida, la cual se devuelve al reactor.

Una vez la suspensión se encuentra en las condiciones requeridas para la hidrólisis enzimática, pH=4,9 y 40°C, se adiciona la enzima en distintas proporciones (5, 10 y 30 mg de enzima/g de sustrato), se ajusta el volumen a 200 ml y se comienza la hidrólisis. El proceso se sigue tomando muestras de 2 ml a intervalos regulares de tiempo, en las que se analiza la cantidad de glucosa liberada. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.33.

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1. HIDROLISIS ENZIMATICA DE CARBOXIMETILCELULOSA

En los experimentos descritos en el apartado 3.3 de esta memoria se comprobó que no se produce desnaturalización del complejo enzimático en las condiciones de operación ensayadas. Con objeto de utilizar $C_{Eo}t$ como única variable de la intensidad de tratamiento enzimático se programaron experimentos con el fin comprobar si la enzima sufre desactivación durante el proceso de hidrólisis.

Los resultados de estos experimentos se muestran en las tablas 4.1 a 4.7; el producto $C_{Eo}t$ se ha mantenido constante en cada uno de ellos, variándose de unos a otros $C_{Eo}t$ y/o la concentración de sustrato C_{Si} .

Según el procedimiento experimental descrito en el apartado 3.4.1 de este trabajo, el valor de $C_{Eo}t$ se ha calculado mediante

$$C_{Eo}t = \frac{\left[\begin{array}{l} \text{concentración de enzima en la} \\ \text{disolución de partida (mg/l)} \end{array} \right] 0,2(\text{ml})}{2,2(\text{ml})} t(\text{min}) \quad [4.1]$$

análogamente el valor de la concentración inicial de sustrato en la disolución de hidrólisis, C_{Si} , es

$$C_{Si} = \frac{\left[\begin{array}{l} \text{concentración de sustrato en la} \\ \text{disolución de partida (g/l)} \end{array} \right] 2,0(\text{ml})}{2,2(\text{ml})} \quad [4.2]$$

En cada una de las tablas 4.1 a 4.7 se muestran las concentraciones iniciales de sustrato, C_{Si} , el producto $C_{Eo}t$, el tiempo de hidrólisis, t , y las concentraciones de azúcares reductores, C_A .

Por otra parte, para expresar la concentración inicial de sustrato como glucosa potencial, se ha realizado la hidrólisis total de CMC; los resultados experimentales se muestran en la tabla 4.8. En ella se observa que las concentraciones de azúcares reductores, expresados como glucosa equivalente, permanecen prácticamente constantes para tiempos de hidrólisis iguales o superiores a las 12 horas.

Tomando para C_A la media aritmética de los cuatro últimos experimentos (444 mg/l) y teniendo en cuenta que la concentración inicial de CMC es 1,818 g/l, se obtiene que la concentración de enlaces hidrolizables, C_{So} , puede calcularse según la ecuación

$$C_{So} = \frac{0,444 \text{ (g/l)}}{1,818 \text{ (g/l)}} C_{Si} \text{ (g/l)} \quad [4.3]$$

En la tabla siguiente se muestran las concentraciones de enlaces hidrolizables correspondientes a cada una de las concentraciones de CMC utilizadas

C_{Si} (g/l)	C_{So} (mg/l)
1,091	226
1,818	444
2,727	666
4,545	1110
9,090	2220
18,182	4440
22,727	5550

En las tablas 4.9 a 4.15 se indican las concentraciones de azúcares reductores liberados, C_A , durante la hidrólisis de CMC para valores de $C_{E0} t$ crecientes; en cada una de ellas se muestra la concentración inicial de sustrato, C_{S0} , y los tiempos de hidrólisis utilizados, t .

Tabla 4.1

Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa: variación de la concentración de azúcares reductores con el tiempo de hidrólisis para $C_{Eo}t$ constante, pH = 4,9 y 40°C.

$$C_{Si} = 4,545 \text{ g/l}$$

$$C_{Eo}t = 454,5 \text{ mg.min/l}$$

t (min)	C_A (mg/l)
9,1	269
10,0	261
12,5	259
14,3	248
16,7	256
20,0	256
25,0	249
33,3	243
50,0	234
66,7	234

Tabla 4.2

Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa: variación de la concentración de azúcares reductores con el tiempo de hidrólisis para $C_{Eo}t$ constante, pH=4,9 y 40°C.

$$C_{Si} = 9,091 \text{ g/l}$$

$$C_{Eo}t = 454,5 \text{ mg.min/l}$$

t (min)	C_A (mg/l)
10,0	381
16,7	358
25,0	349
33,3	344
50,0	340
66,7	344

Tabla 4.3

Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa: variación de la concentración de azúcares reductores con el tiempo de hidrólisis para $C_{E_0}t$ constante, pH=4,9 y 40°C.

$$C_{Si} = 18,182 \text{ g/l}$$
$$C_{E_0}t = 454,5 \text{ mg.min/l}$$

t (min)	C_A (mg/l)
9,1	513
10,0	507
12,5	500
20,0	486
25,0	471
33,3	466
50,0	469
66,7	470

Tabla 4.4

Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa: variación de la concentración de azúcares reductores con el tiempo de hidrólisis para $C_{E_0}t$ constante, pH=4,9 y 40°C.

$$C_{Si} = 1,818 \text{ g/l}$$

$$C_{E_0}t = 1818,2 \text{ mg.min/l}$$

t (min)	C_A (mg/l)
10,0	292
33,3	218
50,0	205
66,7	204
100,0	197
133,3	190
200,0	187
266,7	188

Tabla 4.5

Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa: variación de la concentración de azúcares reductores con el tiempo de hidrólisis para $C_{Eo}t$ constante, pH=4,9 y 40°C.

$$C_{Si} = 4,545 \text{ g/l}$$

$$C_{Eo}t = 1818,2 \text{ mg.min/l}$$

t (min)	C_A (mg/l)
10,0	502
20,0	449
30,7	442
50,0	424
80,0	420
100,0	417
200,0	412
266,7	416

Tabla 4.6

Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa: variación de la concentración de azúcares reductores con el tiempo de hidrólisis para $C_{Eo}t$ constante, pH=4,9 y 40°C.

$$C_{Si} = 1,818 \text{ g/l}$$

$$C_{Eo}t = 10909,1 \text{ mg.min/l}$$

t (min)	C_A (mg/l)
60,0	365
80,0	344
120,0	327
133,3	309
150,0	310
200,0	306
240,0	300
300,0	290

Tabla 4.7

Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa: variación de la concentración de azúcares reductores con el tiempo de hidrólisis para $C_{E_0}t$ constante, pH=4,9 y 40°C.

$$C_{Si} = 4,545 \text{ g/l}$$

$$C_{E_0}t = 10909,1 \text{ mg.min/l}$$

t (min)	C_A (mg/l)
30	1010
50	869
80	810
100	775
200	773

Tabla 4.8

Hidrólisis total de carboximetilcelulosa.

$$C_{Si} = 1,818 \text{ g/l}$$

$$C_{Eo} = 181,8 \text{ mg/l}$$

t (h)	C_A (mg/l)
1,00	358
2,23	365
4,00	390
5,00	409
6,00	416
7,00	414
8,00	432
12,07	442
13,00	447
14,00	444
15,00	443

Tabla 4.9

Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa:
 variación de la concentración de azúcares reductores
 con $C_{Eo}t$, pH = 4,9 y 40°C.

$$C_{So} = 266 \text{ mg/l}$$

t (min)	$C_{Eo}t$ (mg.min/l)	C_A (mg/l)
150	682	82
160	727	91
160	1091	108
160	1455	119
180	1636	126
150	2727	136
160	4364	155
180	4909	169
160	5818	164
180	6454	178
160	7273	176
160	8727	187
160	9818	198

Tabla 4.10

Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa:
 variación de la concentración de azúcares reductores
 con $C_{Eo}t$, pH = 4,9 y 40°C.

$$C_{So} = 444 \text{ mg/l}$$

t (min)	$C_{Eo}t$ (mg.min/l)	C_A (mg/l)
150	682	141
160	1091	171
180	1636	198
150	2727	221
150	4090	248
150	5455	263
180	6545	274
170	7727	292
160	8727	296
180	9818	300

Tabla 4.11

Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa:
 variación de la concentración de azúcares reductores
 con $C_{Eo}t$, pH = 4,9 y 40°C.

$$C_{So} = 666 \text{ mg/l}$$

t (min)	$C_{Eo}t$ (mg.min/l)	C_A (mg/l)
150	682	200
160	1091	247
180	1636	283
150	2727	322
150	4091	359
150	5455	385
180	6545	403
170	7727	414
160	8727	425
180	9818	442

Tabla 4.12

Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa:
 variación de la concentración de azúcares reductores
 con $C_{Eo} t$, pH = 4,9 y 40°C.

$$C_{So} = 1110 \text{ mg/l}$$

t (min)	$C_{Eo} t$ (mg.min/l)	C_A (mg/l)
60	409	212
60	818	308
60	1364	388
60	1636	410
60	1909	437
60	2182	458
60	2455	470
60	2727	491
60	3000	504
60	3273	517
60	3546	534
60	3818	547
60	4364	584
60	4909	588
60	5455	584
60	6546	634
60	8182	638
60	8727	671

Tabla 4.13

Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa:
 variación de la concentración de azúcares reductores
 con $C_{Eo}t$, pH = 4,9 y 40°C.

$$C_{So} = 2220 \text{ mg/l}$$

t (min)	$C_{Eo}t$ (mg.min/l)	C_A (mg/l)
20	136	143
40	273	223
30	409	298
40	545	354
60	818	429
30	1091	533
40	1455	628
50	1818	672
60	2182	707
70	3182	839
60	4364	910
60	5455	991
75	6818	1083
60	8182	1138
60	10909	1177

Tabla 4.14

Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa:
 variación de la concentración de azúcares reductores
 con $C_{Eo}t$, pH = 4,9 y 40°C.

$$C_{So} = 4440 \text{ mg/l}$$

t (min)	$C_{Eo}t$ (mg.min/l)	C_A (mg/l)
30	273	357
40	364	430
50	455	493
30	545	543
47	641	603
40	727	627
60	818	672
40	1091	782
40	1818	901
70	3182	1311
60	4364	1556
80	5818	1695
80	7273	1825
70	9545	2002
60	10909	2080

Tabla 4.15

Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa: variación de la concentración de azúcares reductores con $C_{Eo}t$, pH = 4,9 y 40°C.

$$C_{So} = 5550 \text{ mg/l}$$

t (min)	$C_{Eo}t$ (mg.min/l)	C_A (mg/l)
50	227	315
60	545	571
60	1091	873
60	1636	1021
70	2545	1294
80	3636	1469
90	4909	1737
90	6546	1953
90	8182	2141
60	10909	2366

4.2. HIDROLISIS ENZIMATICA DE CELULOSA PRETRATADA

En la tabla 3.8 se indican los pretratamientos a que ha sido sometida la celulosa microcristalina; para comparar la efectividad de los distintos pretratamientos se ha sometido a los sustratos obtenidos a una hidrólisis enzimática con celulasas de T. viride.

En las tablas 4.16 a 4.23 se muestran las conversiones de celulosa a azúcares reductores y glucosa (en mg/g), en función del tiempo de hidrólisis, correspondientes a aquellos experimentos realizados con celulosa reprecipitada. En las tablas 4.24, 4.25 y 4.26 se muestran los resultados obtenidos con los sustratos pretratados con H_2SO_4 del 70% en los que no se han retirado los sacáridos producidos por la acción hidrolítica del ácido.

En cada una de las tablas se indica el pretratamiento realizado, la cantidad inicial de celulosa, S_i , la relación enzima/sustrato, E/S, y las cantidades iniciales de azúcares reductores totales, A_o , y de glucosa, G_o .

Tabla 4.16

Hidrólisis enzimática de celulosa microcristalina
sin pretratar, pH = 4,9 y 40°C.

$$S_i = 5 \text{ g}$$
$$E/S = 2 \text{ mg/g}$$
$$A_o = G_o = 0$$

t (h)	X_A (mg/g)	X_G (mg/g)
1	2,5	0,7
2	4,1	1,5
3	5,6	2,1
4	7,2	2,5
6	8,6	3,7
8	9,6	4,5
10	10,4	5,2

Tabla 4.17

Hidrólisis enzimática (pH = 4,9 y 40°C) de celulosa pretratada con zincoxen, D/S = 5 ml/g y $t_p = 6$ h.

$$S_i = 5 \text{ g}$$

$$E/S = 2 \text{ mg/g}$$

$$A_o = G_o = 0$$

t (h)	X_A (mg/g)	X_G (mg/g)
1	6,4	0,8
2	9,9	1,4
3	10,7	2,2
4	12,6	2,5
6	14,8	3,9
8	17,0	5,0
10	19,2	6,1

Tabla 4.18

Hidrólisis enzimática (pH = 4,9 y 40°C) de celulosa pretratada con zincoxen, D/S = 20 ml/g y $t_p = 6$ h.

$$S_i = 5 \text{ g}$$

$$E/S = 2 \text{ mg/g}$$

$$A_o = G_o = 0$$

t (h)	X_A (mg/g)	X_G (mg/g)
1	6,7	0,7
2	8,8	1,3
3	11,1	1,9
4	13,2	2,4
6	14,7	3,6
8	16,9	4,7
10	18,6	5,7

Tabla 4.19

Hidrólisis enzimática (pH = 4,9 y 40°C) de celulosa pretratada con NaOH 1,5M, D/S = 5 ml/g y $t_p = 6$ h.

$$S_i = 5 \text{ g}$$
$$E/S = 2 \text{ mg/g}$$
$$A_o = G_o = 0$$

t (h)	X_A (mg/g)	X_G (mg/g)
1	8,0	1,4
2	12,0	2,5
3	14,2	3,5
4	15,6	4,2
6	19,1	6,1
8	23,8	7,6
10	26,5	9,0

Tabla 4.20

Hidrólisis enzimática (pH = 4,9 y 40°C) de celulosa pretratada con NaOH 1,5M, D/S = 20 ml/g y $t_p = 6$ h.

$$S_i = 5 \text{ g}$$
$$E/S = 2 \text{ mg/g}$$
$$A_o = G_o = 0$$

t(h)	X_A (mg/g)	X_G (mg/g)
1	10,1	1,8
2	12,8	2,6
3	17,3	3,5
4	17,9	4,6
6	21,2	6,2
8	24,8	7,7
10	25,8	9,2

Tabla 4.21

Hidrólisis enzimática (pH = 4,9 y 40°C) de celulosa pretratada con FeTNa, D/S = 5 ml/g y $t_p = 6$ h.

$$S_i = 4,8 \text{ g}$$

$$E/S = 2 \text{ mg/g}$$

$$A_o = G_o = 0$$

t (h)	X_A (mg/g)	X_G (mg/g)
1	12,4	2,1
2	17,1	3,7
3	22,1	5,1
4	26,6	6,6
6	33,9	8,9
8	37,3	11,0
10	42,0	13,1

Tabla 4.22

Hidrólisis enzimática (pH = 4,9 y 40°C) de celulosa pretratada con FeTNa, D/S = 20 ml/g y $t_p = 6$ h.

$$S_i = 4,8 \text{ g}$$

$$E/S = 2 \text{ mg/g}$$

$$A_o = 7,7 \text{ mg}$$

$$G_o = 0$$

t (h)	X_A (mg/g)	X_G (mg/g)
1	14,0	2,7
2	23,2	5,2
3	29,7	7,0
4	33,4	9,0
6	45,4	12,5
8	50,9	14,5
10	59,1	18,1

Tabla 4.23

Hidrólisis enzimática (pH = 4,9 y 40°C) de celulosa pretratada con H_2SO_4 del 70%, D/S = 5 ml/g y $t_p = 1$ h.

$$S_i = 2,2 \text{ g}$$

$$E/S = 2 \text{ mg/g}$$

$$A_o = 57,9 \text{ mg}$$

$$G_o = 0,7 \text{ mg}$$

t (h)	X_A (mg/g)	X_G (mg/g)
1	84,3	7,2
2	126,0	13,4
3	153,9	19,0
4	181,9	24,6
6	226,4	35,9
8	249,5	44,7
10	277,8	54,0

Tabla 4.24

Hidrólisis enzimática (pH = 4,9 y 40°C) de celulosa pretratada con H_2SO_4 del 70%, D/S = 2 ml/g y $t_p = 6$ h.

$$S_i = 3 \text{ g}$$

$$E/S = 2 \text{ mg/g}$$

$$A_o = 711,6 \text{ mg}$$

$$G_o = 66,0 \text{ mg}$$

t (h)	A/S _i (mg/g)	X _A (mg/g)	G/S _i (mg/g)	X _G (mg/g)
0	237,2	0	22,0	0
1	305,6	68,4	26,5	4,5
2	322,4	85,2	30,1	8,1
4	359,3	122,1	37,8	15,8
7	376,1	138,9	48,9	26,9
10	402,7	165,5	58,5	36,5

Tabla 4.25

Hidrólisis enzimática (pH = 4,9 y 40°C) de celulosa pretratada con H_2SO_4 del 70%, D/S = 2 mg/g y $t_p = 3$ h.

$$S_i = 3 \text{ g}$$

$$E/S = 2 \text{ mg/g}$$

$$A_o = 540,0 \text{ mg}$$

$$G_o = 33,0 \text{ mg}$$

t (h)	A/S _i (mg/g)	X _A (mg/g)	G/S _i (mg/g)	X _G (mg/g)
0	180,0	0	11,0	0
1	229,8	49,8	-	-
2	253,5	73,5	17,5	6,5
4	276,3	96,3	23,3	12,3
7	293,8	113,8	31,9	20,9
10	313,7	133,7	39,4	28,4

Tabla 4.26

Hidrólisis enzimática (pH = 4,9 y 40°C) de celulosa pretratada con H_2SO_4 del 70%, D/S = 1 ml/g y $t_p = 1$ h.

$$S_i = 3 \text{ g}$$

$$E/S = 2 \text{ ml/g}$$

$$A_o = 240,6 \text{ mg}$$

$$G_o = 23,7 \text{ mg}$$

t(h)	A/S _i (mg/g)	X _A (mg/g)	G/S _i (mg/g)	X _G (mg/g)
0	80,2	0	7,9	0
1	110,0	29,8	13,2	5,3
2	124,7	44,5	16,5	8,6
4	138,1	57,9	23,9	16,0
7	151,8	71,6	32,0	24,1
10	163,4	83,2	38,6	30,7

4.3. HIDROLISIS ACIDA DE LA CELULOSA

En las tablas 4.27 a 4.29 se dan las conversiones obtenidas para los azúcares reductores liberados con el tiempo de hidrólisis; en cada una de ellas se muestra la influencia de una variable (temperatura, concentración de ácido y relación ácido/sustrato, respectivamente) manteniendo las otras dos constantes. En las tablas 4.30 a 4.32 se dan las conversiones de glucosa obtenidas en los experimentos realizados en las mismas condiciones que las descritas para azúcares reductores.



Tabla 4.27

Hidrólisis ácida de celulosa: influencia de la temperatura sobre la conversión a azúcares reductores.

$$D/S = 3 \text{ ml/g}$$

$$C_a = 70\%$$

$$S_i = 1 \text{ g}$$

T (°C)	A (mg/g)			
	25	30	35	40
t (h)				
0,25	-	-	137	365
0,50	-	140	414	549
1,00	136	369	547	555
2,00	305	538	557	-
3,00	418	552	581	572
6,00	548	567	602	585
11,50	569	-	-	-
12,00	-	596	582	602
15,00	630	-	-	559
20,00	618	651	592	527

Tabla 4.28

Hidrólisis ácida de celulosa: influencia de la concentración de H_2SO_4 sobre la conversión a azúcares reductores.

D/S = 3 ml/g

T = 40°C

$S_i = 1$ g

C_a (%)	A (mg/g)					
	31,03	45,00	58,50	62,00	65,00	70,00
t (h)						
0,25	-	-	20	-	-	365
0,50	2	-	32	122	-	549
1,00	2	3	53	207	422	555
2,00	-	-	90	-	473	-
3,00	-	12	102	267	492	572
6,00	12	34	121	324	496	585
12,00	-	-	143	-	-	601
13,00	35	88	-	285	-	-
15,00	-	-	154	-	473	559
20,00	82	125	150	286	456	527

Tabla 4.29

Hidrólisis ácida de celulosa: influencia de la relación volumen de ácido/masa de celulosa sobre la conversión a azúcares reductores.

$$C_a = 70\%$$

$$T = 25^\circ\text{C}$$

$$S_i = 1 \text{ g}$$

D/S (ml/g)	A (mg/g)					
	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0	5,0
t (h)						
1,00	-	59	98	136	151	220
2,00	-	132	199	305	371	420
3,00	42	195	296	418	464	509
5,00	-	301	-	-	-	-
6,00	79	-	468	548	530	598
11,50	-	-	-	569	-	-
13,50	121	-	-	-	-	-
15,00	-	-	526	630	635	652
20,00	-	-	545	618	652	672
24,00	125	-	-	-	-	-
30,00	-	-	605	-	-	764
62,00	-	-	641	-	-	748

Tabla 4.30

Hidrólisis ácida de celulosa: influencia de la temperatura sobre la conversión a glucosa.

$D/S = 3 \text{ ml/g}$

$C_a = 70\%$

$S_i = 1 \text{ g}$

G (mg/g)

T (°C)	25	30	35	40
t (h)				
0,25	-	-	8	24
0,50	-	7	25	63
1,00	8	20	57	131
2,00	18	47	108	-
3,00	26	73	157	225
6,00	44	135	242	294
11,50	97	-	-	-
12,00	-	221	321	318
15,00	140	-	-	284
20,00	157	306	331	252

Tabla 4.31

Hidrólisis ácida de celulosa: influencia de la concentración de H_2SO_4 sobre la conversión a glucosa.

D/S = 3 ml/g

T = 40°C

$S_i = 1$ g

C_a (%)	G (mg/g)					
	31,03	45,00	58,50	62,00	65,00	70,00
t (h)						
0,25	-	-	2	-	-	24
0,50	0	-	3	14	-	63
1,00	0	1	8	37	76	131
2,00	-	-	23	-	143	-
3,00	-	2	33	112	191	225
6,00	3	10	56	154	261	294
12,00	-	-	89	-	-	318
13,00	13	47	-	169	-	-
15,00	-	-	94	-	278	284
20,00	46	78	94	198	244	252

Tabla 4.32

Hidrólisis ácida de celulosa: influencia de la relación volumen de ácido/masa de celulosa sobre la conversión a glucosa.

$$C_a = 70\%$$

$$T = 25^\circ\text{C}$$

$$S_i = 1 \text{ g}$$

D/S (ml/g)	G (mg/g)					
	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0	5,0
t (h)						
1,00	-	5	6	8	9	10
2,00	-	9	12	18	22	27
3,00	4	13	19	26	37	48
5,00	-	21	-	-	-	-
6,00	7	-	41	44	77	107
11,50	-	-	-	97	-	-
13,50	16	-	-	-	-	-
15,00	-	-	77	140	166	199
20,00	-	-	119	157	229	273
24,00	21	-	-	-	-	-
30,00	-	-	142	-	-	336
62,00	-	-	259	-	-	432

4.4. HIDROLISIS ENZIMATICA DE CELULOSA PREHIDROLIZADA CON ACIDO SULFURICO

En la tabla 4.33 se muestran los rendimientos en glucosa obtenidos en la hidrólisis enzimática de un sustrato que ha sido parcialmente hidrolizado mediante H_2SO_4 del 70%. Se han realizado tres series de experimentos en las que se ha variado la relación enzima/sustrato (E/S). En la tabla se indican las condiciones de la prehidrólisis ácida, así como la cantidad inicial de glucosa obtenida, G_0 .

Tabla 4.33

Hidrólisis enzimática (pH = 4,9 y 40°C) de celulosa hidrolizada con H_2SO_4 del 70%; 40°C; D/S = 3 ml/g; 6 h; $S_i = 1$ g.

$$G_o = 306 \text{ mg/g}$$

E/S (mg/g)	X_G (mg/g)		
	5	10	30
t (h)			
1	-	-	30
2	-	-	49
3	13	25	-
7	-	-	64
10	16	-	81
11	-	40	-
24	40	60	96
33	46	76	119
48	53	87	122
57	58	-	-
58	-	103	138
72	62	-	-
73	-	-	144
120	-	134	169
144	-	152	-
168	-	147	-

5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

En esta parte se considerará sucesivamente la interpretación de los experimentos de hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa, sistema homogéneo, y de los experimentos de hidrólisis ácida y enzimática de celulosa microcristalina, Avicel, sistema heterogéneo.

5.1. HIDROLISIS ENZIMATICA DE CARBOXIMETILCELULOSA

En la hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa con celulasas intervienen, como ya se ha indicado, tres enzimas: endoglucanasas, exoglucanasas y β -1,4-glucosidasa, cada una de las cuales determina la aparición de extremos reductores libres según un mecanismo específico, estando sometidas generalmente a inhibición por parte de los principales productos de la hidrólisis: disacáridos y monosacáridos.

Por tanto, la velocidad de aparición de azúcares reductores debe ajustarse a una función del tipo

$$\frac{dC_A}{dt} = f_1(C_S, C_D, C_G, C_{E_1}) + f_2(C_S, C_D, C_G, C_{E_2}) + f_3(C_S, C_D, C_G, C_{E_3}) \quad [5.1]$$

donde C_A es la concentración de azúcares reductores totales liberados, C_S , C_D y C_G son, respectivamente, las concentraciones de sustrato, celobiosa y glucosa y C_{E_1} , C_{E_2} y C_{E_3} las concentraciones de endoglucanasa, exoglucanasa y β -1,4-glucosidasa, respectivamente.

Teniendo en cuenta las formas usualmente admiti-

das para las ecuaciones de velocidad de las reacciones enzimáticas, la ecuación [5.1] se puede transformar en

$$\frac{dC_A}{dt} = g_1 (C_S, C_D, C_G) C_{E_1} + g_2 (C_S, C_D, C_G) C_{E_2} + g_3 (C_S, C_D, C_G) C_{E_3} \quad [5.2]$$

y puesto que C_{E_1} , C_{E_2} y C_{E_3} son una fracción de la concentración de celulasas, C_{E_0} , inicialmente añadida al medio, [5.2] puede expresarse en la forma

$$\frac{dC_A}{dt} = F(C_S, C_D, C_G) C_{E_0} \quad [5.3]$$

Si no existiera desnaturalización de la enzima debido a las condiciones de operación, extremo que ya se ha comprobado (tablas 3.6 y 3.7), ni por su acción hidrolítica, C_{E_0} deberá permanecer constante durante el proceso de hidrólisis y, en consecuencia, la ecuación [5.3] se transforma, separando variables e integrando, en

$$\int_{C_{A_0}}^{C_A} \frac{dC_A}{F(C_S, C_D, C_G)} = C_{E_0} t \quad [5.4]$$

Esta expresión indica que para un valor dado de $C_{E_0} t$ la concentración de azúcares reductores obtenida, C_A , debe ser constante cualesquiera que sean los valores particulares de C_{E_0} y de t , siempre que su producto sea constante y no se produzca desnaturalización debido a la acción hidrolítica de la enzima. Para comprobar esta hipótesis se realizaron los experimentos cuyos resultados se indican en las tablas 4.1 a 4.7 y que se representan en las figuras 5.1 a 5.4; en ellas se observa que las hipótesis contenidas en [5.4] no se cumplen en todo el intervalo de tiempos investigado.

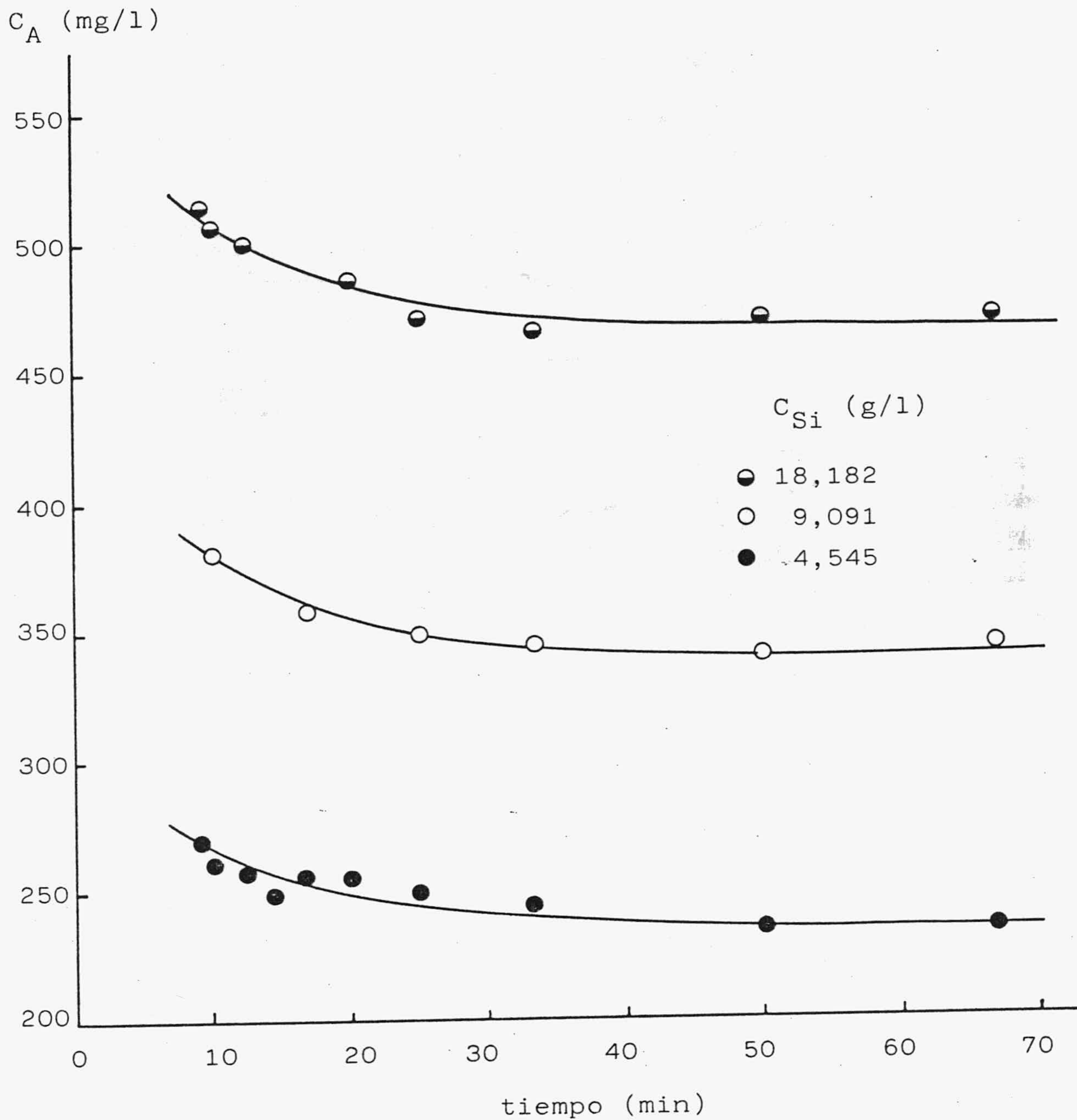


Figura 5.1.- Hidrólisis enzimática de carboximetil celulosa: variación de la concentración de azúcares reductores con el tiempo para $C_{E_0} t = 454,5$ mg.min/l.

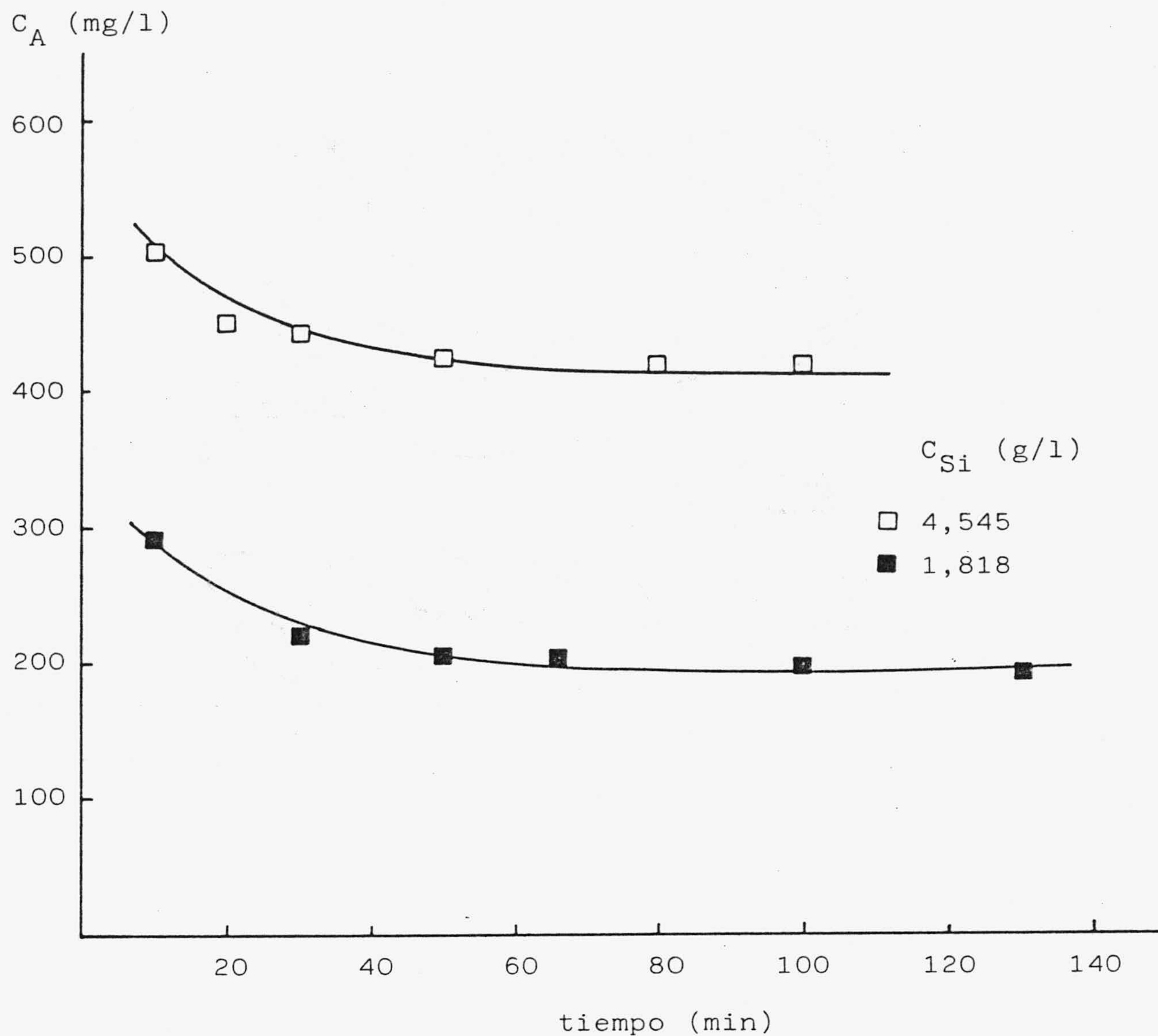


Figura 5.2.- Hidrólisis enzimática de CMC: variación de la concentración de azúcares reductores con el tiempo para $C_{E_0} t = 1818,2 \text{ mg}\cdot\text{min}/\text{l}$.

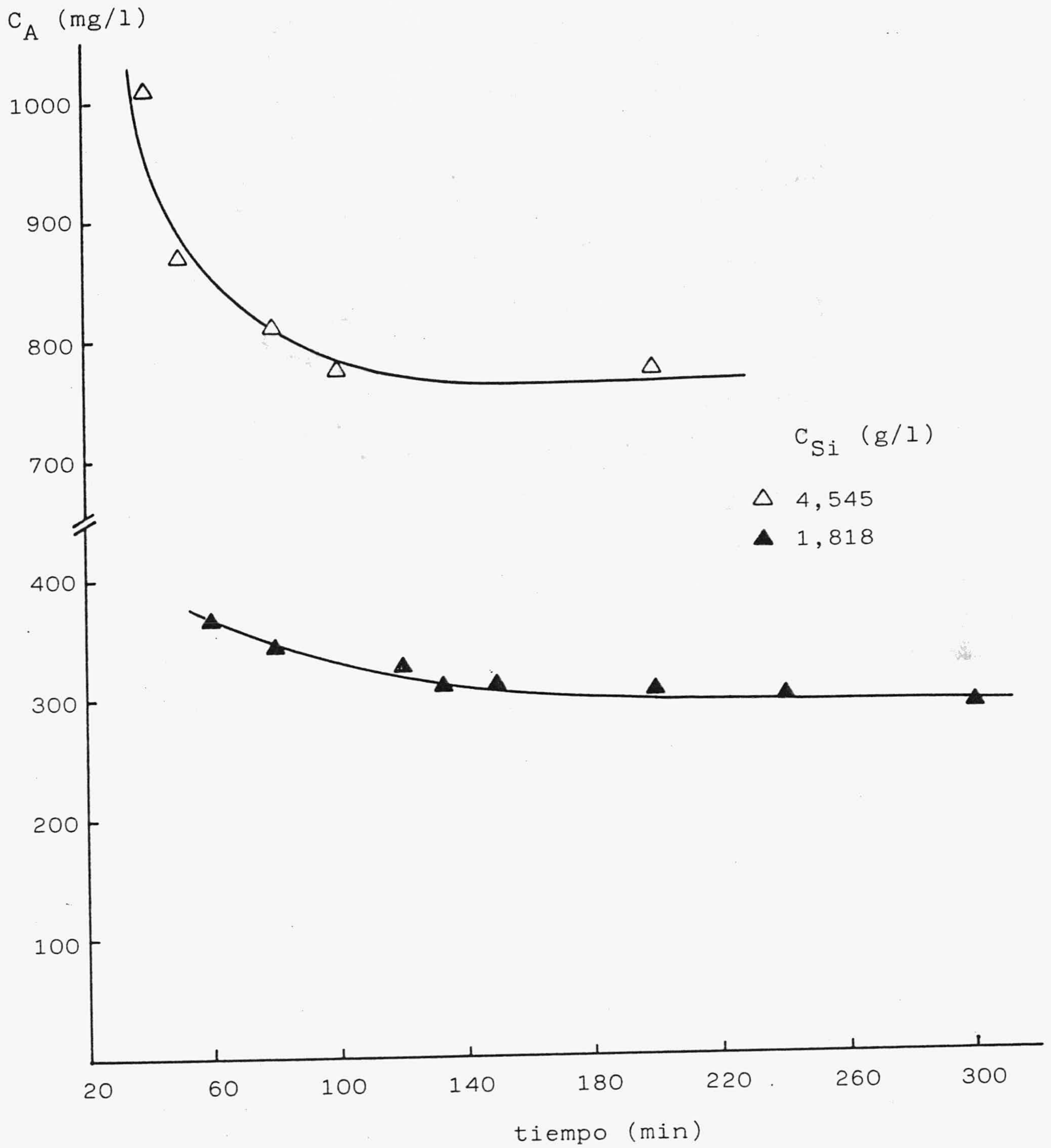


Figura 5.3.- Hidrólisis enzimática de CMC: variación de la concentración de azúcares reductores para $C_{Eo}t = 10909,1$ mg.min/l.

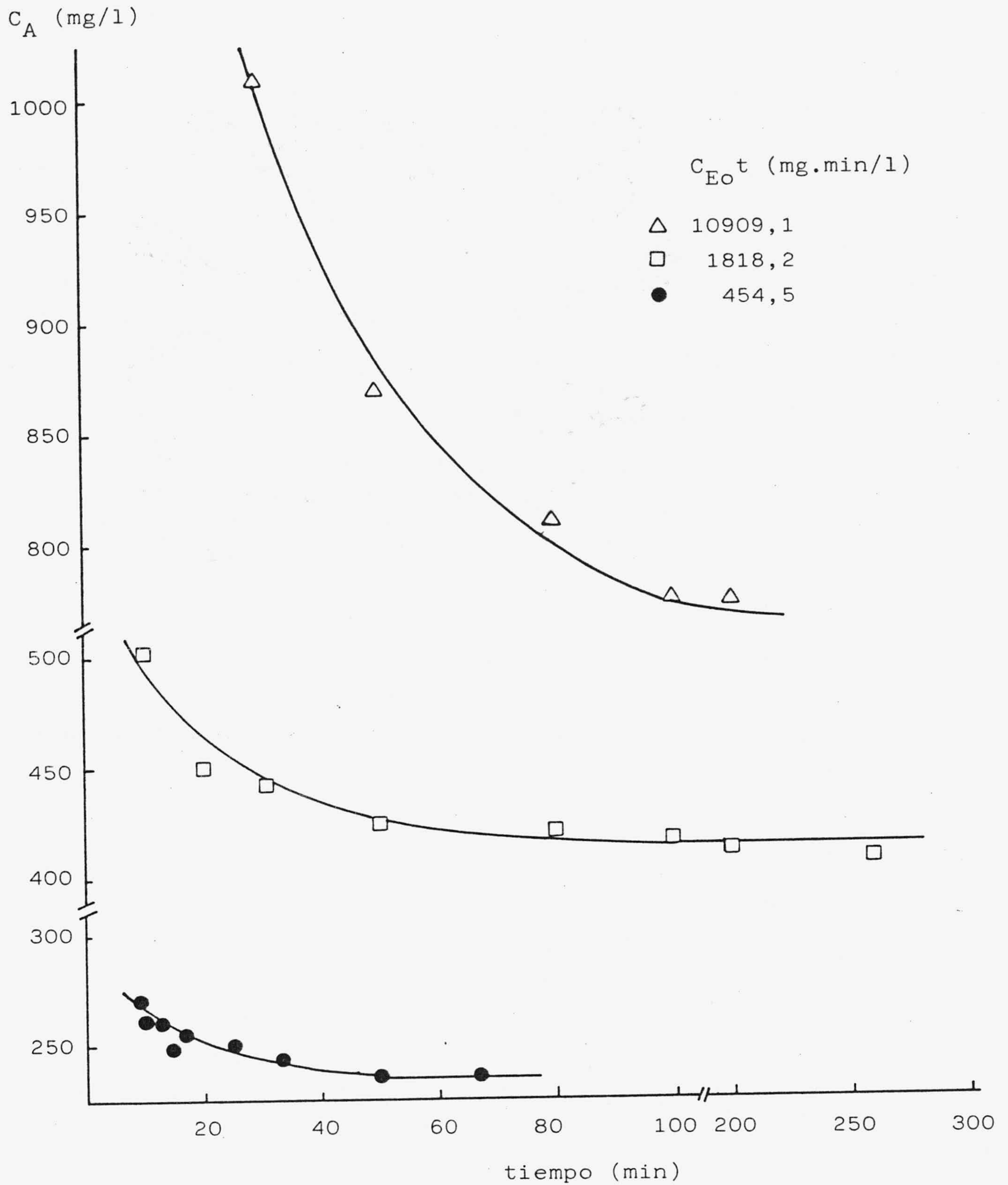


Figura 5.4.- Hidrólisis enzimática de CMC: variación de la concentración de azúcares reductores para valores de $C_{Eo}t$ constantes y $C_{Si} = 4,545$ g/l.

5.1.1. Efecto sinérgico

Las variaciones de C_A con el tiempo para $C_{E_0} t$ constante (figuras 5.1 a 5.4) no indican que exista desactivación de la enzima durante la reacción, ya que no se observa un descenso continuo del valor obtenido para C_A ; además la forma de estas líneas parece indicar que las hipótesis contenidas en la ecuación [5.4] se cumplen a partir de un cierto período inicial de tiempo. En todos los casos se observa que los valores de C_A obtenidos a altas concentraciones de enzima (tiempos pequeños) son superiores a los que prevee la ecuación [5.4]. Sin embargo, para concentraciones pequeñas de enzima (tiempos altos) C_A permanece prácticamente constante.

Este hecho se ha explicado admitiendo la existencia de un posible efecto sinérgico, que es más acusado conforme se incrementa la concentración de enzima y, por tanto, se observa durante un período de tiempo más largo al aumentar el producto $C_{E_0} t$, como indica la figura 5.4, para una misma concentración de sustrato. La existencia de este sinérgismo, probablemente entre E_1 y E_2 , Fujii y col. (1981), Okazaki y Moo-Young (1978), Wood y McCrae (1979), Mandels (1982) y Wheatley y Moo-Young (1977), implicaría la obtención de una cantidad adicional de azúcares reductores debido a la presencia conjunta de ambas enzimas y que, por tanto, sería más apreciable cuanto mayor sea la concentración de las enzimas. De ser cierta esta hipótesis, los datos experimentales representados en las figuras 5.1 a 5.4 permiten calcular el exceso de la concentración de azúcares reductores debida al sinérgismo, para unos valores constantes de C_{S_i} y $C_{E_0} t$, mediante la expresión

$$C_{A_s} = C_A - C_{A_\infty} \quad [5.5]$$



donde C_{As} , C_A y $C_{A\infty}$ representan, respectivamente, las concentraciones de azúcares reductores obtenidas por sinergismo, la total a un tiempo t y la que se obtendría en ausencia de efecto sinérgico, es decir, el valor límite a tiempos altos; las concentraciones $C_{A\infty}$, calculadas como los valores medios de los resultados obtenidos para C_A a tiempos altos ($C_A \approx \text{constante}$), se muestran en la tabla 5.1.

Dado que C_{As} , según la forma de las líneas indicadas en las figuras 5.1 a 5.4, parece disminuir con el tiempo, se han calculado sus valores y se han representado frente a la inversa del tiempo. En las tablas 5.2 a 5.4 se dan los valores de C_{As} frente a $1/t$ y se representan en la figura 5.5; en ella se observa que C_{As} depende de forma importante del producto $C_{E_0}t$, si bien es prácticamente independiente de la concentración inicial de sustrato. En consecuencia parece lógico pensar que la velocidad de aparición de azúcares reductores por efecto sinérgico, dC_{As}/dt , debe ser función de las concentraciones de las enzimas cuya acción hidrolítica se refuerza por su presencia mutua, E_1 y E_2 .

Dado que estas concentraciones no cambian durante cada experimento

$$\frac{dC_{As}}{dt} \approx \frac{C_{As}}{t} = B C_{E_1} C_{E_2} \approx B' C_{E_0}^2 \quad [5.6]$$

donde B y B' son constantes de proporcionalidad. En esta expresión se ha tenido en cuenta que en las expresiones de cinética enzimática ordinarias la velocidad de aparición de productos es de orden uno con respecto a la concentración de enzima. Por tanto $C_{A\infty}$ sería la concentración de azúcares reductores liberados por la acción individual de cada una de las enzimas contenidas en el complejo enzimático, es decir, debida al producto

Tabla 5.1

Efecto sinérgico: valores de $C_{A\infty}$ (concentración de azúcares reductores que se obtendría en ausencia de efecto sinérgico) para los distintos valores de C_{Si} y $C_{Eo}t$ utilizados.

$C_{Eo}t$ (mg.min/l)	C_{Si} (g/l)	$C_{A\infty}$ (mg/l)
454,5	4,545	234
454,5	9,091	344
454,5	18,182	469
1818,2	1,818	193
1818,2	4,545	418
10909,1	1,818	303
10909,1	4,545	774

Tabla 5.2

Efecto sinérgico: valores de C_{As} (concentración de azúcares reductores obtenidos por efecto sinérgico) a distintas concentraciones de sustrato, C_{Si} , en función de $1/t$, para

$$C_{Eo} t = 454,5 \text{ mg.min/l}$$

C_{Si} (g/l)	$(1/t) 10^2$ (min^{-1})	C_{As} (mg/l)
4,545	11,00	35
4,545	10,00	27
4,545	8,00	25
4,545	6,99	14
4,545	5,99	22
4,545	5,00	22
4,545	4,00	15
4,545	3,00	9
9,091	10,00	37
9,091	5,99	14
18,182	11,00	44
18,182	10,00	38
18,182	8,00	31
18,182	5,00	17

Tabla 5.3

Efecto sinérgico: valores de C_{AS} (concentración de azúcares reductores obtenidos por efecto sinérgico) a distintas concentraciones de sustrato, C_{Si} , en función de $1/t$, para

$$C_{Eo} t = 1818,2 \text{ mg}\cdot\text{min}/\text{l}$$

C_{Si} (g/l)	$(1/t) 10^2$ (min^{-1})	C_{AS} (mg/l)
1,818	10,00	99
1,818	3,00	25
1,818	2,00	12
4,545	10,00	84
4,545	5,00	31
4,545	3,26	24

Tabla 5.4

Efecto sinérgico: valores de C_{AS} (concentración de azúcares reductores obtenidos por efecto sinérgico) a distintas concentraciones de sustrato, C_{Si} , en función de $1/t$, para

$$C_{Eo}t = 10909,1 \text{ mg}\cdot\text{min}/\text{l}$$

C_{Si} (g/l)	$(1/t) 10^2$ (min^{-1})	C_{AS} (mg/l)
1,818	1,67	62
1,818	1,25	41
1,818	0,83	24
4,545	3,33	236
4,545	2,00	95
4,545	1,25	36

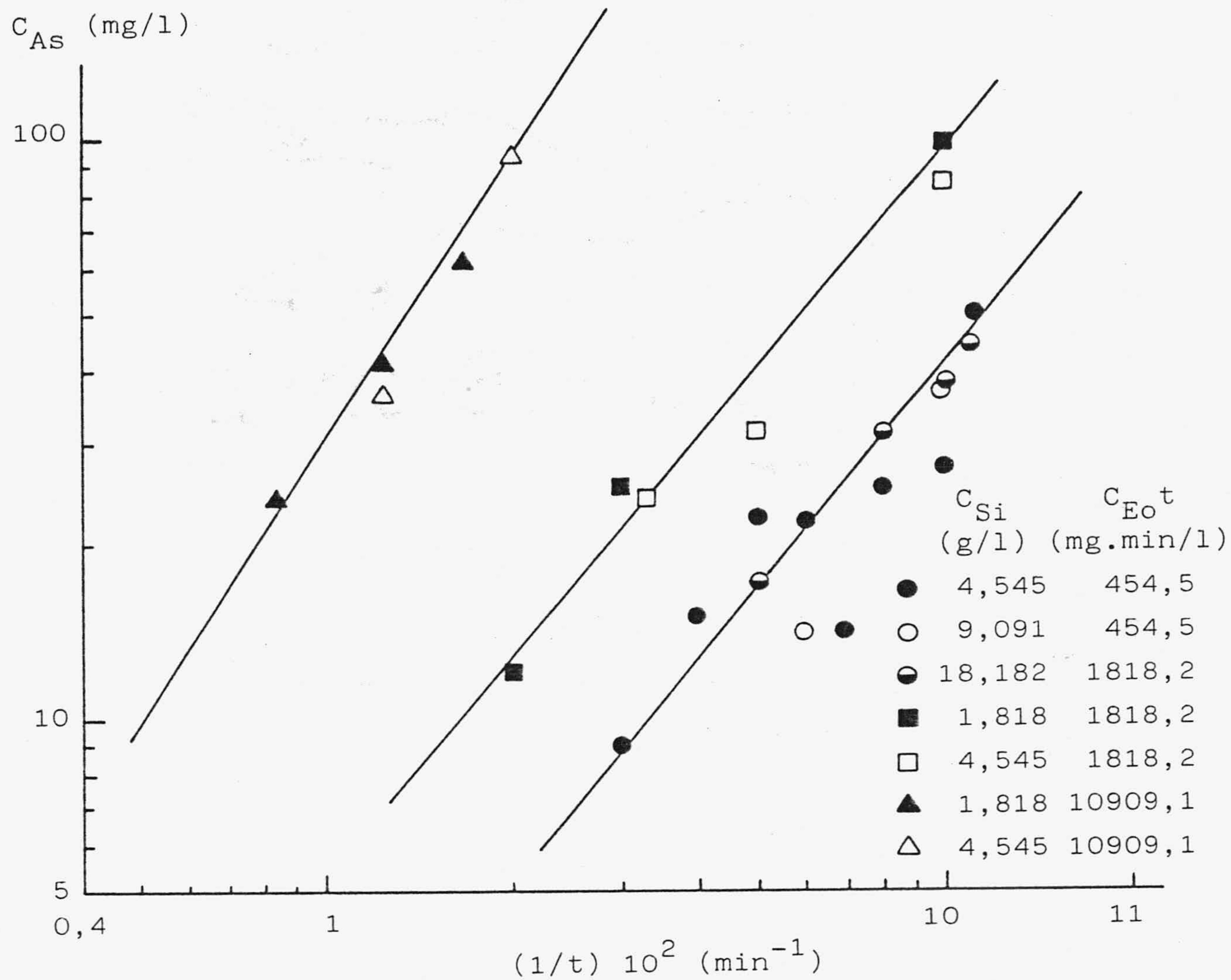


Figura 5.5.- Efecto sinérgico: variación de la concentración de azúcares reductores obtenidos por efecto sinérgico, C_{As} , con $1/t$.

$C_{E_0} t$ y C_{As} sería la concentración de azúcares reductores liberados debido a la existencia de un término de orden dos con respecto a la concentración de enzima, es decir

$$C_A = f(C_{E_0} t) + B' C_{E_0}^2 t \quad [5.7]$$

Según la expresión [5.6] representando C_{As}/t frente a C_{E_0} es posible estimar B' y comprobar el orden dos con respecto a la concentración de enzima. En las tablas 5.5 a 5.7 se muestran los valores de C_{As}/t y de C_{E_0} , los cuales se han representado en la figura 5.6; en ella se observa que el efecto sinérgico parece ser proporcional al cuadrado de la concentración de enzima, como expresa la ecuación [5.6], si bien los valores de B' son función de $C_{E_0} t$ (tabla 5.8). Este resultado indica que el mecanismo de la acción sinérgica parece ser más complejo que el representado por la ecuación [5.6].

Los valores de B' se han correlacionado con $C_{E_0} t$ mediante la expresión

$$B' = \alpha (C_{E_0} t)^{-1,2} \quad [5.8]$$

y teniendo en cuenta la ecuación [5.6], se obtiene

$$\frac{C_{As}}{(C_{E_0} t)^{0,8}} = \frac{\alpha}{t} \quad [5.9]$$

Se han calculado los valores del primer término de esta ecuación para todos los resultados obtenidos (tablas 5.9 a 5.11); estos valores se han representado en la figura 5.7, donde se observa que se ajustan aceptablemente a la ecuación [5.9] con un $\alpha = 2,34 \text{ (mg min/l)}^{0,2}$.

Por tanto la concentración total de azúcares reductores obtenidos, ecuación [5.5], vendrá dada por

Tabla 5.5

Efecto sinérgico: valores de C_{As}/t frente a C_{Eo} (ecuación [5.6]) a distintas concentraciones de sustrato, C_{Si} , para

$$C_{Eo} t = 454,5 \text{ mg.min/l}$$

C_{Si} (g/l)	C_{Eo} (mg/l)	C_{As}/t (mg/l.min)
4,545	50,0	3,85
4,545	45,5	2,70
4,545	36,4	2,00
4,545	31,8	0,98
4,545	27,3	1,32
4,545	22,7	1,10
4,545	18,2	0,60
4,545	13,6	0,27
9,091	45,5	3,70
9,091	27,3	0,84
18,182	50,0	4,84
18,182	45,5	3,80
18,182	36,4	2,48
18,182	22,7	0,85

Tabla 5.6

Efecto sinérgico: valores de C_{AS}/t frente a C_{EO} (ecuación [5.6]) a distintas concentraciones de sustrato, C_{Si} , para

$$C_{EO} t = 1818,2 \text{ mg}\cdot\text{min}/l$$

C_{Si} (g/l)	C_{EO} (mg/l)	C_{AS}/t (mg/l.min)
1,818	181,8	9,90
1,818	54,6	0,75
1,818	36,4	0,24
4,545	181,8	8,40
4,545	90,9	1,55
4,545	59,1	0,78

Tabla 5.7

Efecto sinérgico: valores de C_{AS}/t frente a C_{Eo} (ecuación [5.6]) a distintas concentraciones de sustrato, C_{Si} , para

$$C_{Eo}t = 10909,1 \text{ mg}\cdot\text{min}/\text{l}$$

C_{Si} (g/l)	C_{Eo} (mg/l)	C_{AS}/t (mg/l.min)
1,818	181,8	1,03
1,818	136,4	0,51
1,818	90,9	0,20
4,545	363,6	7,87
4,545	218,2	1,90
4,545	136,4	0,45

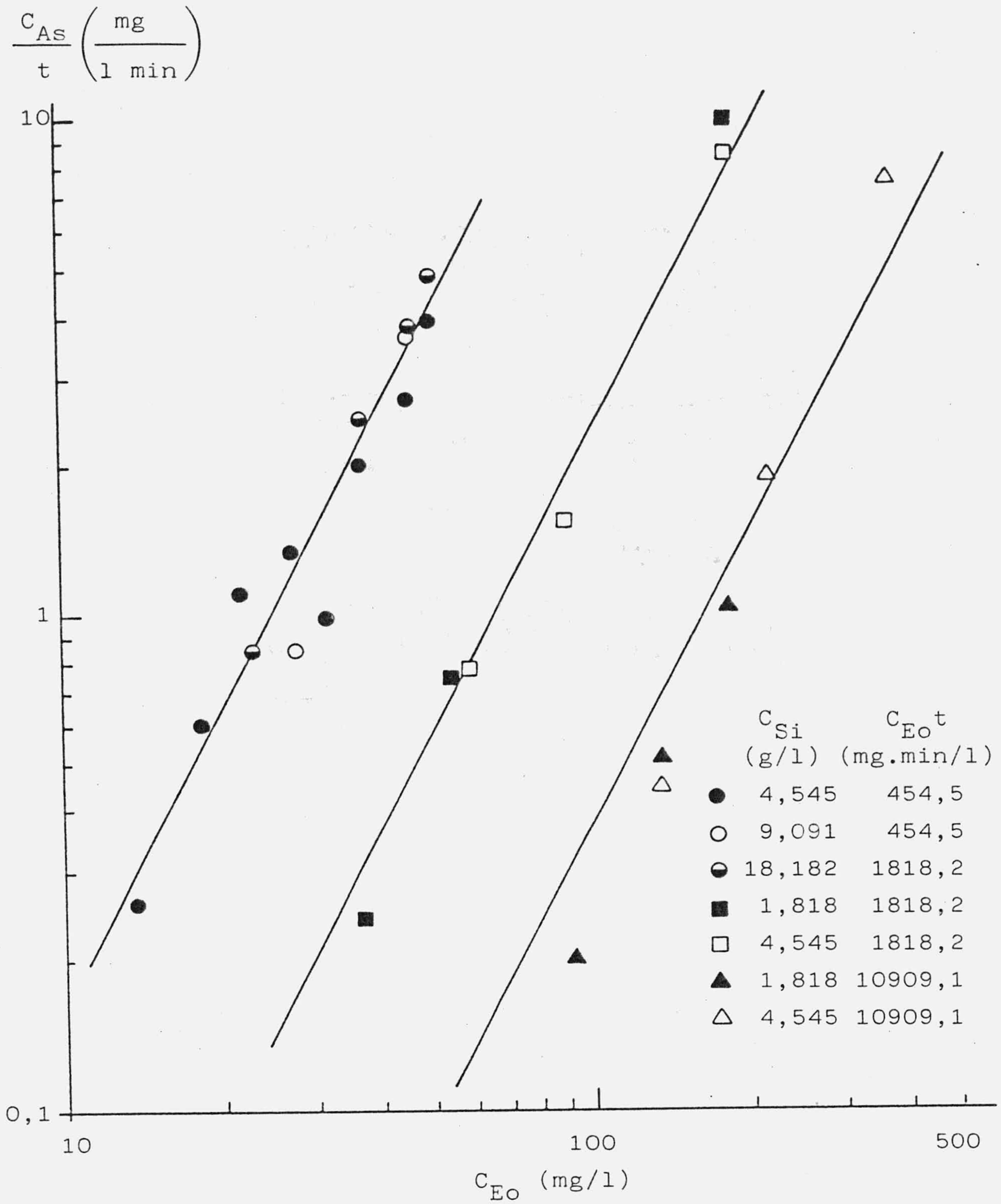


Figura 5.6.- Efecto sinérgico: variación de C_{As}/t con respecto a C_{Eo} (ecuación [5.6]).

Tabla 5.8

Efecto sinérgico: valores de la constante B' (ecuación [5.6]) en función de $C_{Eo} t$.

$C_{Eo} t$ (mg.min/l)	$B' 10^3$ (1/mg.min)
454,5	1,622
1818,2	0,234
10909,1	0,034

Tabla 5.9

Efecto sinérgico: valores de $C_{As}/(C_{Eo}t)^{0,8}$ frente a $1/t$ (ecuación [5.9]) a distintas concentraciones de sustrato, para

$$C_{Eo}t = 454,5 \text{ mg.min/l}$$

C_{Si} (g/l)	$(1/t) 10^2$ (min^{-1})	$C_{As}/(C_{Eo}t)^{0,8}$
4,545	11,00	0,262
4,545	10,00	0,202
4,545	8,00	0,187
4,545	6,99	0,105
4,545	5,99	0,165
4,545	5,00	0,165
4,545	4,00	0,112
4,545	3,00	0,067
9,091	10,00	0,277
9,091	5,99	0,105
18,182	11,00	0,329
18,182	10,00	0,284
18,182	8,00	0,232
18,182	5,00	0,127

Tabla 5.10

Efecto sinérgico: valores de $C_{As}/(C_{Eo}t)^{0,8}$ (ecuación [5.9]) frente a $1/t$ a distintas concentraciones de sustrato, para

$$C_{Eo}t = 1818,2 \text{ mg.min/l}$$

C_{Si} (g/l)	$(1/t) 10^2$ (min^{-1})	$C_{As}/(C_{Eo}t)^{0,8}$
1,818	10,00	0,244
1,818	3,00	0,062
1,818	2,00	0,030
4,545	10,00	0,207
4,545	5,00	0,076
4,545	3,26	0,059

Tabla 5.11

Efecto sinérgico: valores de $C_{As}/(C_{Eo}t)^{0,8}$ (ecuación [5.9]) frente a $1/t$ a distintas concentraciones de sustrato, para

$$C_{Eo}t = 10909,1 \text{ mg.min/l}$$

C_{Si} (g/l)	$(1/t) 10^2$ (min^{-1})	$C_{As}/(C_{Eo}t)^{0,8}$
1,818	1,67	0,036
1,818	1,25	0,024
1,818	0,83	0,014
4,545	3,33	0,139
4,545	2,00	0,056
4,545	1,25	0,021

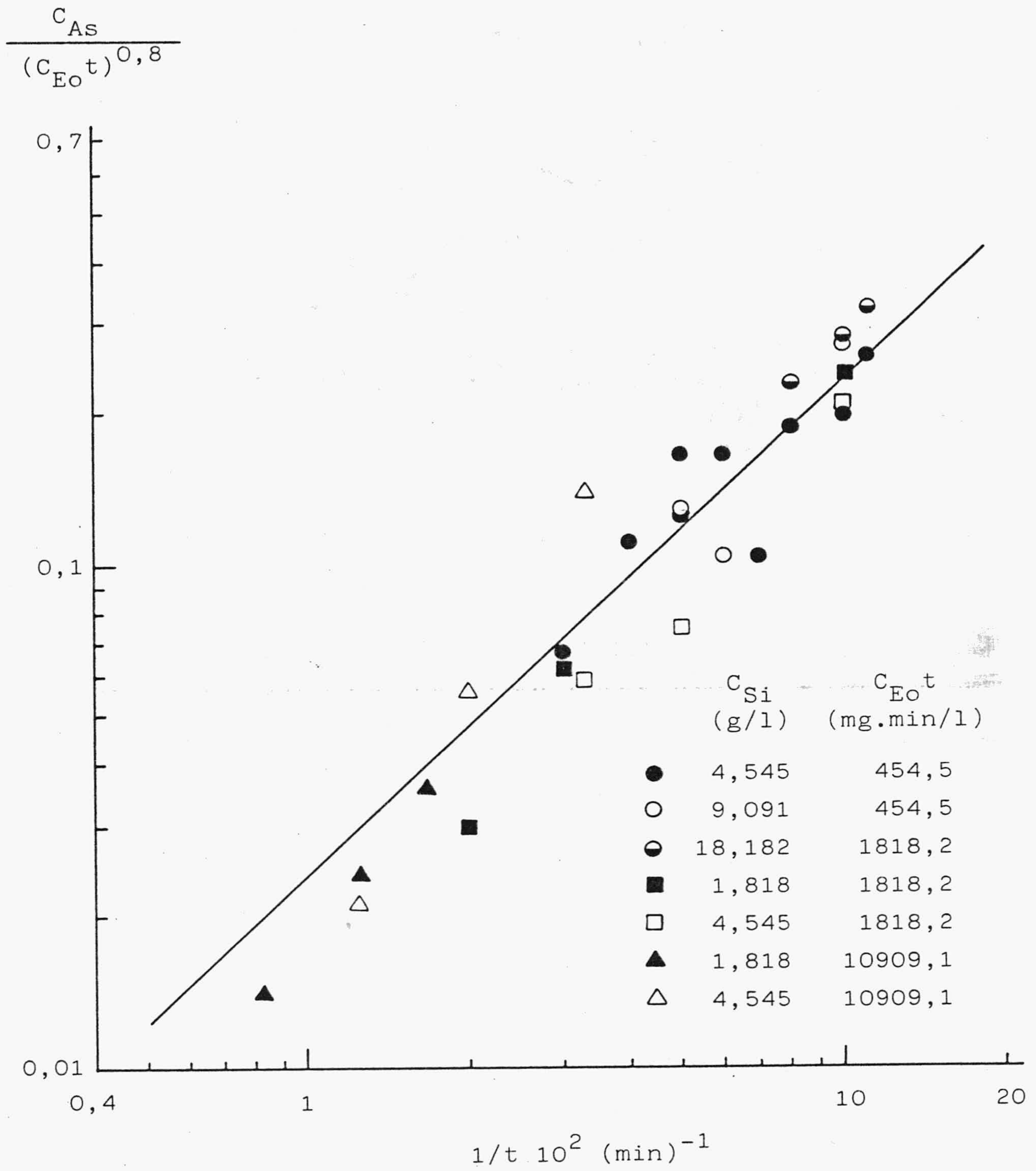


Figura 5.7.- Efecto sinérgico: variación de $C_{AS}/(C_{Eo} t)^{0,8}$ con $1/t$ (ecuación [5.9]).

$$C_A = C_{A\infty} + \frac{2,34}{t} (C_{E_0} t)^{0,8} \quad [5.10]$$

Esta expresión indica que la influencia del efecto sinérgico se incrementa con la concentración de enzima y disminuye con el tiempo, haciéndose prácticamente nula a concentraciones de enzima bajas y tiempos de hidrólisis altos.

La expresión [5.10] reproduce todos los resultados experimentales obtenidos para C_A (tablas 4.1 a 4.7) que se representan en las figuras 5.1 a 5.4 con desviaciones no superiores al 10%.

5.1.2. Modelo cinético

En la figura 5.8 se representan los resultados experimentales correspondientes a las tablas 4.9 a 4.15. En estos experimentos se ha utilizado el producto $C_{E_0} t$ como única variable de la intensidad del tratamiento enzimático, ya que, como se ha discutido anteriormente, $C_{E_0} t$ representa adecuadamente la severidad del tratamiento a partir de un cierto período inicial de tiempo en que el efecto sinérgico se hace despreciable. Todos los experimentos (tablas 4.9 a 4.15) se han planificado para tiempos en los que las hipótesis contenidas en la expresión [5.4] son correctas. Por otra parte, el hecho de que las curvas representadas en la figura 5.8 sean continuas, confirma también la validez de la utilización de $C_{E_0} t$ como variable intensiva del tratamiento.

Los resultados obtenidos para la variación de la concentración de azúcares reductores, C_A , con $C_{E_0} t$ (figura 5.8) muestran que, para un mismo valor de $C_{E_0} t$, C_A aumenta conforme lo hace la concentración inicial de sustrato C_{S_0} ; también se aprecia que C_A , para un valor dado de C_{S_0} , crece conforme lo hace $C_{E_0} t$.

Por otra parte, la velocidad global de reacción, $dC_A/dC_{E_0} t$, disminuye, para C_{S_0} constante, conforme aumenta C_A ; este hecho es de esperar si se tiene en cuenta que el sustrato desaparece conforme transcurre la reacción y que existe una fuerte inhibición de las enzimas por parte de los productos de reacción.

Una vez comprobado que la cinética enzimática simple (ecuación de Michaelis-Menten) no reproduce los resultados experimentales, se ha ensayado un mecanismo de reacción simple, con inhibición competitiva de producto, que no tiene en cuenta la naturaleza del sustrato y de la enzima, tal como proponen Howell y Stuck (1975),

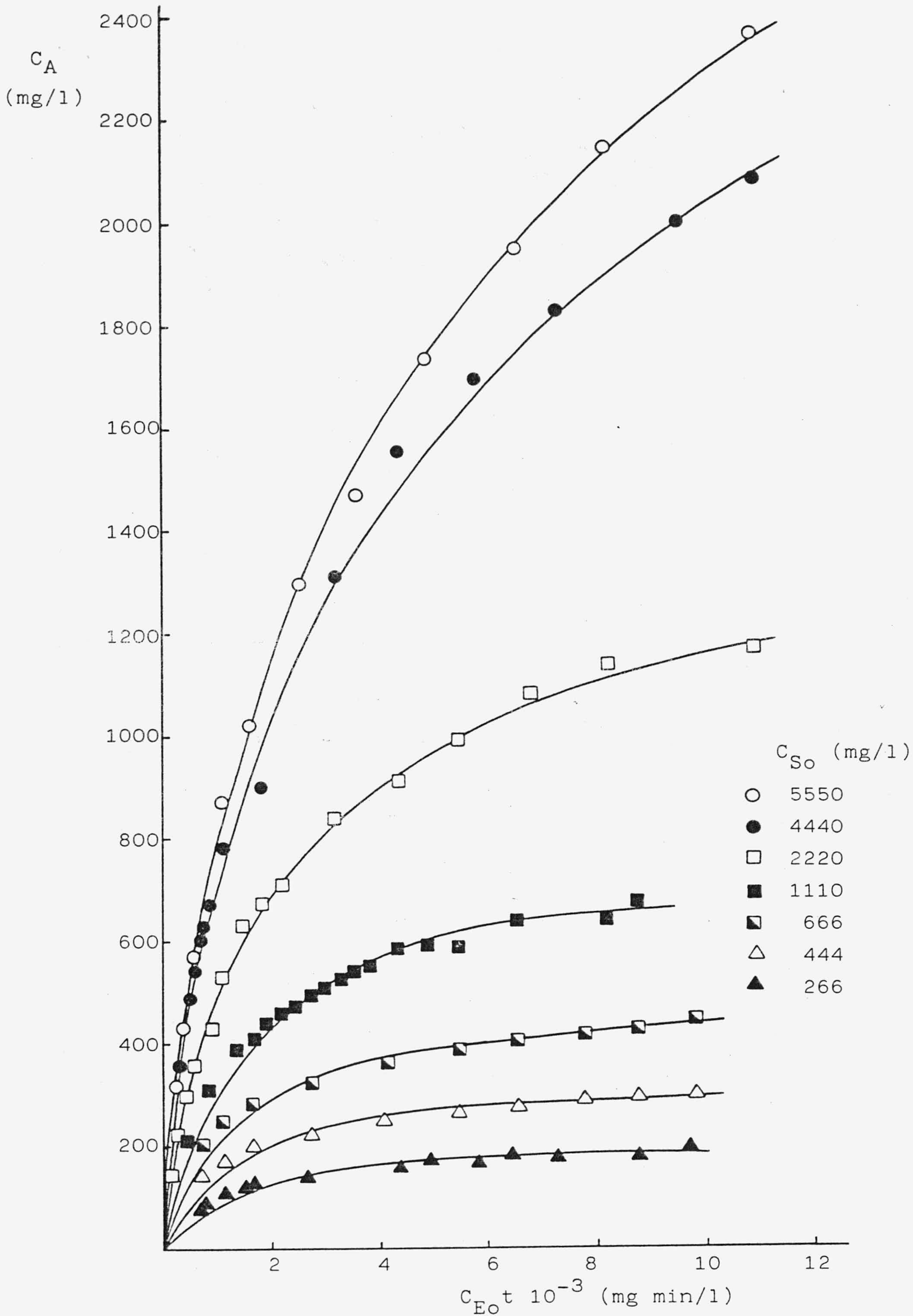
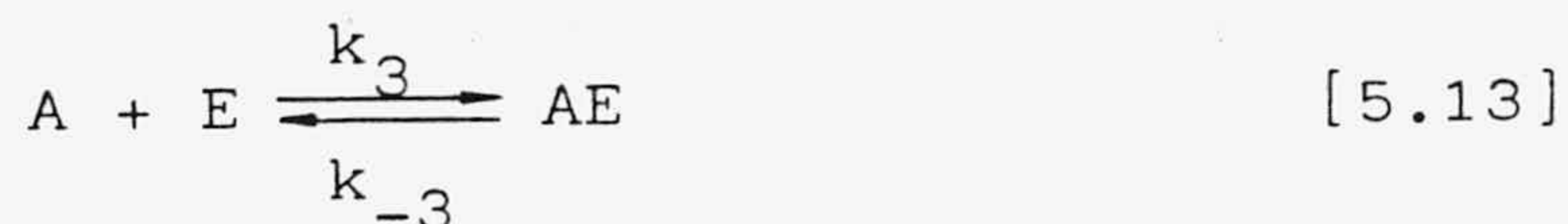
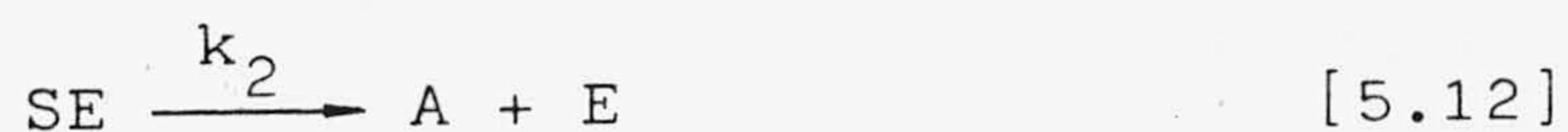
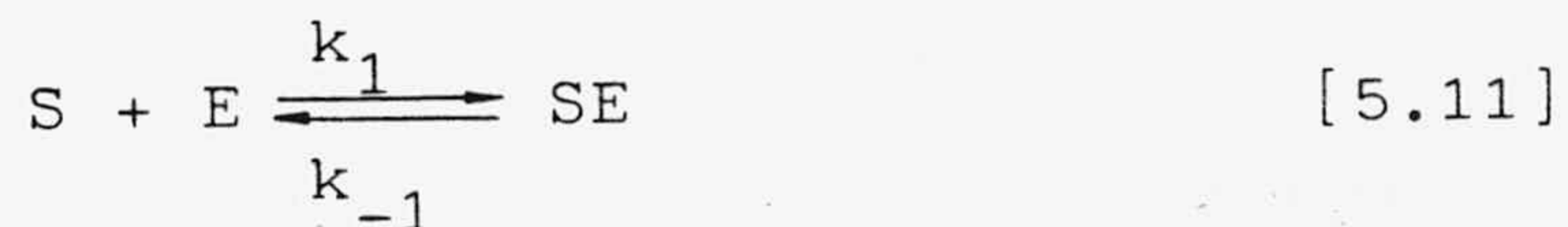


Figura 5.8.- Hidrólisis enzimática de CMC: variación de la concentración de azúcares reductores con $C_{Eo} t$ a distintas concentraciones de sustrato.

Mangat y Howell (1978), Koichiro y col. (1982) y Huang (1975). Según este modelo la hidrólisis enzimática de la carboximetilcelulosa se puede representar por



donde SE es un complejo intermedio que se descompone en azúcares reductores y la enzima y AE es un complejo entre la enzima y los productos de reacción que inhiben la actividad de aquella. A partir de [5.11], [5.12] y [5.13] se obtiene que

$$\frac{dC_{SE}}{dt} = k_1 C_S C_E - k_{-1} C_{SE} - k_2 C_{SE} \quad [5.14]$$

$$\frac{dC_A}{dt} = k_2 C_{SE} \quad [5.15]$$

$$\frac{dC_{AE}}{dt} = k_3 C_A C_E - k_{-3} C_{AE} \quad [5.16]$$

Admitiendo un estado cuasi-estacionario para la formación de los complejos intermedios, es decir

$$\frac{dC_{ES}}{dt} = \frac{dC_{AE}}{dt} = 0 \quad [5.17]$$

y teniendo en cuenta el balance de enzima

$$C_{E0} = C_E + C_{ES} + C_{AE} \quad [5.18]$$

se obtiene que la velocidad de reacción, r , es

$$r = \frac{dC_A}{dt} = \frac{k_2 C_{Eo} C_S}{K_M \left(1 + \frac{C_A}{K_I}\right) + C_S} \quad [5.19]$$

donde K_M y K_I son, respectivamente, la constante aparente de Michaelis-Menten y una constante de inhibición que representa la disociación del intermedio AE.

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad K_I = \frac{k_{-3}}{k_3}$$

Operando en [5.19] se obtiene

$$\frac{dC_A}{dt} = \frac{K_a C_{Eo} C_S}{1 + K_b C_S + K_c C_A} \quad [5.20]$$

donde

$$K_a = \frac{k_2}{K_M} \quad K_b = \frac{1}{K_M} \quad K_c = \frac{1}{K_I}$$

Por otra parte, el balance de sustrato conduce a

$$C_{So} = C_S + C_A \quad [5.21]$$

donde C_{So} y C_S son, respectivamente, las concentraciones inicial e instantánea de enlaces hidrolizables, expresadas ambas en glucosa potencial. Sustituyendo [5.21] en [5.20], separando variables e integrando, se obtiene que

$$C_{Eo} t = \frac{K_b - K_c}{K_a} C_A + \frac{1 + K_c C_{So}}{K_a} \ln \frac{C_{So}}{C_{So} - C_A} \quad [5.22]$$

Esta expresión se linealiza dando lugar a

$$\frac{C_{Eo} t}{C_A} = \frac{K_b - K_c}{K_a} + \frac{1 + K_c C_{So}}{K_a} \frac{1}{C_A} \ln \frac{C_{So}}{C_{So} - C_A} \quad [5.23]$$

Si el mecanismo propuesto fuera el adecuado, al representar $C_{Eo}t/C_A$ frente a $(1/C_A) \cdot \ln(C_{So}/(C_{So}-C_A))$ todos los resultados experimentales deberían ajustarse a líneas rectas de igual ordenada en el origen y pendiente función de C_{So} , tal como indica la ecuación [5.23].

En las tablas 5.12 a 5.18 se muestran los valores de $C_{Eo}t/C_A$, $(1/C_A) \cdot \ln(C_{So}/(C_{So}-C_A))$ y de la conversión global del sustrato, X_A , calculada mediante

$$X_A = \frac{C_A}{C_{So}} \quad [5.24]$$

La linealización de la ecuación [5.23] se muestra en las figuras 5.9 y 5.10; en ella se observa que todos los datos no quedan alineados en rectas de igual ordenada en el origen, por lo que el modelo no ajusta correctamente los resultados experimentales. Sin embargo, parece que los datos tabulados en 5.12 a 5.18 se pueden agrupar empíricamente, para conversiones (X_A) mayores y menores de aproximadamente el 50%, en líneas rectas de una misma ordenada en el origen. Por tanto, para utilizar [5.23] se necesitarían "constantes cinéticas" distintas para ambas zonas.

Este hecho está de acuerdo con los resultados obtenidos por Howell (1975), Mangat (1978), Koichiro (1982) y Huang (1975), ya que al utilizar ecuaciones análogas a la [5.23], reproducen sus datos sólo a bajas conversiones de sustrato. Las desviaciones encontradas por estos autores y las obtenidas en este trabajo pueden explicarse por el cambio que se produce en la naturaleza del sustrato durante el transcurso de la reacción. En efecto, teniendo en cuenta que se puede establecer una relación aproximada entre la conversión y el grado de polimerización medio, p , de la CMC, del tipo

Tabla 5.12

Linealización del modelo cinético de reacción simple (no tiene en cuenta la naturaleza compleja del sistema enzimático) con inhibición competitiva de producto (ecuación [5.23]) y conversión del sustrato a azúcares reductores, X_A , para

$$C_{S_0} = 266 \text{ mg/l}$$

$C_{E_0} t / C_A$ (min)	$(1/C_A) \cdot \ln(C_{S_0} / (C_{S_0} - C_A)) \cdot 10^3$ (1/mg)	X_A
8,3	4,50	0,308
8,0	4,60	0,342
10,1	4,82	0,406
12,2	4,98	0,447
13,0	5,09	0,474
20,1	5,26	0,511
28,2	5,64	0,583
29,0	5,97	0,635
35,5	5,85	0,617
36,3	6,21	0,669
41,3	6,16	0,662
46,7	6,49	0,703
49,6	6,89	0,744

Tabla 5.13

Linealización del modelo cinético de reacción simple con inhibición competitiva de producto (ecuación [5.23]) y conversión del sustrato a azúcares reductores, X_A , para

$$C_{S_0} = 444 \text{ mg/l}$$

$C_{E_0} t / C_A$ (min)	$(1/C_A) \cdot \ln(C_{S_0} / (C_{S_0} - C_A)) \cdot 10^3$ (1/mg)	X_A
4,8	2,71	0,318
6,4	2,84	0,385
8,3	2,98	0,446
12,3	3,12	0,598
16,5	3,30	0,559
20,7	3,41	0,592
23,9	3,50	0,617
26,5	3,67	0,658
29,5	3,71	0,667
32,7	3,75	0,676

Tabla 5.14

Linealización del modelo cinético de reacción simple con inhibición competitiva de producto (ecuación [5.23]) y conversión del sustrato a azúcares reductores, X_A , para

$$C_{S_0} = 666 \text{ mg/l}$$

$C_{E_0} t / C_A$ (min)	$(1/C_A) \cdot \ln(C_{S_0} / (C_{S_0} - C_A)) \cdot 10^3$ (1/mg)	X_A
3,4	1,79	0,300
4,4	1,88	0,371
5,8	1,96	0,425
8,5	2,05	0,483
11,4	2,16	0,539
14,2	2,24	0,578
16,2	2,31	0,605
18,7	2,35	0,622
20,5	2,39	0,638
22,2	2,47	0,664

Tabla 5.15

Linealización del modelo cinético de reacción simple con inhibición competitiva de producto (ecuación [5.23]) y conversión del sustrato a azúcares reductores, X_A , para

$$C_{S_0} = 1110 \text{ mg/l}$$

$C_{E_0} t / C_A$ (min)	$(1/C_A) \cdot \ln(C_{S_0} / (C_{S_0} - C_A)) \cdot 10^3$ (1/mg)	X_A
1,92	1,00	0,191
2,66	1,06	0,277
3,52	1,11	0,350
3,99	1,12	0,369
4,37	1,15	0,394
4,76	1,16	0,413
5,22	1,17	0,423
5,55	1,19	0,442
5,95	1,20	0,454
6,33	1,21	0,466
6,64	1,23	0,481
7,98	1,24	0,493
7,47	1,28	0,526
8,35	1,28	0,530
9,34	1,28	0,526
10,33	1,34	0,571
12,82	1,34	0,575
13,01	1,38	0,605

Tabla 5.16

Linealización del modelo cinético de reacción simple con inhibición competitiva de producto (ecuación [5.23]) y conversión del sustrato a azúcares reductores, X_A , para

$$C_{S_0} = 2220 \text{ mg/l}$$

$C_{E_0} t / C_A$ (min)	$(1/C_A) \cdot \ln(C_{S_0} / (C_{S_0} - C_A)) \cdot 10^3$ (1/mg)	X_A
0,95	0,47	0,064
1,22	0,48	0,100
1,37	0,48	0,134
1,54	0,49	0,159
1,91	0,50	0,193
2,05	0,52	0,240
2,32	0,53	0,283
2,71	0,54	0,303
3,09	0,54	0,318
3,79	0,57	0,378
4,80	0,58	0,410
5,51	0,60	0,446
6,30	0,62	0,488
7,19	0,63	0,513
9,27	0,64	0,530

Tabla 5.17

Linealización del modelo cinético de reacción simple con inhibición competitiva de producto (ecuación [5.23]) y conversión del sustrato a azúcares reductores, X_A , para

$$C_{S_0} = 4440 \text{ mg/l}$$

$C_{E_0} t / C_A$ (min)	$(1/C_A) \cdot \ln(C_{S_0} / (C_{S_0} - C_A)) \cdot 10^3$ (1/mg)	X_A
0,77	0,235	0,080
0,85	0,237	0,097
0,92	0,239	0,111
1,00	0,240	0,122
1,06	0,242	0,136
1,16	0,243	0,141
1,22	0,244	0,151
1,40	0,248	0,176
2,02	0,252	0,203
2,43	0,267	0,295
2,81	0,277	0,350
3,43	0,284	0,382
3,99	0,290	0,411
4,77	0,299	0,451
5,25	0,304	0,468

Tabla 5.18

Linealización del modelo cinético de reacción simple con inhibición competitiva de producto (ecuación [5.23]) y conversión del sustrato a azúcares reductores, X_A , para

$$C_{S_0} = 5550 \text{ mg/l}$$

$C_{E_0} t / C_A$ (min)	$(1/C_A) \cdot \ln(C_{S_0} / (C_{S_0} - C_A)) \cdot 10^3$ (1/mg)	X_A
0,72	0,185	0,057
0,95	0,190	0,103
1,25	0,196	0,157
1,60	0,199	0,184
1,97	0,205	0,233
2,48	0,209	0,265
2,83	0,216	0,313
3,35	0,222	0,352
3,82	0,228	0,386
4,61	0,235	0,426

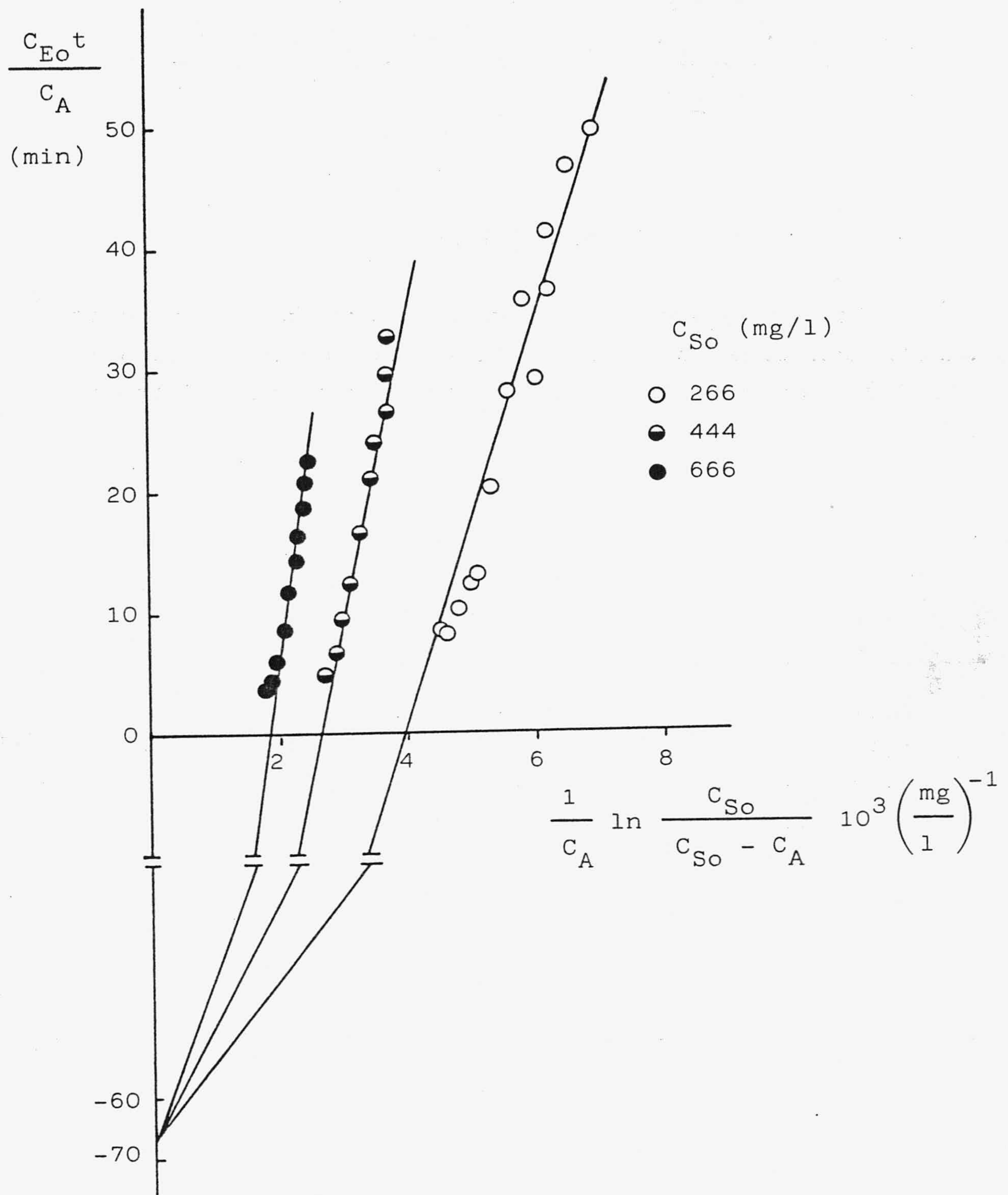


Figura 5.9.- Linealización del modelo cinético de reacción simple con inhibición competitiva de producto: ajuste de los resultados experimentales de la hidrólisis enzimática de CMC.

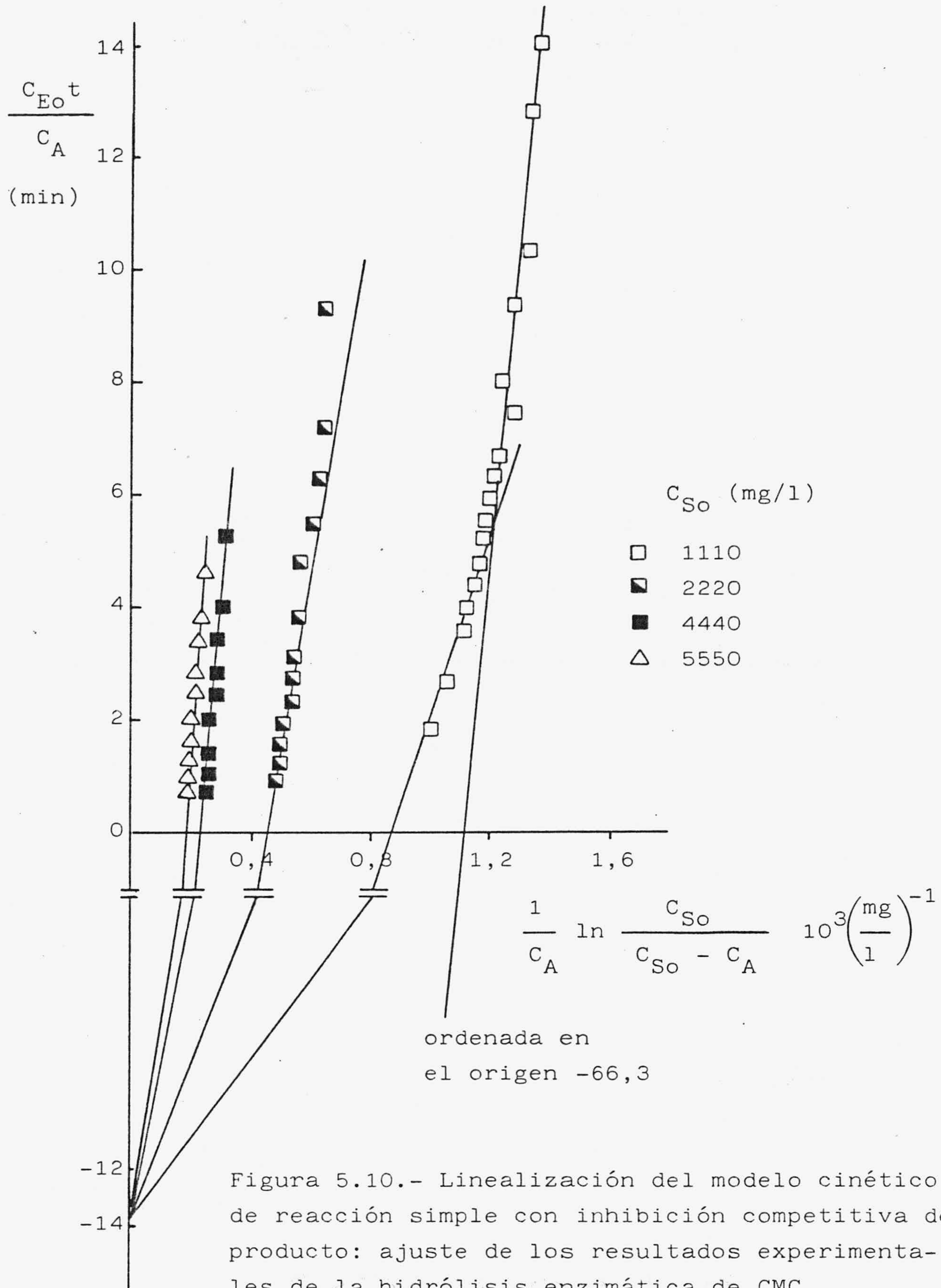


Figura 5.10.- Linealización del modelo cinético de reacción simple con inhibición competitiva de producto: ajuste de los resultados experimentales de la hidrólisis enzimática de CMC.

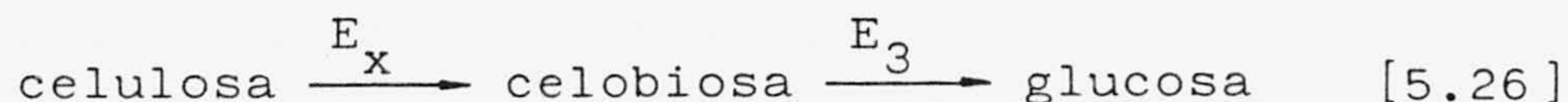
$$X_A \approx \frac{1}{p} \quad [5.25]$$

es evidente que para $X_A \approx 0,50$, el grado medio de polimerización es dos. Por tanto, la enzima que, en estas circunstancias, probablemente contribuye en mayor grado a la liberación de grupos reductores es la β -1,4-glicosidasa, que, como ya se ha mencionado, hidroliza la celobiosa a glucosa. En consecuencia, suponer al sustrato y a la enzima como sustancias únicas es inadecuado para sistemas celulolíticos relativamente equilibrados en cuanto a su composición; es decir, que el modelo podría ser válido si el complejo celulolítico estuviera formado exclusivamente por endo y exoglucanasas.

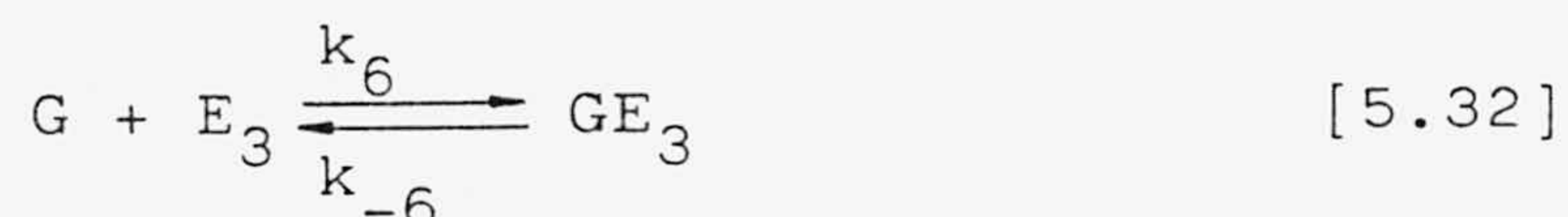
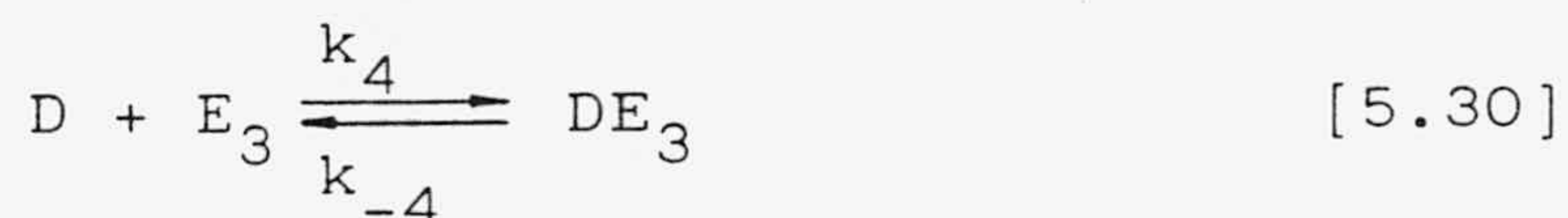
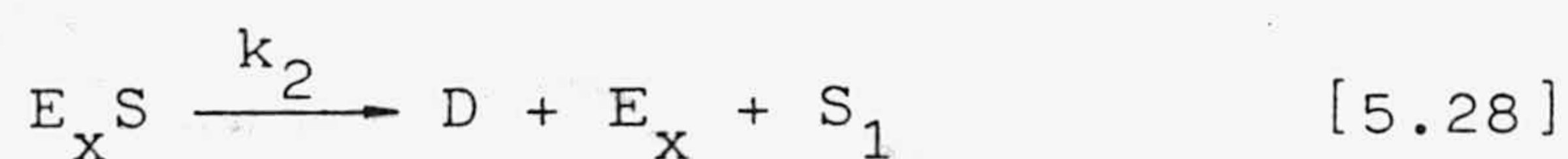
Debido a estos hechos, los autores que han utilizado el modelo de una reacción simple con inhibición competitiva de producto, ecuaciones [5.11] a [5.13], no pueden ajustar sus resultados a conversiones altas, ya que normalmente los parámetros cinéticos los han evaluado en los instantes iniciales de la reacción. Por ello, para explicar sus resultados, o las desviaciones obtenidas con respecto al modelo, recurren a artificios que no parecen tener una base teórica o práctica; a este respecto cabe mencionar la hipótesis de Howell y Stuck (1975) que suponen la desnaturalización de la enzima, cuando ni el pH, ni la temperatura, ni el tiempo de reacción son lo suficientemente drásticos como para provocarla, Wald y col. (1984). En consecuencia, parece lógico pensar que para reproducir los resultados experimentales es preciso tener en cuenta los cambios que se producen en el sustrato durante el transcurso de la reacción y los distintos mecanismos de actuación de cada una de las enzimas que forman el complejo celulolítico.

A la vista de los resultados obtenidos con el

modelo anterior y teniendo en cuenta que los mecanismos propuestos por Suga y col. (1975), Okazaki y Moo-Young (1978) y Lee y col. (1978) son prácticamente inviables, se propone un modelo simplificado de dos reacciones simples en serie, cuyo esquema es



En [5.26] se admite que las endo y exoglucanasas, E_x , actúan sobre el sustrato liberando celobiosa y cadenas más cortas de CMC y que la β -1,4-glucosidasa, E_3 , hidroliza la celobiosa a glucosa. Aunque ambas reacciones transcurrirán simultáneamente, es evidente que la primera será más importante a conversiones de sustrato bajas y grado medio de polimerización muy superior a dos; en cambio, la hidrólisis de la celobiosa será la reacción que se dé en mayor extensión en los instantes finales, $DP \sim 2$. Admitiendo que en ambas reacciones existe inhibición competitiva de producto, el mecanismo propuesto es



donde S, D y G representan cantidades de CMC, celobiosa y glucosa, respectivamente, y S_1 cadenas de CMC hidrolizadas en parte y $DP > 2$; $E_x S$ y $E_3 D$ son intermedios que se descomponen liberando la enzima y productos de menor grado de polimerización, mientras que DE_x y GE_3 son complejos entre las enzimas y los productos a que ellas mismas dan lugar, que inhiben la actividad enzimática.

Suponiendo aplicable la hipótesis de estado estacionario para los complejos intermedios, y realizando un balance de enzima, tanto para E_x como para E_3 , se obtiene que

$$\frac{dC_D}{dt} = \frac{K_a C_{Ex} C_S}{1 + K_b C_S + K_c C_D} - \frac{K_d C_{E3} C_D}{1 + K_e C_D + K_f C_G} \quad [5.33]$$

$$\frac{dC_G}{dt} = 2 \frac{K_d C_{E3} C_D}{1 + K_e C_D + K_f C_G} \quad [5.34]$$

donde

$$K_a = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} \quad K_b = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} \quad K_c = \frac{k_3}{k_{-3}}$$

$$K_d = \frac{k_4 k_5}{k_{-4} + k_5} \quad K_e = \frac{k_4}{k_{-4} + k_5} \quad K_f = \frac{k_6}{k_{-6}}$$

Admitiendo que la cantidad total de azúcares reductores proviene fundamentalmente de la celobiosa y de la glucosa existentes en el medio, se llega a

$$C_A \approx C_D + C_G \quad [5.35]$$

$$\frac{dC_A}{dt} = \frac{dC_D}{dt} + \frac{dC_G}{dt} \quad [5.36]$$

Esta hipótesis implica que se desprecia en parte la actuación de las endoglucanasas, ya que en [5.35] y [5.36] no se tiene en cuenta la aportación de grupos reductores por parte de las cadenas con un grado de polimerización superior a dos, $DP > 2$.

Dado que las endo y exoglucanasas constituyen una fracción, α , de la cantidad inicial de enzima, E_0 , que cataliza las reacciones de hidrólisis, las cantidades para E_x y E_3 son

$$E_x = \alpha E_0 \quad E_3 = (1-\alpha) E_0 \quad [5.37]$$

En cada instante la concentración total de enlaces hidrolizables es $C_{S_0} - C_A$, por tanto es evidente que el sustrato útil para la primera reacción (transformación de CMC en celobiosa) es

$$C_S = C_{S_0} - C_A - C_D \quad [5.38]$$

ya que a la cantidad total de enlaces hidrolizables es necesario sustraerle el sustrato, C_D , que se hidroliza en la transformación de celobiosa a glucosa.

Sustituyendo [5.33] y [5.34] en [5.36] y teniendo en cuenta [5.37] y [5.38] se obtiene que la velocidad total del proceso es

$$\frac{dC_A}{dC_{E_0} t} = \frac{K_{ao} (C_{S_0} - C_A - C_D)}{1 + K_b C_S + K_c C_D} + \frac{K_{do} C_D}{1 + (K_e - K_f) C_D + K_f C_A} \quad [5.39]$$

y la velocidad de hidrólisis de la celobiosa

$$\frac{dC_D}{dC_{E_0} t} = \frac{K_{ao} (C_{S_0} - C_A - C_D)}{1 + K_b C_S + K_c C_D} - \frac{K_{do} C_D}{1 + (K_e - K_f) C_D + K_f C_A} \quad [5.40]$$

donde

$$K_{ao} = \alpha K_a \quad K_{do} = (1-\alpha) K_d$$

En las ecuaciones [5.39] y [5.40] se ha sustituido la concentración de glucosa, C_G , por la total de azúcares reductores, C_A , que es la medida experimental que se ha llevado a cabo. Esta aproximación tiene sentido en cuanto que son numerosos los autores que admiten una inhibición de E_3 por el producto y el sustrato de la reacción catalizada por ella, Hong y col. (1981) y Grous y col. (1985) y por tanto C_A puede representar esta doble inhibición.

Para integrar por métodos numéricos las ecuaciones [5.39] y [5.40] es necesario disponer de valores iniciales para las distintas constantes que aparecen en su formulación. Para la estimación de éstas se puede admitir que en los instantes iniciales la reacción predominante es la transformación de CMC a celobiosa, por lo que la ecuación [5.39] se transforma en

$$\frac{dC_A}{dC_{Eo} t} \approx \frac{K_{ao} (C_{So} - C_A)}{1 + K_b (C_{So} - C_A) + K_c C_A} \quad [5.41]$$

donde la concentración de sustrato sin hidrolizar es $C_{So} - C_A$ y $C_D \approx C_A$ debido a que la concentración de glucosa es despreciable en los instantes iniciales.

Análogamente, en los instantes finales la reacción predominante será la transformación de celobiosa a glucosa, por lo que la ecuación [5.39] puede transformarse en

$$\frac{dC_A}{dC_{Eo} t} \approx \frac{K_{do} (C_{So} - C_A)}{1 + (K_e - K_f) (C_{So} - C_A) + K_f C_A} \quad [5.42]$$

donde el sustrato estará constituido fundamentalmente por celobiosa y, por tanto, $C_D \approx C_{S_0} - C_A$.

Separando variables e integrando en [5.41] y [5.42] se obtiene, respectivamente, que

$$\frac{C_{E_0} t}{C_A} = \frac{K_b - K_c}{K_{a_0}} + \frac{1 + K_c C_{S_0}}{K_{a_0}} \frac{1}{C_A} \ln \frac{C_{S_0}}{C_{S_0} - C_A} \quad [5.43]$$

$$\frac{C_{E_0} t}{C_A} = \frac{(K_e - K_f) - K_f}{K_{d_0}} + \frac{1 + K_f C_{S_0}}{K_{d_0}} \frac{1}{C_A} \ln \frac{C_{S_0}}{C_{S_0} - C_A} \quad [5.44]$$

Estas ecuaciones indican que de ser ciertas las hipótesis anteriores, una representación de $C_{E_0} t / C_A$ frente a $(1/C_A) \cdot \ln(C_{S_0} / (C_{S_0} - C_A))$ conduce a líneas rectas de igual ordenada en el origen y pendiente función de C_{S_0} . La ecuación [5.43] debe cumplirse a conversiones de sustrato bajas y la [5.44] a conversiones altas. En las figuras 5.9 y 5.10 se han representado los valores de $C_{E_0} t / C_A$ y $(1/C_A) \cdot \ln(C_{S_0} / (C_{S_0} - C_A))$ que se muestran en las tablas 5.12 a 5.18; en estas gráficas se observa que las ecuaciones [5.43] y [5.44] se cumplen aceptablemente para conversiones totales, X_A , inferiores y superiores al 50%, respectivamente. Por regresión lineal se han calculado las pendientes y ordenadas en el origen y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.19.

Así pues, mediante las hipótesis anteriores se pueden ajustar adecuadamente los resultados experimentales y se corrigen las deficiencias del modelo de una reacción simple con inhibición competitiva de producto, ecuaciones [5.11] a [5.13].

Dado que en ambos casos (tabla 5.19) la ordenada en el origen permanece prácticamente constante se toma

Tabla 5.19

Linealización de las ecuaciones [5.43] y [5.44].

Conversiones inferiores al 50%, $X_A < 0,50$

C_{So} (mg/l)	$(K_b - K_c)/K_{ao}$	$(1 + K_c C_{So})/K_{ao}$	$(1 + K_c C_{So})/K_{ao}$ recalculados
1110	-15,0	16,7	16,0
2220	-13,6	30,8	31,7
4440	-13,8	61,4	62,7
5550	-15,0	77,6	78,9

Conversiones superiores al 50%, $X_A > 0,50$

C_{So} (mg/l)	$((K_c - K_f) - K_f)/K_{do}$	$(1 + K_f C_{So})/K_{do}$	$(1 + K_f C_{So})/K_{do}$ recalculados
266	-72,6	17,9	16,9
444	-75,1	28,2	25,5
666	-63,4	34,8	36,6
1110	-53,9	48,7	58,1

un valor medio para la misma y se recalculan las pendientes, tabla 5.19. Estos últimos valores se han representado frente a C_{S_0} en la figura 5.11 y por regresión lineal se obtiene que las pendientes de estas líneas, K_c/K_{a_0} y K_f/K_{d_0} respectivamente, son del mismo orden de magnitud que las ordenadas medias en el origen $(K_b - K_c)/K_{a_0}$ y $(K_e - 2K_f)/K_{d_0}$, de las ecuaciones [5.43] y [5.44], respectivamente, tabla 5.19. Este hecho parece indicar que K_b es prácticamente nula y que K_e y K_f son del mismo orden de magnitud, por lo que $K_e - K_f \approx 0$.

Este mismo resultado también parece ponerse de manifiesto con respecto a K_b mediante la estimación de las pendientes en el origen para la figura 5.8. Estas pendientes representan las velocidades iniciales de hidrólisis, r_0 , y según la ecuación [5.41] vienen dadas por

$$r_0 = \frac{K_{a_0} C_{S_0}}{1 + K_b C_{S_0}} \quad [5.45]$$

ya que para $t=0$, $C_A=0$. Si se representan los valores estimados para r_0 frente a C_{S_0} , se obtiene una línea recta de ordenada en el origen prácticamente nula (figura 5.12); este hecho indica que $K_b C_{S_0} \ll 1$, y si esto es cierto cuando C_S tiene su valor máximo (C_{S_0}), es de esperar que también lo sea durante el transcurso de la reacción.

Los valores de K_c/K_{a_0} y K_f/K_{d_0} se han obtenido promediando las pendientes de las líneas representadas en la figura 5.11 y las ordenadas en el origen que se muestran en la tabla 5.19, ya que $K_b = (K_c - K_f) \approx 0$. Los resultados obtenidos son

$$\frac{K_c}{K_{a_0}} = 14,1 \quad \frac{K_f}{K_{d_0}} = 57,6 \quad [5.46]$$

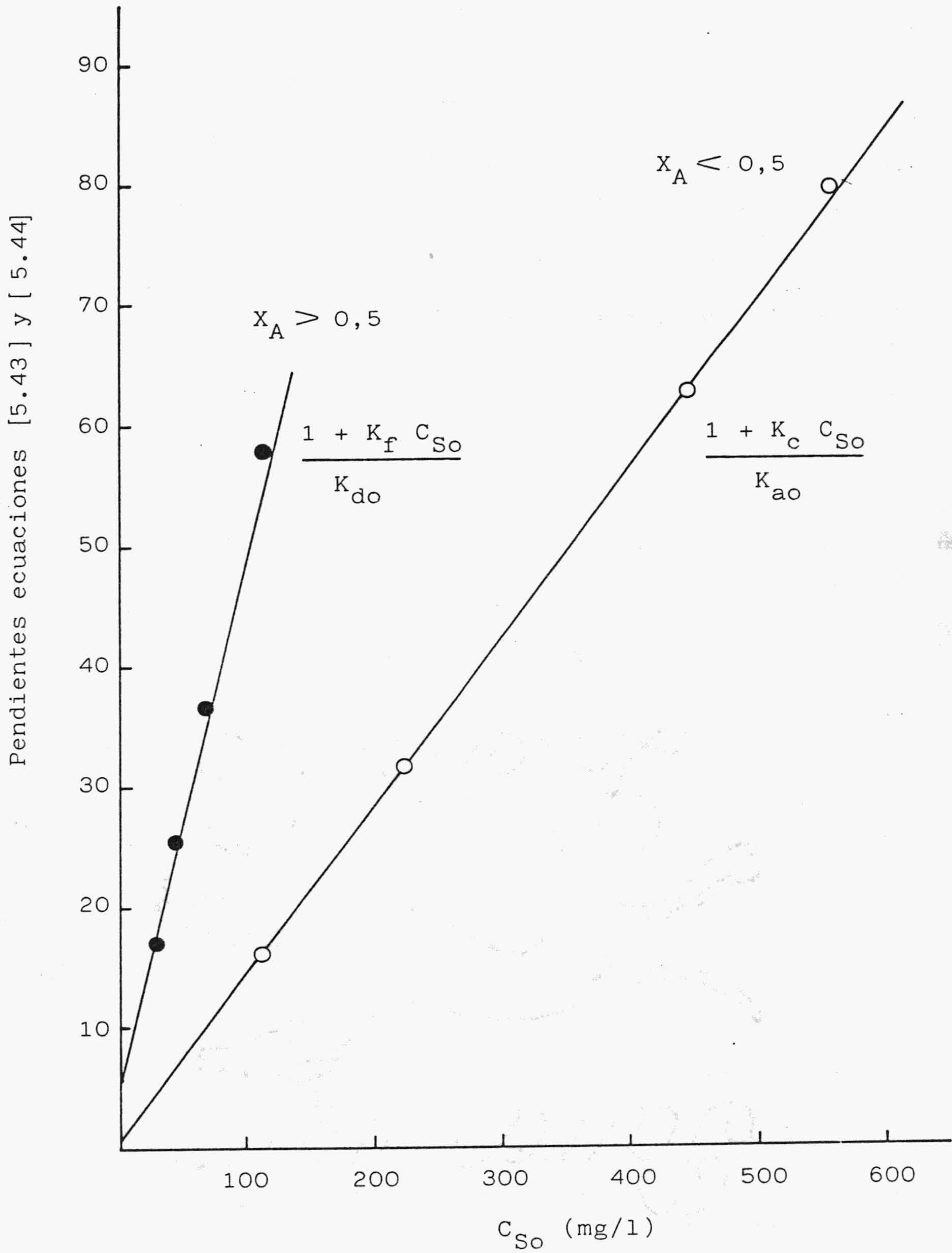


Figura 5.11.- Representación de las pendientes de las ecuaciones [5.43] y [5.44] frente a C_{So} (tabla 5.19).

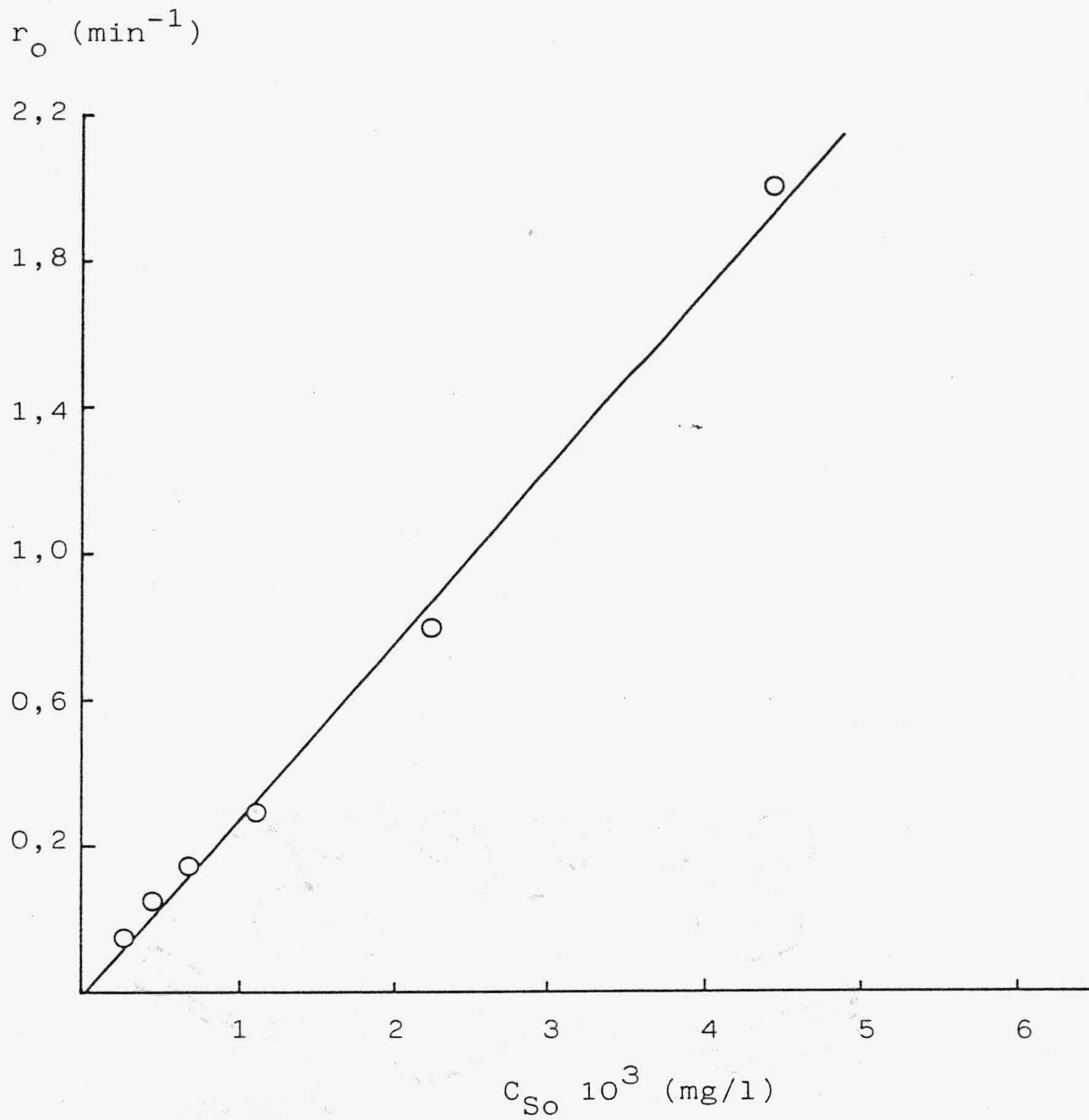


Figura 5.12.- Representación de las velocidades iniciales de producción de azúcares reductores, r_o , frente a C_{So} .

Por otra parte, las ordenadas en el origen de las líneas representadas en la figura 5.11 son

$$\frac{1}{K_{ao}} = 0,3 \qquad \frac{1}{K_{do}} = 3,9 \qquad [5.47]$$

A partir de [5.46] y [5.47] se obtienen los valores de las constantes que se muestran en la tabla 5.20.

De ser ciertos los resultados obtenidos en la estimación de estas constantes, las ecuaciones [5.39] y [5.40] se transforman en

$$\frac{dC_A}{dC_{Eo} t} = \frac{K_{ao} (C_{So} - C_A - C_D)}{1 + K_c C_D} + \frac{K_{do} C_D}{1 + K_f C_A} \qquad [5.48]$$

$$\frac{dC_D}{dC_{Eo} t} = \frac{K_{ao} (C_{So} - C_A - C_D)}{1 + K_c C_D} - \frac{K_{do} C_D}{1 + K_f C_A} \qquad [5.49]$$

que corresponde al esquema de dos reacciones en serie con inhibición competitiva de producto. En la primera se hidrolizan enlaces glucosídicos de cadenas con DP >2 a celobiosa y la enzima está inhibida por este producto; en la segunda reacción la celobiosa se transforma en glucosa y la acción de la β -1,4-glucosidasa está inhibida tanto por el producto como por el sustrato. Este modelo indica que el sistema puede representarse por la acción combinada de las exoglucanasas y de la β -1,4-glucosidasa, de manera que la primera proporciona el sustrato a la segunda.

Las ecuaciones [5.48] y [5.49] se han integrado utilizando el método de Runge-Kutta de cuarto orden y mediante sucesivos tanteos se han obtenido los valores

Tabla 5.20

Valores iniciales y óptimos para las constantes de las ecuaciones [5.39] y [5.40].

Constante	Valor inicial	Valor óptimo
K_{ao} (1/g.min)	3,30	3,40
K_b (1/g)	0	-
K_c (1/g.min)	47,00	25,00
K_{do} (1/g)	0,30	0,23
K_e (1/g)	14,80	-
K_f (1/g)	14,8	14,00

de las constantes cinéticas que mejor ajustan los resultados experimentales; estos valores se indican también en la tabla 5.20. En ésta se observa que los valores estimados y los valores óptimos son semejantes, lo que indica que las hipótesis realizadas para su estimación son correctas.

De la integración de [5.48] y [5.49] se obtienen, para cada valor de C_{S_0} , series de valores de C_A y C_D . En todos los casos C_A aumenta conforme lo hace $C_{E_0} t$, mientras que C_D crece inicialmente, pasa por un máximo y a continuación disminuye debido a su transformación en glucosa. En la figura 5.13 se muestran a título de ejemplo los resultados obtenidos para $C_{S_0} = 666$ mg/l.

En la figura 5.14 se comparan los resultados experimentales y los obtenidos por integración de [5.48] y [5.49]. En esta gráfica se observa que existe una buena concordancia entre ellos ya que las desviaciones máximas encontradas, para el 95% de los datos experimentales, son siempre inferiores al 10%.

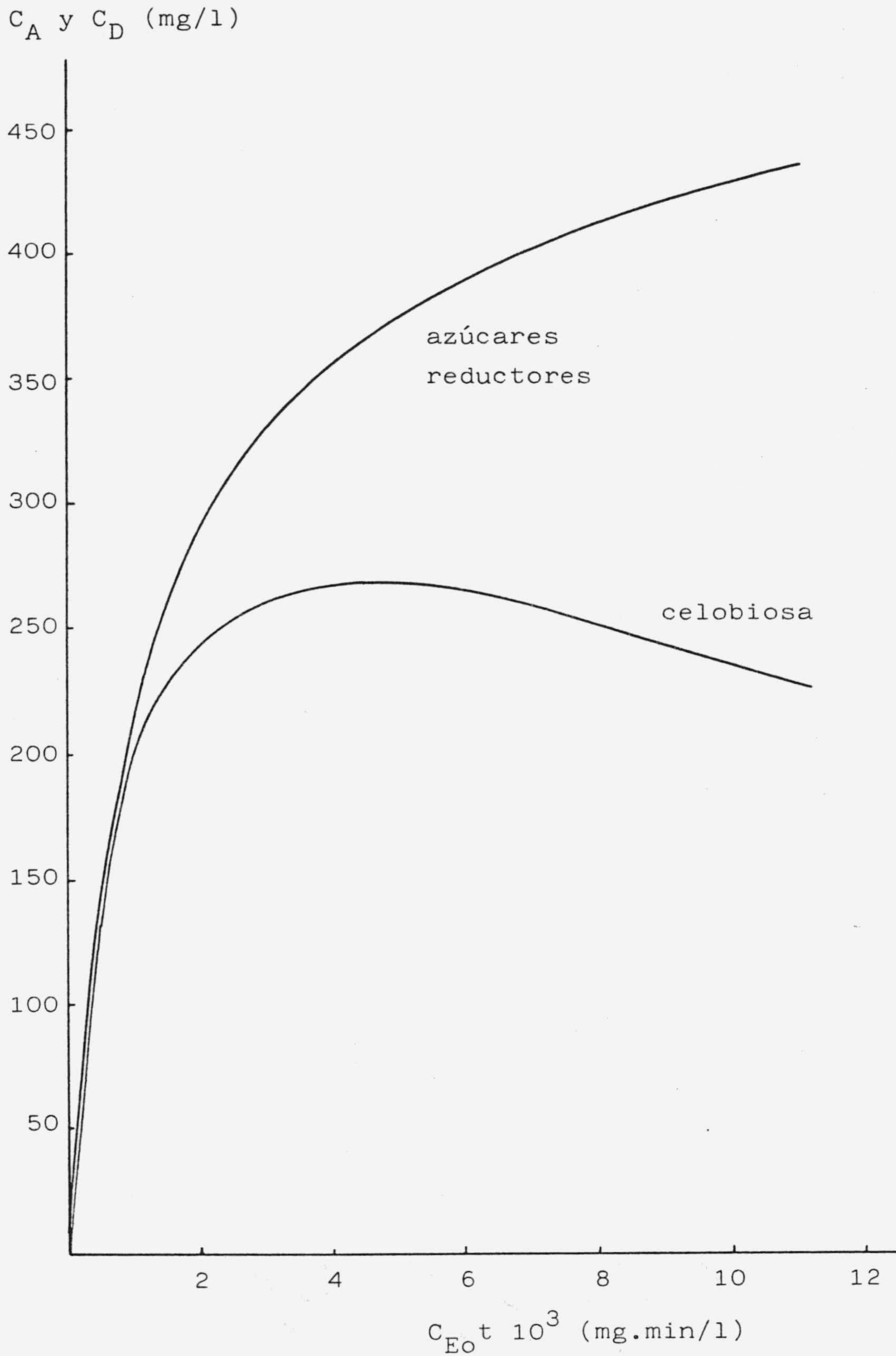


Figura 5.13.- Variación de las concentraciones de azúcares reductores y celobiosa liberados para $C_{S_0} = 666$ mg/l según el modelo cinético propuesto (ecuaciones [5.48] y [5.49]).

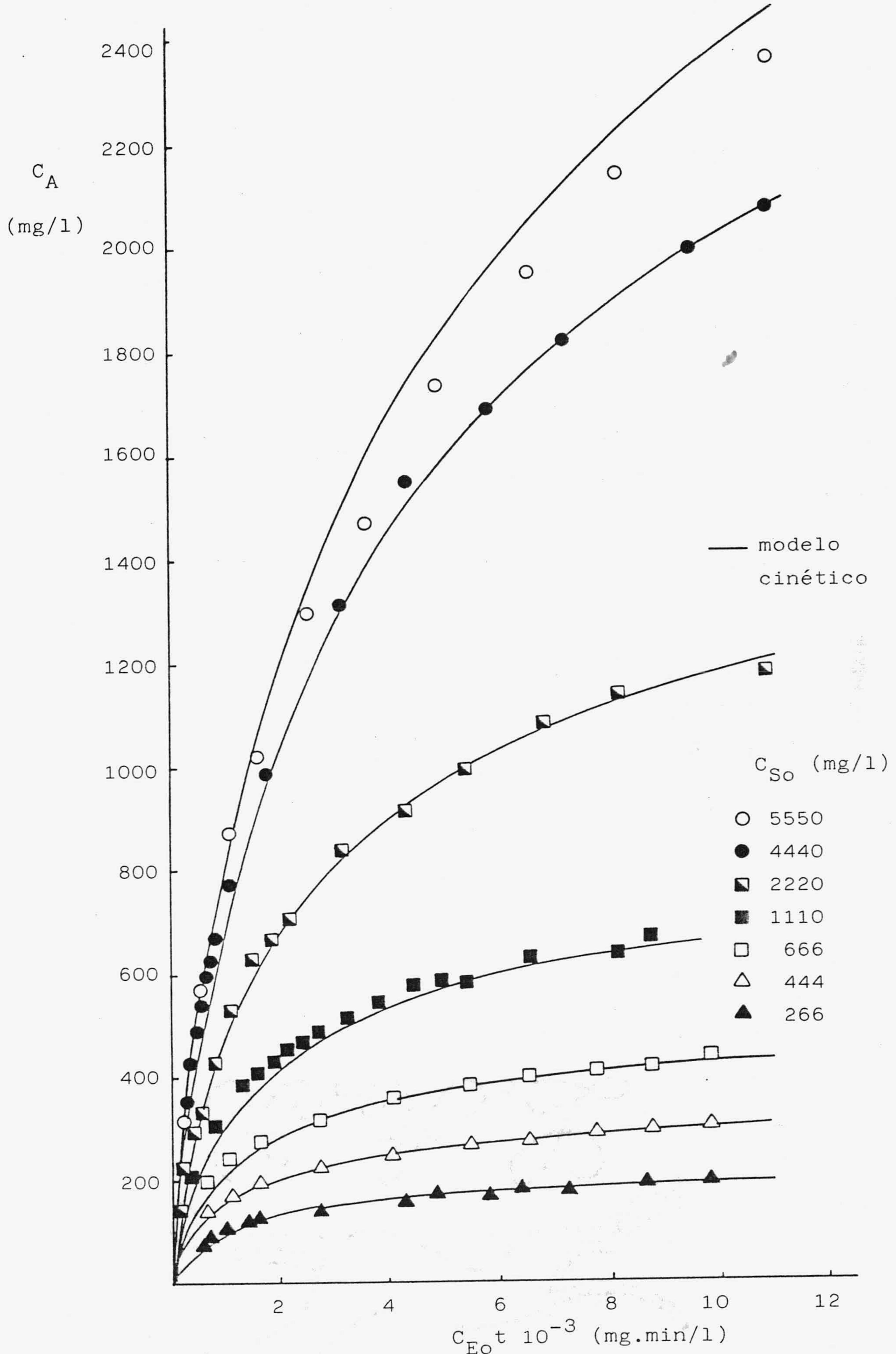


Figura 5.14.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos con el modelo cinético propuesto para la hidrólisis enzimática de CMC (ecuación [5.48]).

5.2. HIDROLISIS ENZIMATICA DE CELULOSA PRETRATADA

La carboximetilcelulosa es un sustrato soluble en agua que ha permitido estudiar la cinética de la hidrólisis enzimática de celulosa sin la complicación adicional de trabajar en un sistema heterogéneo. Por otra parte, parece lógico pensar que la hidrólisis enzimática de un sustrato celulósico no soluble tendrá lugar en dos etapas: una primera en un sistema heterogéneo, en el cual las endo y exoglucanasas hidrolizarán la celulosa hasta liberar sacáridos de grado de polimerización pequeño que pasen a disolución, y una segunda etapa en un sistema homogéneo en el que la hidrólisis continuará hasta la conversión de los sacáridos a glucosa.

Por otra parte, como ya se ha indicado en la Introducción, los sustratos celulósicos naturales son bastante resistentes a la hidrólisis enzimática, ya que un porcentaje importante de la celulosa se encuentra en forma cristalina muy estable y protegida por otros constituyentes que dificultan el contacto de las enzimas con las cadenas de polisacáridos. Por estas razones, es generalmente necesario un pretratamiento del sustrato que facilite el ataque enzimático.

A continuación se discuten los resultados obtenidos al hidrolizar enzimáticamente una celulosa microcristalina (Avicel) que previamente se ha sometido a una serie de pretratamientos a fin de modificar su estructura física, e incluso su grado de polimerización, y aumentar así su susceptibilidad a la hidrólisis enzimática.

Los resultados de la hidrólisis enzimática obtenidos para cada pretratamiento se comparan entre sí y con los obtenidos al hidrolizar celulosa microcristalina sin pretratar.

En el apartado 3.4.2 se describen los agentes de pretratamiento utilizados y la forma en que estos han sido realizados. La tabla 3.8 muestra un resumen de estos pretratamientos y en ella se indica también el porcentaje de sustrato sólido recuperado tras cada pretratamiento y que se somete después a hidrólisis enzimática.

Los resultados obtenidos en la hidrólisis de los distintos pretratados, así como los correspondientes a Avicel sin pretratar (tablas 4.16 a 4.26) se han representado en las figuras 5.15, 5.16 y 5.17. Las dos primeras corresponden a los ensayos de hidrólisis realizados sobre sustratos separados del agente de pretratamiento por centrifugación y lavado. Estas figuras muestran el grado de conversión de la celulosa a azúcares reductores totales y glucosa frente al tiempo de hidrólisis. Como ya se indicó, estas hidrólisis se han realizado manteniendo constante la relación enzima/sustrato ($E/S = 2 \text{ ml/g}$), por lo que esta hidrólisis enzimática tras el pretratamiento es una medida de la efectividad de éste.

En estas figuras (5.15 y 5.16) se observa que el pretratamiento más eficaz es el llevado a cabo con H_2SO_4 del 70%, que eleva la cantidad de azúcares reductores totales obtenidos a las 10 horas casi 30 veces por encima de la obtenida con el sustrato no tratado; en segundo lugar se encuentran los pretratamientos realizados con FeTNa, los cuales consiguen aumentar el rendimiento en azúcares reductores unas 6 veces con respecto a la celulosa sin pretratar; le siguen en eficacia los pretratamientos realizados con NaOH 1,5M, concentración igual a la que contiene el FeTNa en esta base, y es de destacar la escasa influencia del zincoxen sobre los resultados de la hidrólisis, ya que las cantidades de glucosa obtenidas son del mismo orden que las corres-

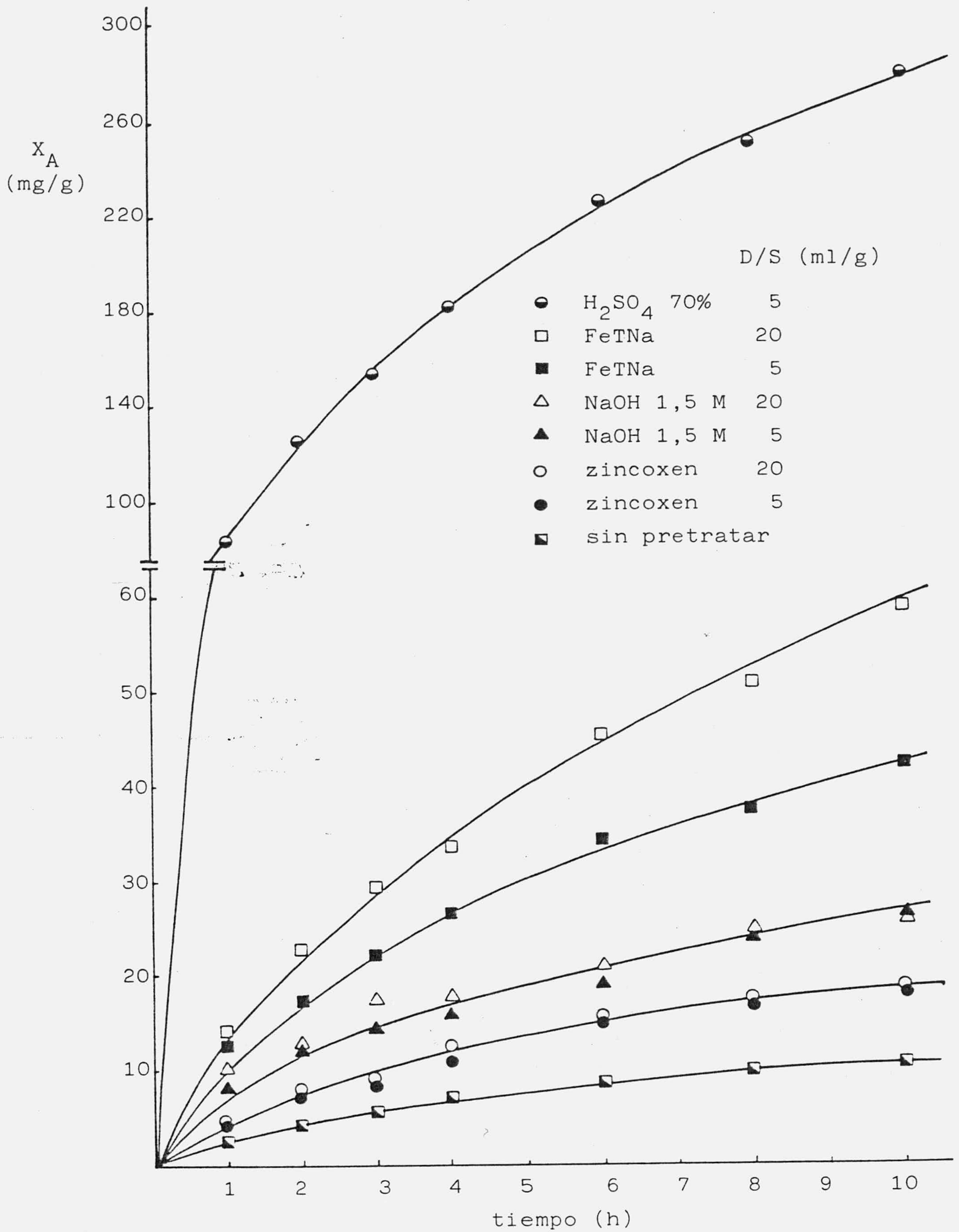


Figura 5.15.- Influencia de distintos pretratamientos sobre la conversión del sustrato a azúcares reductores por hidrólisis enzimática ($E/S = 2 \text{ mg/g}$).

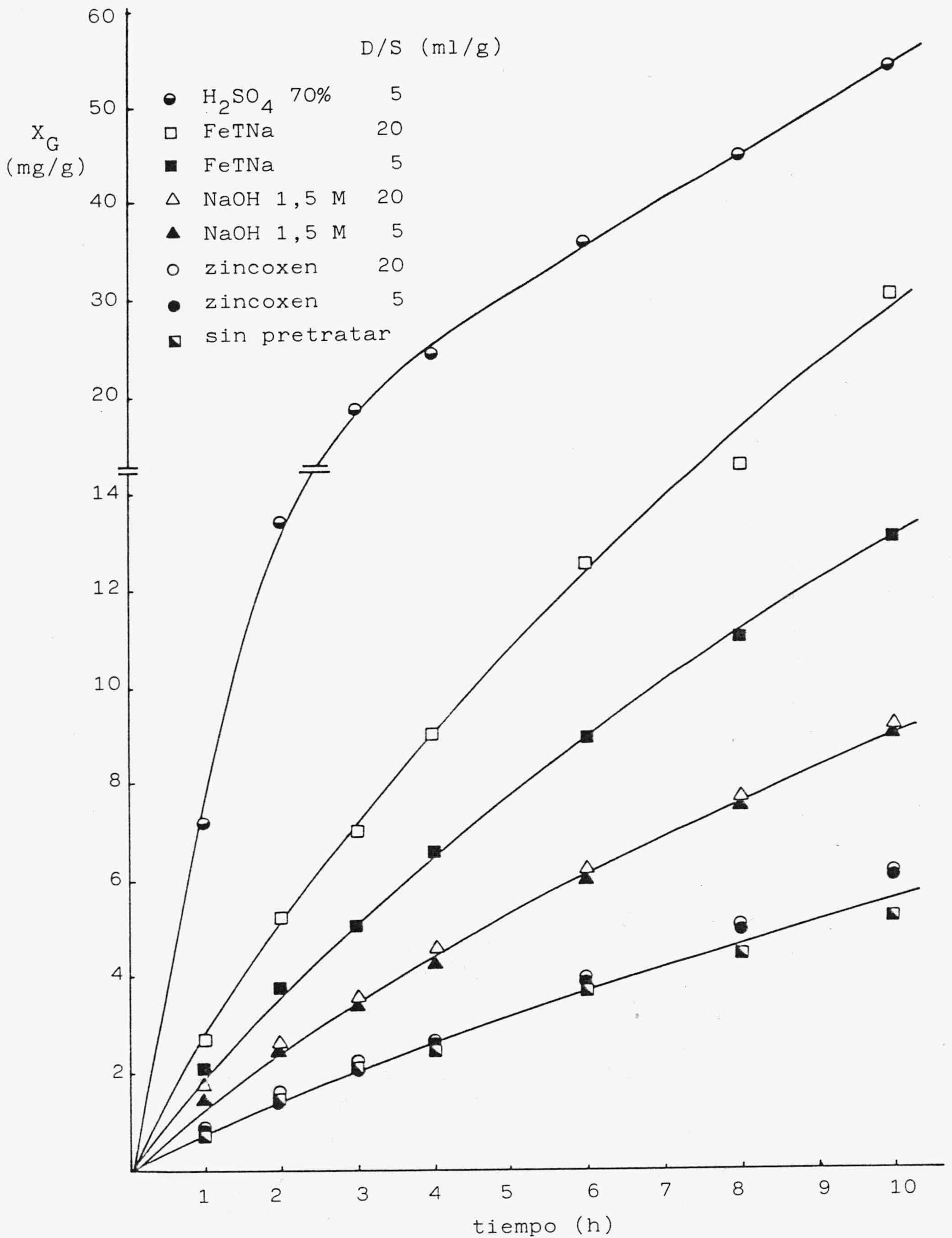


Figura 5.16.- Influencia de los distintos pretratamientos sobre la conversión del sustrato a glucosa por hidrólisis enzimática (E/S = 2 mg/g).

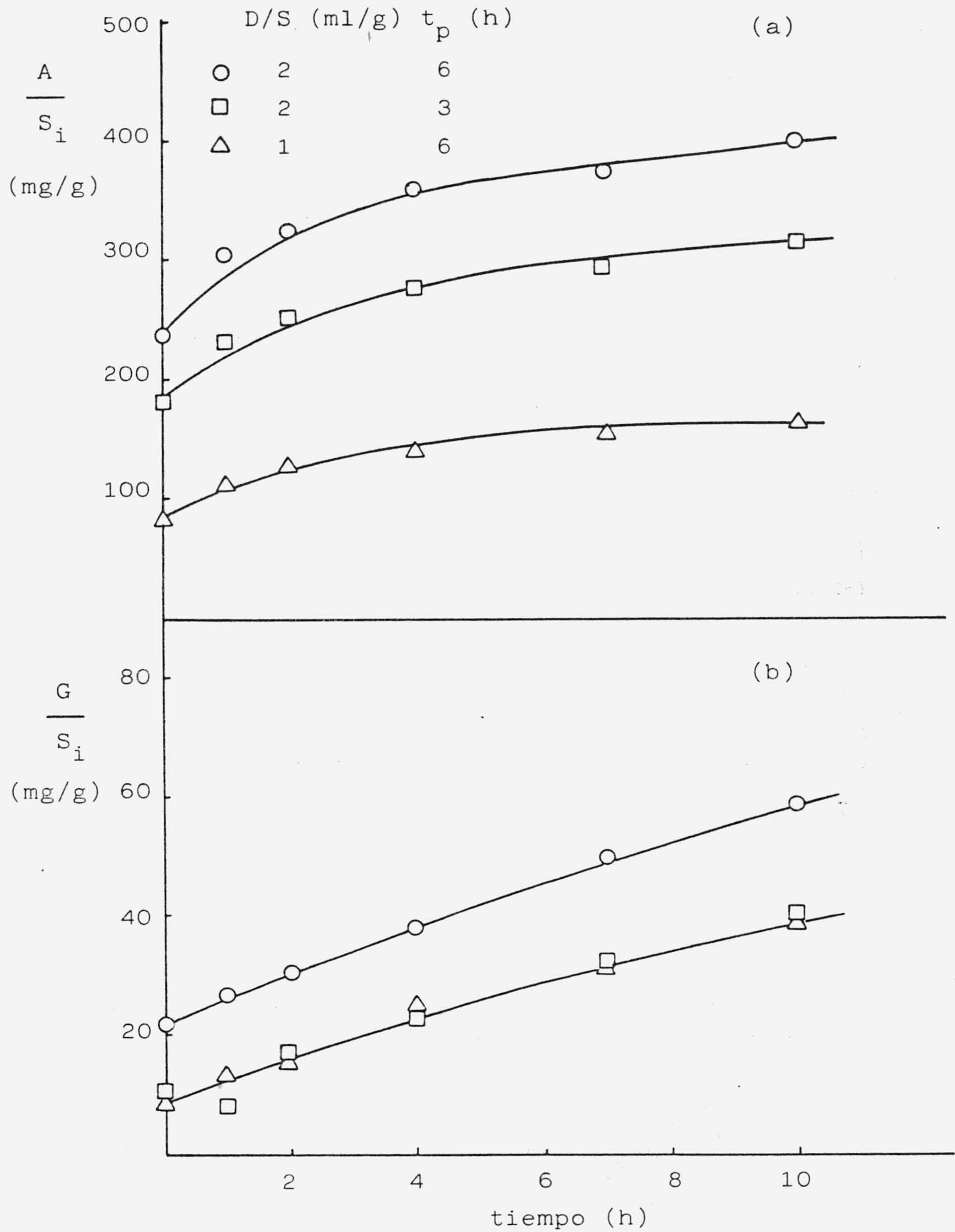


Figura 5.17.- Variación de las cantidades de azúcares reductores (a) y glucosa (b) en la hidrólisis enzimática de celulosa pretratada con H_2SO_4 del 70%.

pondientes a la celulosa sin pretratar (figura 5.16). Este hecho indica que la etilendiamina es menos eficaz como agente de "swelling" que el NaOH, ya que la concentración de etilendiamina en el zincoxen es incluso superior a la del NaOH en el FeTNa, y que el Zn^{2+} es menos eficaz que el Fe^{3+} como ion metálico para romper los enlaces de hidrógeno entre las cadenas de celulosa.

En estas mismas gráficas se muestra la influencia de la relación disolvente/sustrato en los pretratamientos con FeTNa, NaOH 1,5M y zincoxen. En ellas se observa que el aumento de la relación D/S sólo ejerce un efecto apreciable en los experimentos realizados con FeTNa, mientras que en los llevados a cabo con NaOH 1,5M el valor de D/S en el intervalo investigado prácticamente no ejerce influencia alguna en los resultados obtenidos. Esta comparación indica que el aumento de eficacia observada en el caso del FeTNa debe proceder del efecto que ejerce el Fe^{3+} y no del "swelling" debido al NaOH; es decir, el superior rendimiento obtenido con 5 ml/g de FeTNa frente a 20 ml/g de NaOH 1,5M pone de manifiesto que el efecto que ejerce el FeTNa sobre la celulosa se debe sobre todo a la acción acomplejante que los iones Fe^{3+} ejercen sobre los grupos OH de las moléculas de celulosa, lo que contribuye a individualizarlas aumentando el área de contacto sustrato-enzima, mientras que el efecto "swelling" del NaOH contenido en el FeTNa parece contribuir en menor medida, si bien puede resultar imprescindible para facilitar el acceso de los iones Fe^{3+} hasta las moléculas de celulosa.

Hamilton y col. (1984) obtienen resultados similares al aumentar la relación D/S con NaOH 1,5M y FeTNa. Así, mientras que con FeTNa obtuvieron un incremento continuo de la velocidad inicial y de la conversión de Avicel al incrementar la relación D/S desde 5 hasta 20,8 ml/g, con NaOH 1,5M no se incrementaron las

conversiones al aumentar D/S entre los mismos niveles. Estos autores investigaron la influencia de ambos agentes a varios niveles de enzima y observaron que las diferencias entre las conversiones finales obtenidas con uno y otro agente de pretratamiento se hacen menores a medida que aumenta la relación enzima/sustrato utilizada, si bien se mantienen siempre las diferencias en cuanto a las mayores velocidades iniciales de hidrólisis obtenidas con los pretratados de FeTNa; esto parece sugerir que en la práctica es necesario considerar conjuntamente todos los factores implicados (tipo de agente de pretratamiento, relación D/S, relación E/S y tiempo de hidrólisis) para llegar a una solución óptima desde un punto de vista económico.

Como ya se ha mostrado, el pretratamiento más eficaz ha sido el realizado con H_2SO_4 del 70%, si bien conducía a unas pérdidas de sustrato elevadas al separar por centrifugación el sustrato sólido reprecipitado y la fase líquida, en la cual quedaba parte del sustrato como sacáridos de bajo grado de polimerización, producidos por la acción hidrolítica del ácido. Para aprovechar estos sacáridos se realizaron experimentos de pretratamiento con H_2SO_4 del 70% en los cuales no se retiró la fase líquida, que fue llevada junto con el sustrato sólido a hidrólisis enzimática. Los resultados se muestran en las tablas 4.24, 4.25 y 4.26 y se representan en la figura 5.17. En todos los casos se observa que el sustrato ha sufrido una hidrólisis ácida apreciable, que aumenta con D/S y t_p en cuanto al rendimiento en azúcares reductores; en cambio los rendimientos en glucosa ponen de manifiesto que el pretratamiento realizado con D/S= 2 ml/g y t_p = 3 h es equivalente al realizado con 1 ml/g y 6 h.

Este modo de operar puede tener el inconveniente

de que una alta concentración inicial de productos (glucosa y sacáridos solubles) ejerzan sobre las celulasas un efecto inhibitor prácticamente desde tiempo cero, lo cual haría descender el rendimiento de la hidrólisis enzimática. Esto parece ponerse de manifiesto si representamos las cantidades de azúcares reductores y glucosa obtenidos por hidrólisis enzimática de todos los pretratados con H_2SO_4 ; esta representación se muestra en la figura 5.18 y en ella se observa que en los pretratamientos en que no se han hecho lavados la velocidad de hidrólisis es inferior ya desde tiempo cero, tanto en la producción de azúcares reductores totales como en la producción de glucosa, lo que, aunque en algún caso puede ser debido al tipo de sustrato obtenido tras el pretratamiento con ácido, también puede ser consecuencia de la inhibición de las celulasas por parte de los productos.

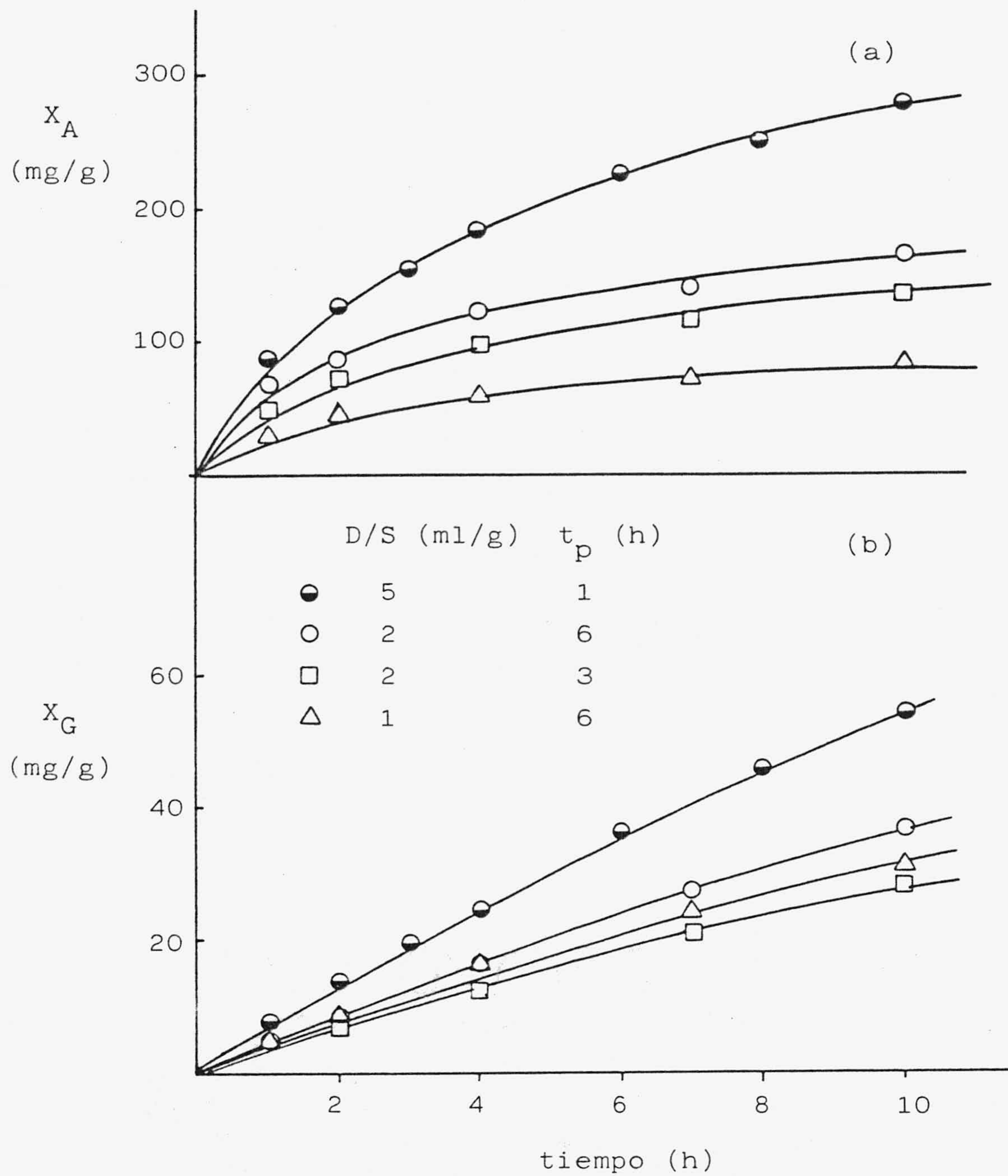


Figura 5.18.- Influencia de los pretratamientos con H_2SO_4 del 70% sobre la conversión del sustrato a azúcares reductores (a) y glucosa (b) por hidrólisis enzimática ($E/S = 2$ mg/g).

5.2.1. Ajuste empírico de los resultados experimentales

La efectividad de los distintos pretratamientos se ha comparado cuantitativamente entre sí admitiendo un esquema de reacción para la hidrólisis enzimática del sustrato semejante al propuesto para la hidrólisis enzimática de caboximetilelulosa, Caminal y col. (1985), es decir



donde E_x representa la fracción de endo y exoglucanasas presentes en el complejo enzimático y E_3 es la fracción de β -1,4-glucosidasa.

Según este esquema la primera reacción transcurrirá en la interfase sustrato-medio acuoso, liberando fundamentalmente celobiosa y otros sacáridos de $DP > 2$, por tanto, se comprende que la eficacia de un pretratamiento vendrá dada, para una misma relación D/S y análogas condiciones de hidrólisis, por la cantidad de sacáridos solubles liberados en la hidrólisis enzimática, que evidentemente estará relacionada, en nuestro caso, con una disminución de la cristalinidad y/o un aumento del área interfacial específica.

Se han calculado, por tanto, las conversiones de la celulosa a sacáridos solubles de $DP > 1$, X_D , en la forma

$$x_D = \frac{A - A_0}{S_i} - \frac{G - G_0}{S_i} \quad [5.51]$$

donde A y A_0 representan las cantidades de azúcares reductores totales, expresados como glucosa equivalente, a tiempos de hidrólisis t y cero respectivamente, G y

G_0 representan las cantidades de glucosa en esos mismos instantes y S_i es la cantidad de celulosa inicial en la hidrólisis enzimática.

Los valores de X_D calculados a partir de los resultados experimentales (tablas 4.16 a 4.26) se muestran en las tablas 5.21 a 5.25 y se han representado en las figuras 5.19 y 5.20. En los pretratamientos realizados con zincoxen y NaOH 1,5M (tablas 5.22 y 5.23) no se ha encontrado prácticamente diferencia entre los resultados obtenidos para $D/S = 5$ ml/g y $D/S = 20$ ml/g, por lo que en la figura 5.19 se han representado los valores medios de los resultados de X_D obtenidos a un mismo tiempo con ambas relaciones D/S ; estos valores medios se tabulan también en las tablas 5.22 y 5.23 y serán los que se utilicen en adelante.

En la figura 5.20 destaca la alta velocidad de producción de cadenas solubles de $DP > 1$ que muestra en todo momento el pretratado con $D/S = 5$ ml/g y $t_p = 1$ h y también el brusco descenso en esta velocidad que presenta la hidrólisis del pretratado con $D/S = 1$ ml/g y $t_p = 6$ h; esto puede deberse, además de a la inhibición ya mencionada, a que el pretratamiento no ha afectado homogéneamente a todo el sustrato debido a la baja relación D/S utilizada, pudiendo haber zonas superficiales a las que el ácido ha llegado mejor y por tanto se hidrolizan con más rapidez.

Los valores de X_D representados en las figuras 5.19 y 5.20 se han ajustado a dos modelos empíricos, el modelo hiperbólico, propuesto por Holtzaple y col. (1984) y cuya expresión es

$$X_D = X_{Dm\acute{a}x} \frac{t}{t_{1/2} + t} \quad [5.52]$$

Tabla 5.21

Hidrólisis enzimática de celulosa sin pretratar: variación de la cantidad de azúcares reductores de DP > 1 solubilizados con el tiempo. pH = 4,9, 40°C y E/S=2 mg/g.

$$S_i = 5,0 \text{ g}$$

t(h)	X_D (mg/g)
1	1,8
2	2,6
3	3,5
4	4,7
6	4,9
8	5,1
10	5,2



Tabla 5.22

Hidrólisis enzimática de celulosa tratada con zincoxen ($t_p = 6$ h): variación de la cantidad de azúcares reductores de $DP > 1$ solubilizados con el tiempo. pH 4,9, 40°C y E/S = 2 mg/g.

$$S_i = 5,0 \text{ g}$$

t (h)	X_D (mg/g)		
	D/S=5 ml/g	D/S=20 ml/g	Valor medio
1	5,6	6,0	5,8
2	8,5	7,5	8,0
3	8,5	9,2	8,9
4	10,1	10,8	10,5
6	10,9	11,1	11,0
8	12,0	12,2	12,1
10	13,1	12,9	13,0

Tabla 5.23

Hidrólisis enzimática de celulosa tratada con NaOH 1,5M ($t_p = 6$ h): variación de la cantidad de azúcares reductores de DP > 1 solubilizados con el tiempo de hidrólisis. pH = 4,9, 40°C y E/S = 2 mg/g.

$$S_i = 5,0 \text{ g}$$

t (h)	X_D (mg/g)		
	D/S=5 ml/g	D/S=20 ml/g	Valor medio
1	6,6	8,3	7,5
2	9,5	10,2	9,9
3	10,8	13,8	12,3
4	11,4	13,3	12,4
6	13,0	15,0	14,0
8	16,2	17,1	16,7
10	17,5	16,5	17,0

Tabla 5.24

Hidrólisis enzimática de celulosa tratada con FeTNa ($t_p = 6$ h): variación de la cantidad de azúcares reductores de $DP > 1$ solubilizados con el tiempo de hidrólisis. pH = 4,9, 40°C y E/S = 2 mg/g.

$$S_i = 4,8 \text{ g}$$

t (h)	X_D (mg/g)	
	D/S=5 ml/g	D/S=20 ml/g
1	10,3	11,3
2	13,4	18,0
3	17,0	22,7
4	20,0	24,4
6	25,0	32,9
8	26,3	36,4
10	28,9	41,0

Tabla 5.25

Hidrólisis enzimática de celulosa tratada con H_2SO_4 del 70%: variación de la cantidad de azúcares reductores de DP > 1 con el tiempo de hidrólisis. pH 4,9, 40°C y E/S = 2 mg/g.

t (h)	D/S / t_p	X_D (mg/g)			
		5/1	2/6	2/3	1/6
1		77,1	63,9	49,8	24,5
2		112,6	77,1	67,1	35,9
3		134,9	-	-	-
4		157,3	106,3	84,0	41,9
6		190,5	-	-	-
7		-	112,0	92,9	47,5
8		204,8	-	-	-
10		223,8	129,0	105,3	52,5

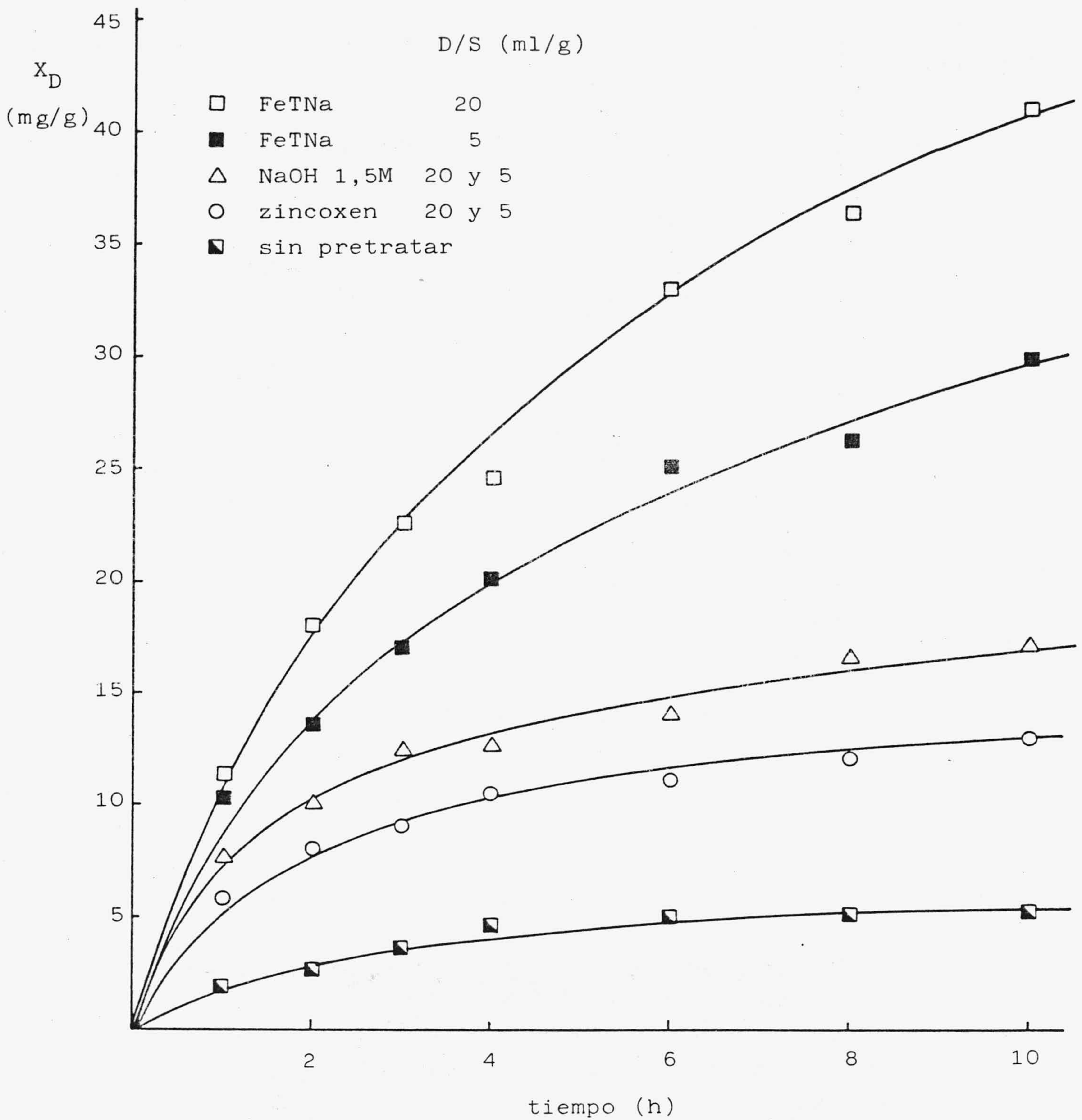


Figura 5.19.- Influencia de distintos pretratamientos sobre la conversión del sustrato a azúcares reductores solubles de $DP > 1$ por hidrólisis enzimática ($E/S = 2 \text{ mg/g}$).

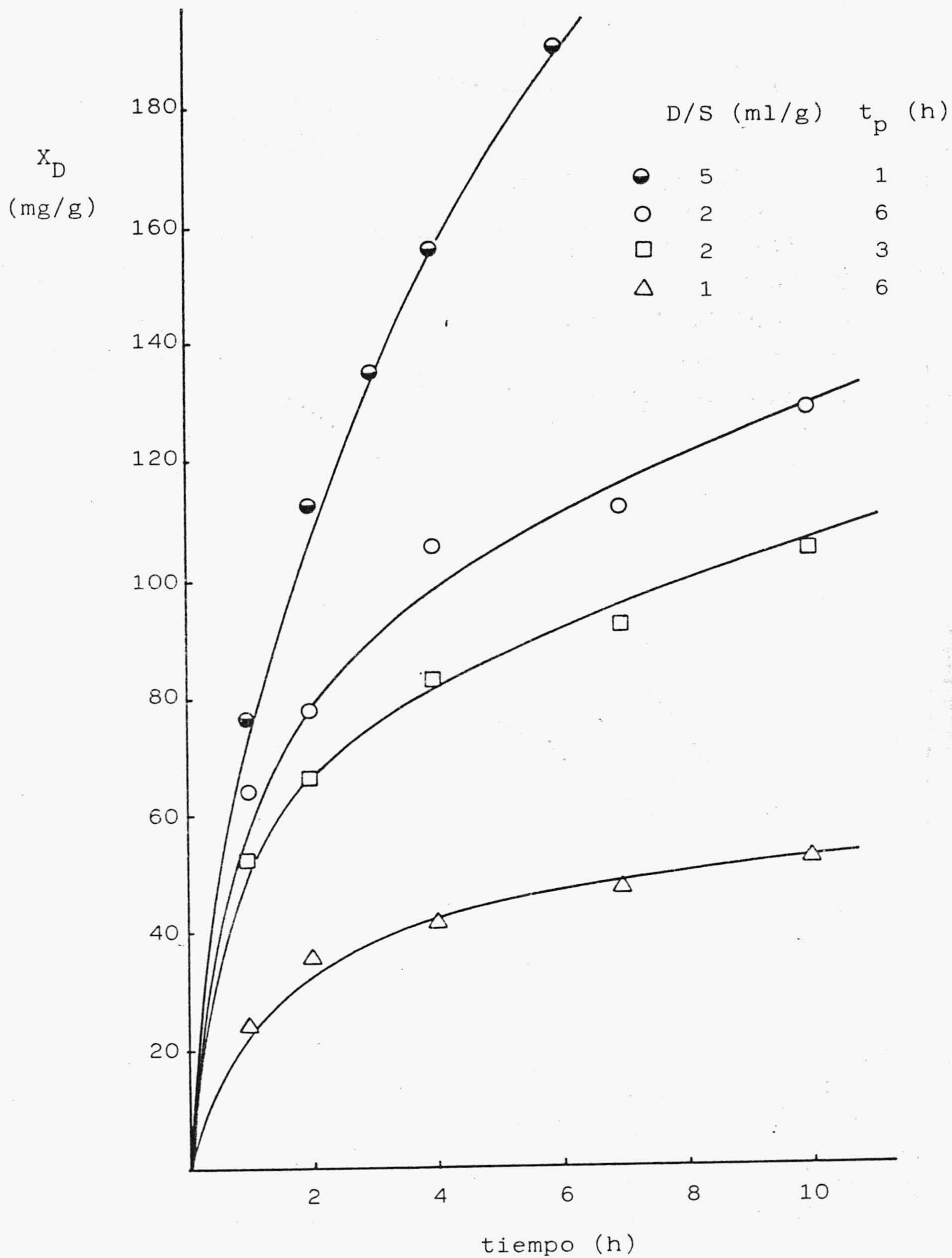


Figura 5.20.- Influencia de distintos pretratamientos con H_2SO_4 del 70% sobre la conversión del sustrato a azúcares reductores solubles de $DP > 1$ por hidrólisis enzimática ($E/S = 2$ mg/g).

donde X_{Dmax} representa la máxima conversión que es posible conseguir y $t_{1/2}$ es el tiempo que tarda en alcanzarse $(1/2)X_{Dmax}$; y el modelo potencial, propuesto por Walseth (1952) y representado por la ecuación

$$X_D = K t^n \quad [5.53]$$

donde K y n son parámetros empíricos.

El modelo hiperbólico es posible linealizarlo en la forma

$$\frac{1}{X_D} = \frac{1}{X_{Dmax}} + \frac{t_{1/2}}{X_{Dmax}} \frac{1}{t} \quad [5.54]$$

por tanto, si este modelo reproduce los resultados obtenidos, al representar $1/X_D$ frente a $1/t$ se obtendrían líneas rectas de cuyas pendientes y ordenadas en el origen será posible calcular X_{Dmax} y $t_{1/2}$. Estas rectas se han representado en las figuras 5.21 y 5.22; como se observa, este modelo parece ajustar aceptablemente los valores obtenidos de las cantidades de azúcares reductores de DP > 1. Los valores de X_{Dmax} y $t_{1/2}$ hallados por regresión lineal se han optimizado mediante el método Simplex, haciendo mínima la suma de los valores absolutos de los errores relativos; los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.26. En las figuras 5.23 y 5.24 se comparan los datos experimentales con los calculados mediante la ecuación [5.52], que representa este modelo, utilizando los parámetros optimizados que se muestran en la tabla 5.26; de nuevo se observa una buena concordancia entre ambos ya que las desviaciones encontradas son inferiores al 10%.

La ecuación [5.53], que representa el modelo potencial, es posible linealizarla en la forma

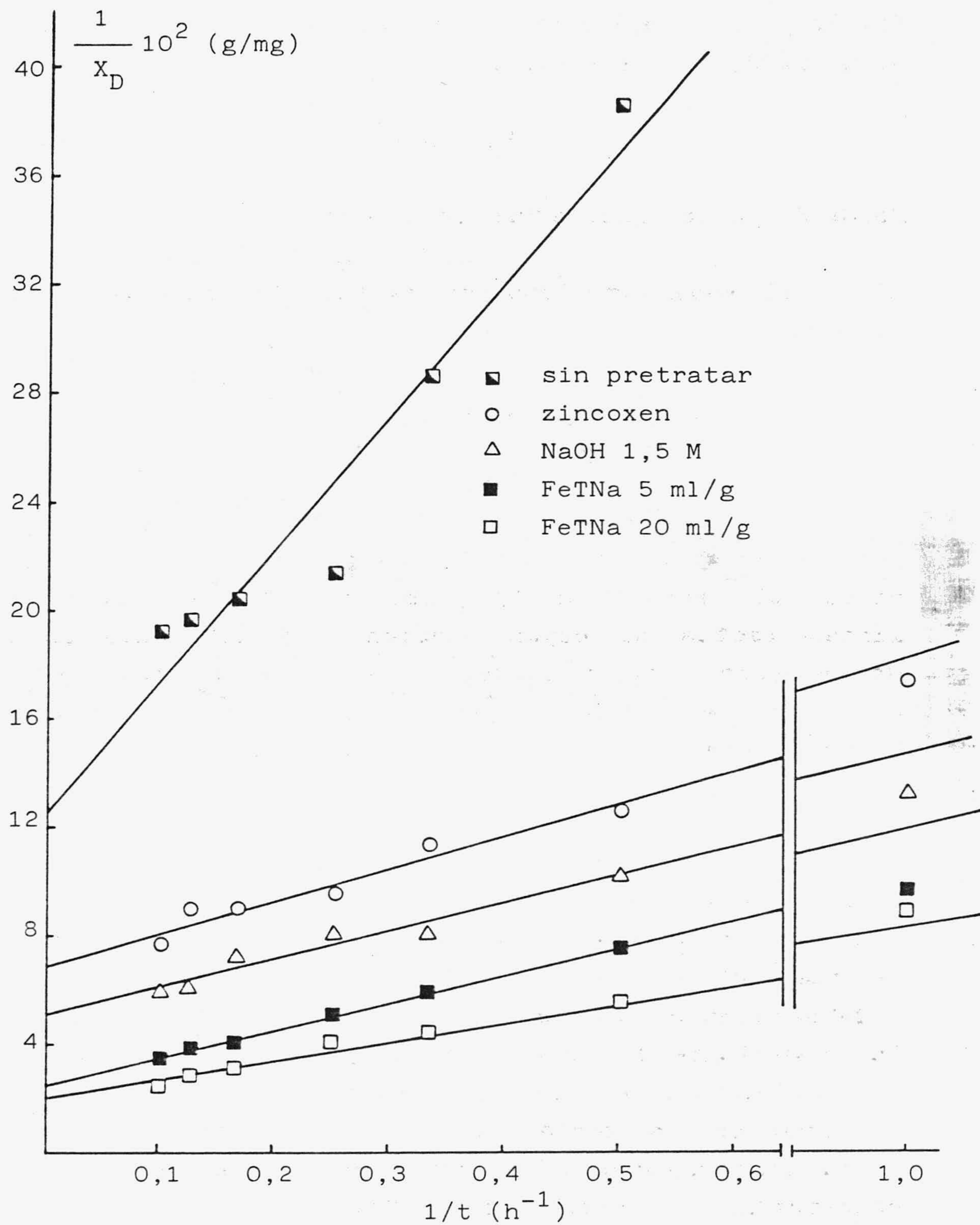


Figura 5.21.- Modelo hiperbólico: ajuste de los resultados de la hidrólisis enzimática de los sustratos sometidos a distintos pretratamientos (ecuación [5.54]).

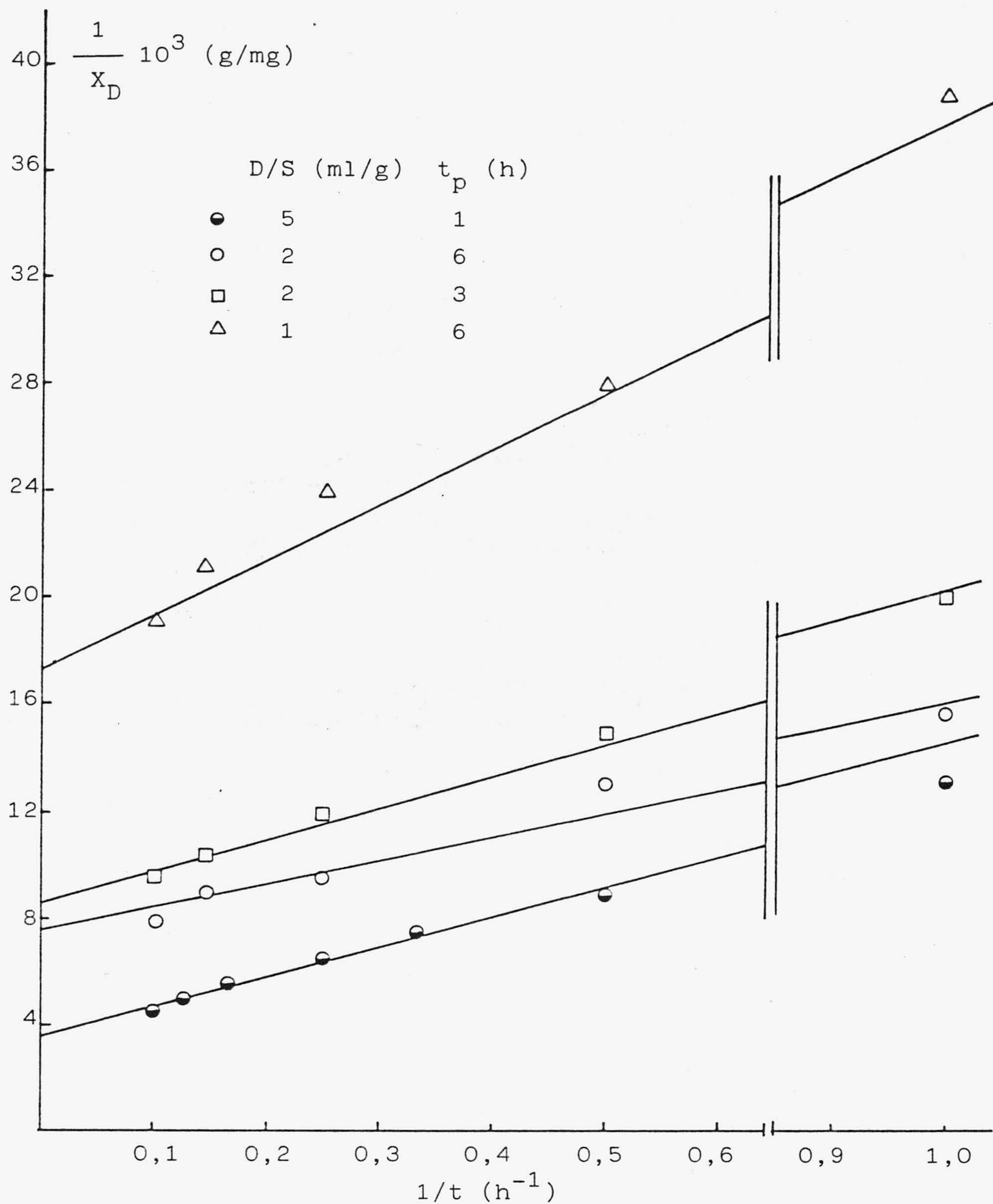


Figura 5.22.- Modelo hiperbólico: ajuste de los resultados de la hidrólisis enzimática de los sustratos sometidos a pretratamientos con H_2SO_4 del 70% (ecuación [5.54]).

Tabla 5.26

Parámetros del modelo hiperbólico, X_{Dmax} y $t_{1/2}$ (ecuación [5.52]).

Pretratamientos	D/S (ml/g)	D_o/S_i (mg/g)	X_{Dmax} (mg/g)	$t_{1/2}$ (h)
Sin pretratar	-	-	6,9	2,73
zincoxen 6 h	5 y 20	-	14,6	1,68
NaOH 1,5 M 6 h	5 y 20	-	19,8	1,96
FeTNa 6 h	5	-	38,4	3,49
FeTNa 6 h	20	-	59,8	4,98
H ₂ SO ₄ 70% 1 h	5	-	220,2	1,73
H ₂ SO ₄ 70% 6 h	2	215,2	141,3	1,41
H ₂ SO ₄ 70% 3 h	2	169,1	113,8	1,30
H ₂ SO ₄ 70% 6 h	1	72,3	58,0	1,35

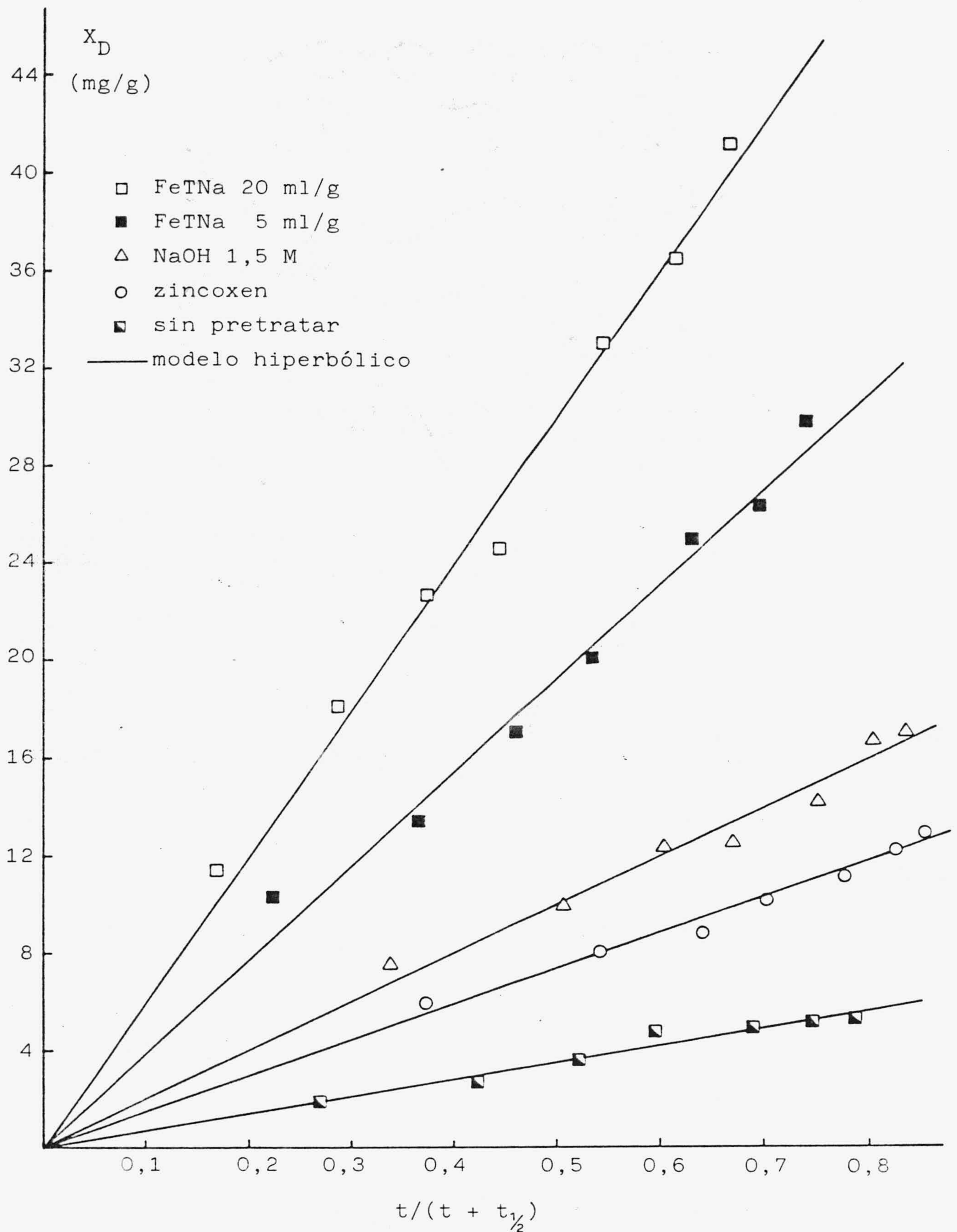


Figura 5.23.- Modelo hiperbólico: comparación de los datos experimentales de hidrólisis enzimática de los sustratos sometidos a distintos pretratamientos y los obtenidos con el modelo (ecuación [5.52]).

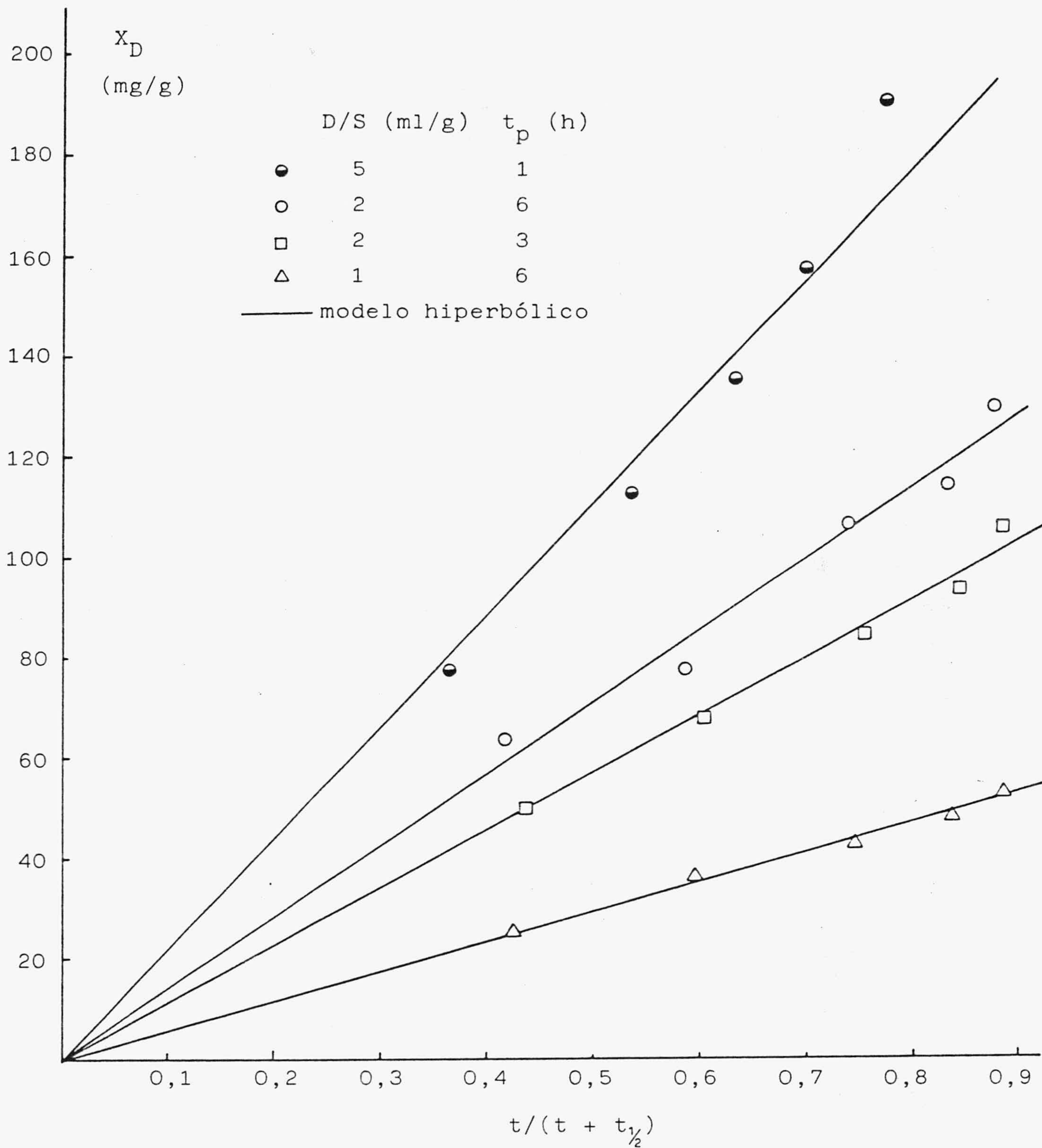


Figura 5.24.- Modelo hiperbólico: comparación de los datos experimentales de hidrólisis enzimática de los sustratos sometidos a pretratamientos con H_2SO_4 del 70% y los obtenidos con el modelo (ecuación [5.52]).

$$\ln X_D = \ln K + n \ln t \quad [5.55]$$

Esta linealización ha dado valores de n en torno a 0,5 para todos los pretratamientos en que se retiraron los sacáridos iniciales producidos en el pretratamiento, valor que coincide con el propuesto por Schutz (1885). En los pretratamientos con H_2SO_4 del 70% en que no se retiraron los sacáridos iniciales el valor obtenido para n ha sido de 0,3. Este menor exponente con respecto al tiempo de hidrólisis puede atribuirse a lo ya observado en las figuras 5.18 y 5.20, es decir a la inhibición que desde tiempo cero sufren las celulasas por la presencia inicial de los productos de reacción a que dan lugar.

En las figuras 5.25 y 5.26 se ha representado X_D frente a t^n ; como se observa este modelo reproduce adecuadamente los resultados experimentales obtenidos. En la tabla 5.27 se dan los valores de K y n obtenidos para cada pretratamiento.

Según lo expuesto n dependería de la cantidad relativa de productos de inhibición con respecto a la cantidad de celulasas presentes en el medio. En este sentido Holtzapple y col. (1984) han propuesto un valor de n constante igual al propuesto por Schutz (1885) y han correlacionado K con la concentración de enzima activa mediante una expresión de tipo potencial, incluyendo así en la ecuación del modelo una inhibición de producto.

En nuestro caso, y dados los cortos tiempos de reacción utilizados, n puede mantenerse constante para cada experimento de hidrólisis, representando con su valor el descenso de la efectividad de la hidrólisis enzimática debido a la presencia de productos de inhibi-

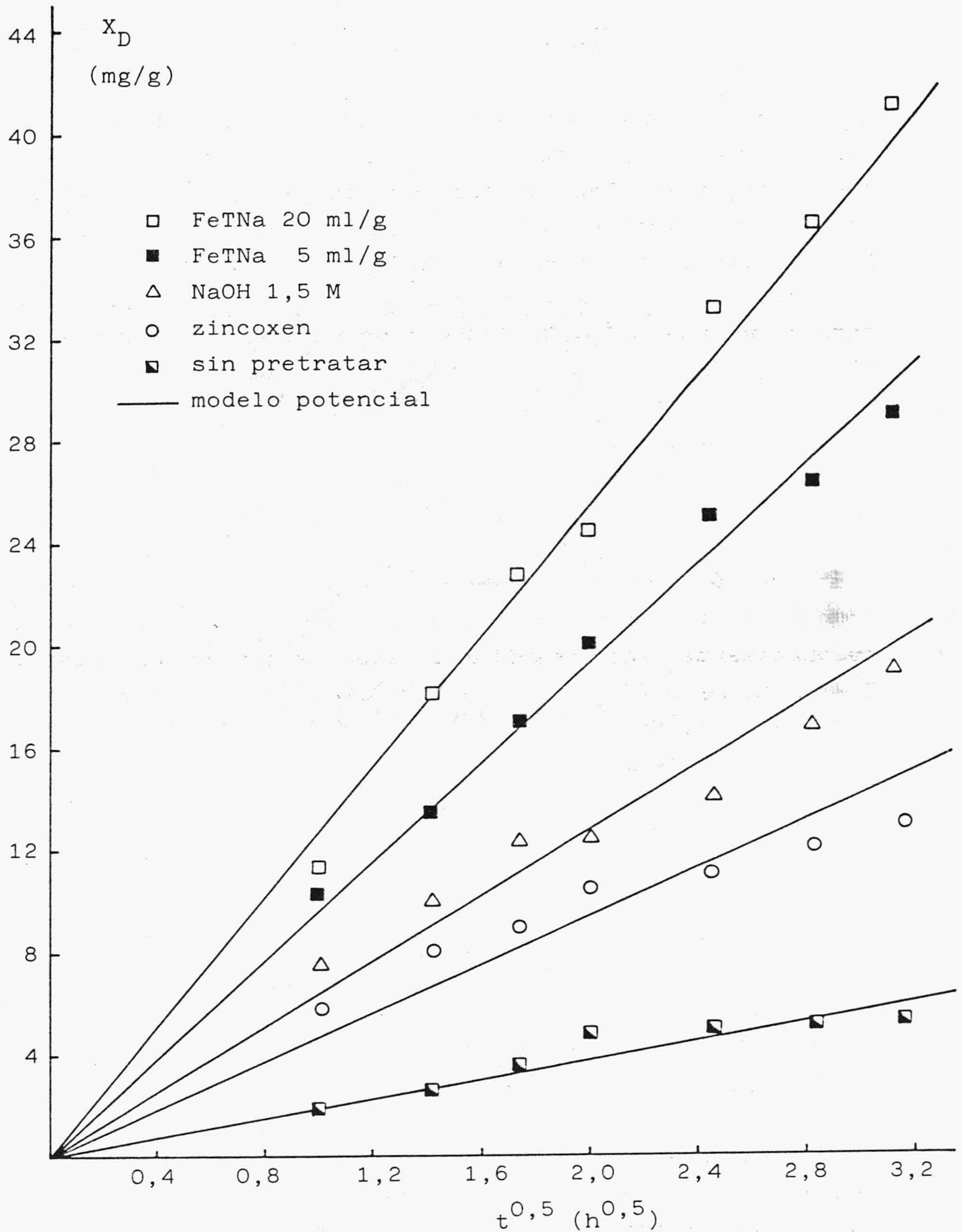


Figura 5.25.- Modelo potencial: comparación de los resultados experimentales de la hidrólisis enzimática de sustratos sometidos a distintos pretratamientos y los obtenidos con el modelo (ecuación [5.53]).

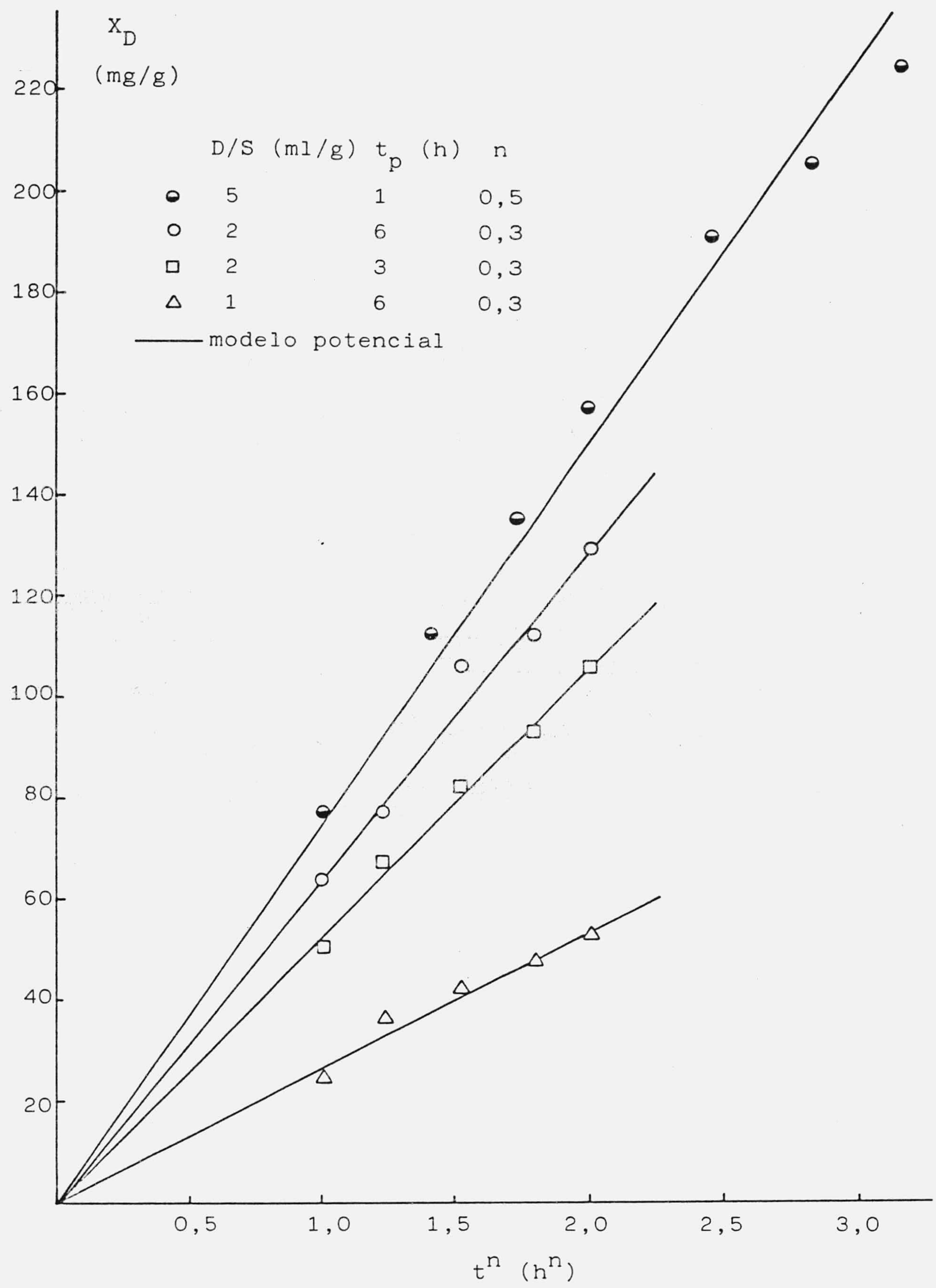


Figura 5.26.- Modelo potencial: comparación de los datos experimentales de hidrólisis enzimática de sustratos pretratados con H_2SO_4 del 70% y los obtenidos con el modelo (ecuación [5.53]).

Tabla 5.27

Valores de los parámetros del modelo potencial K y n (ecuación [5.53]).

Pretratamientos	t_p (h)	D/S (ml/g)	K (h g/mg)	n
Sin pretratar	-	-	1,9	0,5
zincoxen	6	20 y 5	4,7	0,5
NaOH 1,5M	6	20 y 5	6,4	0,5
FeTNa	6	5	9,7	0,5
FeTNa	6	20	12,7	0,5
H ₂ SO ₄ 70%	1	5	76,4	0,5
H ₂ SO ₄ 70%	6	2	64,7	0,3
H ₂ SO ₄ 70%	3	2	52,9	0,3
H ₂ SO ₄ 70%	6	1	26,8	0,3

ción a tiempo cero.

Así pues tanto el modelo potencial como el hiperbólico pueden ser usados para correlacionar la conversión del sustrato con respecto al tiempo. Holtzapple y col. (1984) introducen en estas correlaciones las concentraciones de enzima y de inhibidor, que son útiles para procesos de diseño, dado que estos también son parámetros de interés económico. Debe hacerse notar que debido a la naturaleza empírica de estos modelos no son válidas las predicciones fuera del rango de los datos experimentales.

Ambos modelos tienen características comunes y también presentan contradicciones con respecto a los modelos teóricos de hidrólisis de celulosa que se presentan en bibliografía, Holtzapple y col. (1984). Así los modelos teóricos preveen una velocidad de reacción inicial finita, aspecto que sí contempla el modelo hiperbólico pero no el modelo potencial, que prevee una velocidad cero a tiempo cero. Con respecto a tiempos infinitos el modelo potencial prevee conversiones infinitas, lo que no es posible, mientras que el modelo hiperbólico prevee una conversión máxima finita, lo que aún estando más cerca de la realidad tampoco es coherente con la práctica, puesto que según los modelos teóricos parece que la hidrólisis completa de la celulosa es posible después de un tiempo infinito. No obstante, estos defectos no son importantes, ya que desde un punto de vista económico lo interesante son tiempos finitos y cortos.

5.2.2. Comparación de la eficacia de los pretratamientos ensayados

Según lo expuesto, un pretratamiento será tanto más efectivo cuanto mayor sea la susceptibilidad que presenta el sustrato pretratado a ser hidrolizado por las celulasas a azúcares reductores solubles de $DP > 1$.

Existen varios parámetros que pueden dar una medida de esta susceptibilidad, pero para evitar al máximo interferencias de otros factores, como los productos de inhibición, cuya concentración crece en el transcurso de la reacción, parece lógico pensar que las velocidades iniciales de reacción pueden resultar una medida precisa de esta eficacia.

Las velocidades iniciales de reacción se han obtenido a partir de la ecuación [5.52] (modelo hiperbólico) ya que a partir del modelo potencial la velocidad inicial sería cero, por tanto, derivando [5.52] se obtiene

$$\frac{dX_D}{dt} = \frac{X_{Dmax} t_{1/2}}{(t_{1/2} + t)^2} \quad [5.56]$$

y, puesto que $r = r_0$ para $t = 0$, se obtiene

$$r_0 = \frac{X_{Dmax}}{t_{1/2}} \quad [5.57]$$

Los resultados obtenidos para las velocidades iniciales se muestran en la tabla 5.28; en esta tabla también se da una medida de la eficacia relativa de estos pretratamientos con respecto al sustrato sin pretratar, calculada a partir de las velocidades iniciales.

Tabla 5.28

Velocidades iniciales de producción de sacáridos de DP >1 y eficacias relativas de los distintos pretratamientos ensayados.

Pretratamientos	t_p (h)	D/S (ml/g)	r_o (mg/g.h)	$r_o/2,5$
Sin pretratar	-	-	2,5	1,0
zincoxen	6	5 y 20	8,7	3,5
NaOH 1,5M	6	5 y 20	10,1	4,0
FeTNa	6	5	11,0	4,4
FeTNa	6	20	12,0	4,8
H ₂ SO ₄ 70%	1	5	127,3	50,9
H ₂ SO ₄ 70%	6	2	100,2	40,1
H ₂ SO ₄ 70%	3	2	87,5	35,0
H ₂ SO ₄ 70%	6	1	43,1	17,2

Como se observa, cualquier pretratamiento aumenta mucho la velocidad inicial de la hidrólisis a este nivel de enzima (2 mg/g de sustrato) ya que incluso el zincoxén hace que la velocidad inicial aumente más de tres veces. También se observa que ningún pretratamiento es comparable a los realizados con H_2SO_4 del 70%, ya que incluso con una relación D/S = 2 ml/g, a la cual el ácido difícilmente moja todo el sustrato, se consigue incrementar la velocidad inicial más de 40 veces con respecto al sustrato sin pretratar. No obstante, los pretratamientos con H_2SO_4 del 70% pueden tener el inconveniente de degradar el sustrato dando productos indeseables si el pretratamiento se hace en condiciones algo enérgicas (temperaturas altas y/o tiempos de contacto prolongados). Esto es consecuencia del efecto hidrolítico del H_2SO_4 que produce sacáridos solubles, los cuales, si permanecen en contacto con el ácido, son degradados tanto más rápidamente cuanto más alta sea la temperatura.

El FeTNa no ejerce efecto hidrolítico alguno sobre los enlaces β -1,4-glucosídicos, sino un efecto "swelling" e individualizador de las moléculas de celulosa, lo que hace que sea un pretratamiento menos eficaz pero más limpio, si bien para que sea viable desde un punto de vista económico es totalmente necesaria la recuperación del disolvente.

Para los pretratamientos realizados con H_2SO_4 del 70% ha sido posible correlacionar las velocidades iniciales con el tiempo de pretratamiento, t_p , y con la relación D/S, figura 5.27, obteniéndose que

$$r_o = 2,8 (D/S) t_p^{0,3} \quad [5.58]$$

donde D/S está expresado en ml/g y t_p en horas. A partir de esta expresión es posible optimizar la influen-

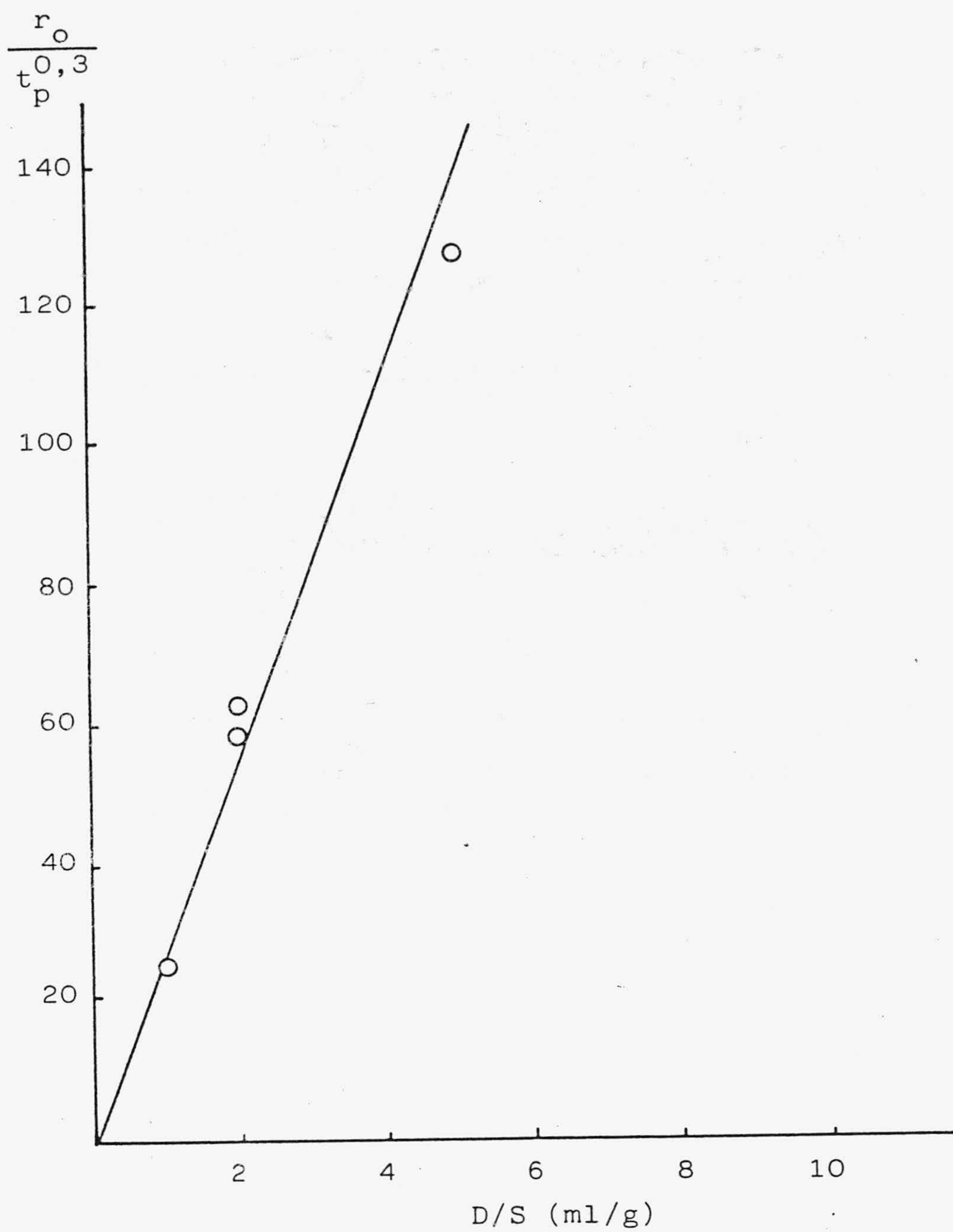


Figura 5.27.- Correlación de las velocidades iniciales de hidrólisis enzimática con los tiempos de pretratamiento y las relaciones D/S, para los pretratamientos realizados con H_2SO_4 del 70%.

cia de t_p y D/S en el intervalo investigado.

Además de la velocidad inicial pueden utilizarse otros parámetros para medir la eficacia del pretratamiento, así Holtzaple y col. (1984) han comprobado que la conversión máxima (X_{Dmax}) depende sólo de la concentración de enzima y no de la concentración de sustrato, por lo que han considerado este parámetro como una medida de la susceptibilidad enzimática del sustrato. También los parámetros del modelo potencial, K y n, pueden ser considerados como una medida de la eficacia del pretratamiento, ya que, como se ha comprobado, K está en relación directa con esta eficacia y n puede depender de la presencia de inhibidores si se obtiene según la linealización [5.55].

Pero desde un punto de vista práctico, además de una velocidad inicial alta también interesa una alta conversión del sustrato pretratado a tiempos de hidrólisis relativamente cortos. Por ello, también se ha utilizado como medida de la eficacia del pretratamiento la conversión de la celulosa a sacáridos solubles, X_S .

Para el cálculo de X_S se utilizan las conversiones de la glucosa a sacáridos de DP > 1, X_D , que se muestran en las tablas 5.21 a 5.25; estas conversiones están expresadas en mg de glucosa equivalente/g de sustrato, por tanto, si hacemos la aproximación de suponer que estos sacáridos están constituidos fundamentalmente por celobiosa, se podrá pasar de glucosa equivalente a conversión a celobiosa en la forma

$$X_{D2} = X_D \frac{M_D}{M_G} \quad [5.59]$$

donde X_{D2} representa la conversión de la celulosa a

celobiosa en mg/g de sustrato y M_D y M_G son los pesos moleculares de la celobiosa y de la glucosa respectivamente. Por todo esto la conversión de la celulosa a productos solubles vendrá dada por

$$X_S = X_G + X_{D2} \quad [5.60]$$

o bien

$$X_S = X_G + (X_A - X_G) 1,9 \quad [5.61]$$

donde X_A y X_G son las conversiones de la celulosa a azúcares reductores y glucosa, respectivamente, que se muestran en las tablas de resultados experimentales 4.16 a 4.26.

En la tabla 5.29 se muestran estas conversiones para un tiempo de hidrólisis de 10 h. A efectos de comparación también se ha tabulado el cociente entre X_S de cada pretratamiento y el correspondiente al sustrato sin pretratar. Si comparamos estas eficacias relativas con las obtenidas a partir de las velocidades iniciales se observará que en todos los casos ha tenido lugar un descenso de esta eficacia excepto para el sustrato pretratado con FeTNa, si bien la cantidad solubilizada a las 10 h de hidrólisis enzimática en estos casos es inferior al 10%, lo que contrasta con el 48% obtenido al hidrolizar con la misma cantidad de enzima el sustrato pretratado con 5 ml/g de H_2SO_4 del 70% durante una hora.

Realizado este estudio comparativo puede concluirse que el pretratamiento más adecuado es el realizado con H_2SO_4 del 70%. Este pretratamiento presenta, frente al resto, las ventajas de su gran eficacia, el bajo coste del ácido y también su propio efecto hidrolítico

Tabla 5.29

Conversión total de celulosa X_S . $t = 10 \text{ h}$ $E/S = 2 \text{ mg/g}$

Pretratamientos	D/S (ml/g)	X_G (%)	X_A (%)	X_S (%)	$X_S/1,5$
Sin pretratar	-	0,5	1,0	1,5	1
zincoxen 6 h	5 y 20	0,6	1,9	3,1	2,0
NaOH 1,5M 6 h	5 y 20	0,9	2,7	4,3	2,9
FeTNa 6 h	5	1,3	4,2	6,8	4,5
FeTNa 6 h	20	1,8	5,9	9,6	6,4
H ₂ SO ₄ 70% 1 h	5	5,4	27,8	48,0	32,0
H ₂ SO ₄ 70% 6 h	2	3,7	16,6	28,2	18,8
H ₂ SO ₄ 70% 3 h	2	2,8	13,4	22,9	15,3
H ₂ SO ₄ 70% 6 h	1	3,1	8,3	13,0	8,7

sobre la celulosa, que da sacáridos solubles que pueden resultar aprovechables. Tiene los inconvenientes de dar productos de degradación de estos sacáridos previamente solubilizados, así como el dar hidrolizados que contienen las sales de neutralización del ácido en concentraciones tanto mayores cuanto más se deseen aprovechar los sacáridos producidos por la acción hidrolítica del ácido. No obstante, la aparición de productos de degradación puede ser disminuida haciendo un estudio de las condiciones de pretratamiento y, por otra parte, las sales presentes en los hidrolizados no parecen ejercer efecto alguno sobre la actividad de las celulasas, según se ha comprobado, aunque sería necesario un estudio similar sobre el efecto que puedan ejercer sobre las levaduras que efectúan la fermentación de los hidrolizados.

5.3. HIDROLISIS ACIDA DE CELULOSA

Los pretratamientos realizados con H_2SO_4 tienen, como ya se ha indicado, la particularidad de producir por hidrólisis azúcares reductores de bajo grado de polimerización que pasan a disolución y que pueden sufrir degradación en contacto con el ácido. A este respecto, en la tabla 3.8 se mostraba que tras un pretratamiento de 1 h con 5 ml/g de H_2SO_4 del 70%, tan sólo reprecipitó el 44% de la celulosa inicial, quedando el resto en disolución; también en las tablas 4.24, 4.25 y 4.26 se indican las altas cantidades de azúcares reductores totales y de glucosa obtenidos tras los pretratamientos con H_2SO_4 a distintas relaciones D/S y t_p .

Estos resultados, así como la alta eficacia del H_2SO_4 como agente de pretratamiento, han hecho que se aborde el estudio de la acción del H_2SO_4 sobre la celulosa microcristalina, Avicel, a fin de obtener un conocimiento más profundo del efecto hidrolítico del ácido y poder optimizar así el pretratamiento, es decir, conseguir una máxima solubilización de la celulosa con una degradación mínima, lo que posiblemente permitiría terminar el proceso de hidrólisis mediante una segunda etapa enzimática teniendo al sustrato en disolución.

Este estudio se ha abordado desde dos puntos de vista complementarios, por un lado se ha estudiado la velocidad de producción de azúcares reductores totales, que se ha asimilado a la velocidad de disolución del sustrato, y por otro se ha estudiado la velocidad de aparición de glucosa, así como la degradación de ésta. Las variables consideradas en estos estudios han sido la temperatura, la concentración de H_2SO_4 , la relación volumen de ácido/masa de celulosa, D/S, y el tiempo de hidrólisis ácida, t.

5.3.1. Velocidad de aparición de azúcares reductores

En las tablas 4.27, 4.28 y 4.29 se muestran las cantidades de azúcares reductores solubilizados a tiempos crecientes de tratamiento, a distintas temperaturas, concentraciones de ácido y relaciones D/S, respectivamente. Estos resultados se han representado en las figuras 5.28, 5.29 y 5.30; en la primera de ellas se muestra la influencia de la temperatura sobre el rendimiento en azúcares reductores obtenido a distintos tiempos, una relación D/S = 3 ml/g y H₂SO₄ del 70% en peso. En esta gráfica se observa que la influencia de la temperatura es similar en todos los casos, presentándose dos períodos claramente diferenciados: una primera fase en que la velocidad de reacción es constante y por tanto parece no depender de la cantidad de sustrato sin disolver (fase de disolución) y una segunda zona (fase de estabilización) en que la velocidad decrece bruscamente, se hace cero y llega a ser negativa en el caso de 35°C y 40°C, debido a las posibles reacciones de degradación de los azúcares solubilizados. Como se observa, la cantidad máxima de azúcares reductores obtenidos en todos los casos es prácticamente la misma y oscila alrededor del 60%.

En la figura 5.29 se representan los datos obtenidos a 40°C, la misma relación D/S y concentraciones de ácido comprendidas entre el 31% y el 70%; en ella se observa que la máxima concentración de azúcares solubilizados depende de la concentración de ácido y que las curvas pertenecientes a las concentraciones de H₂SO₄ del 62%, 65% y 70% presentan las etapas de solubilización y estabilización. En estos últimos experimentos y en los representados en la figura 5.28 se llega a la solubilización total de la celulosa en un tiempo que coincide prácticamente con el fin de la fase de disolución. Sin embargo, a concentraciones iguales o inferior-

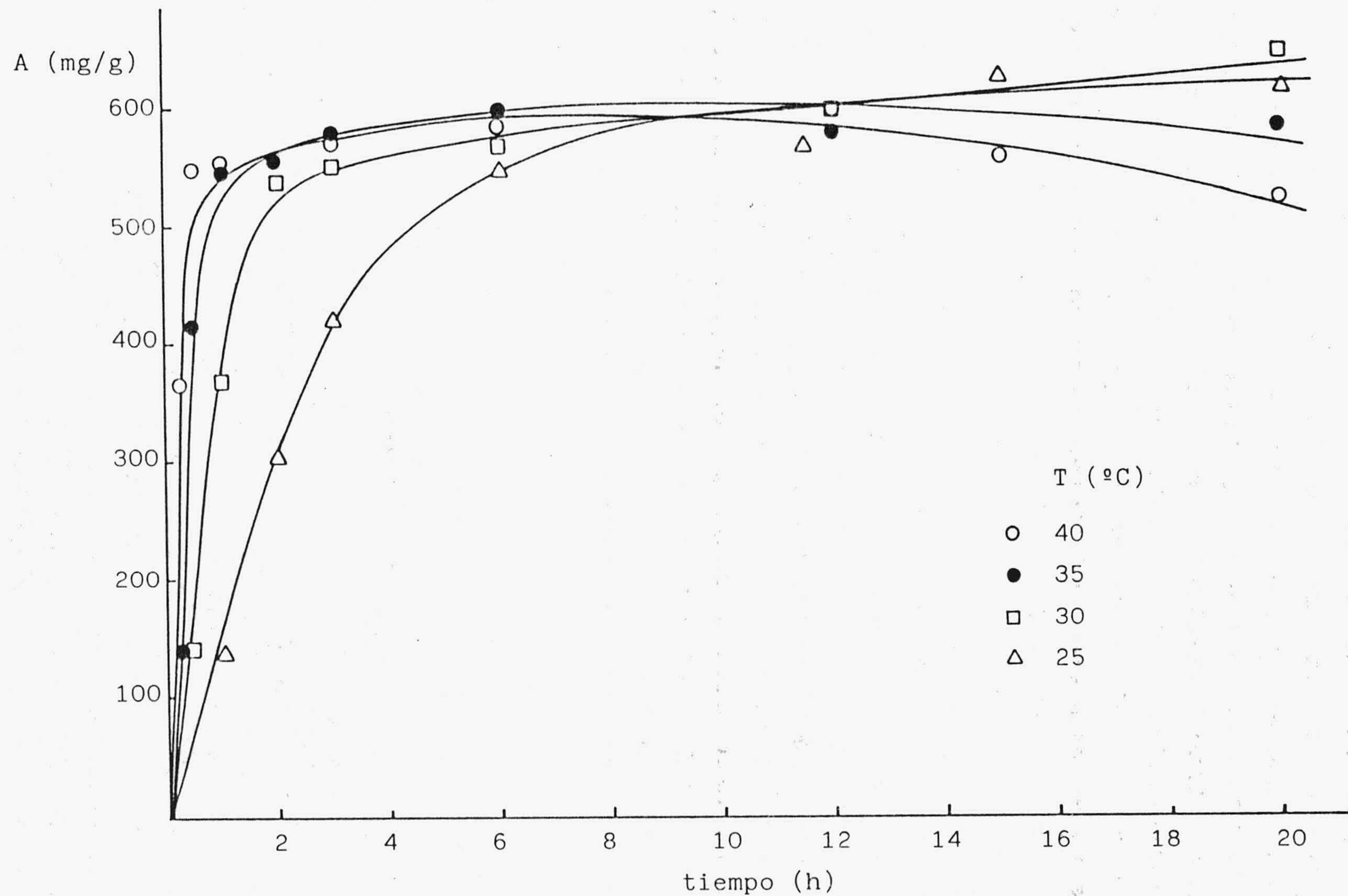


Figura 5.28.- Hidrólisis ácida de celulosa: influencia de la temperatura sobre la cantidad de azúcares reductores solubilizados (H_2SO_4 del 70% y D/S = 3 ml/g).

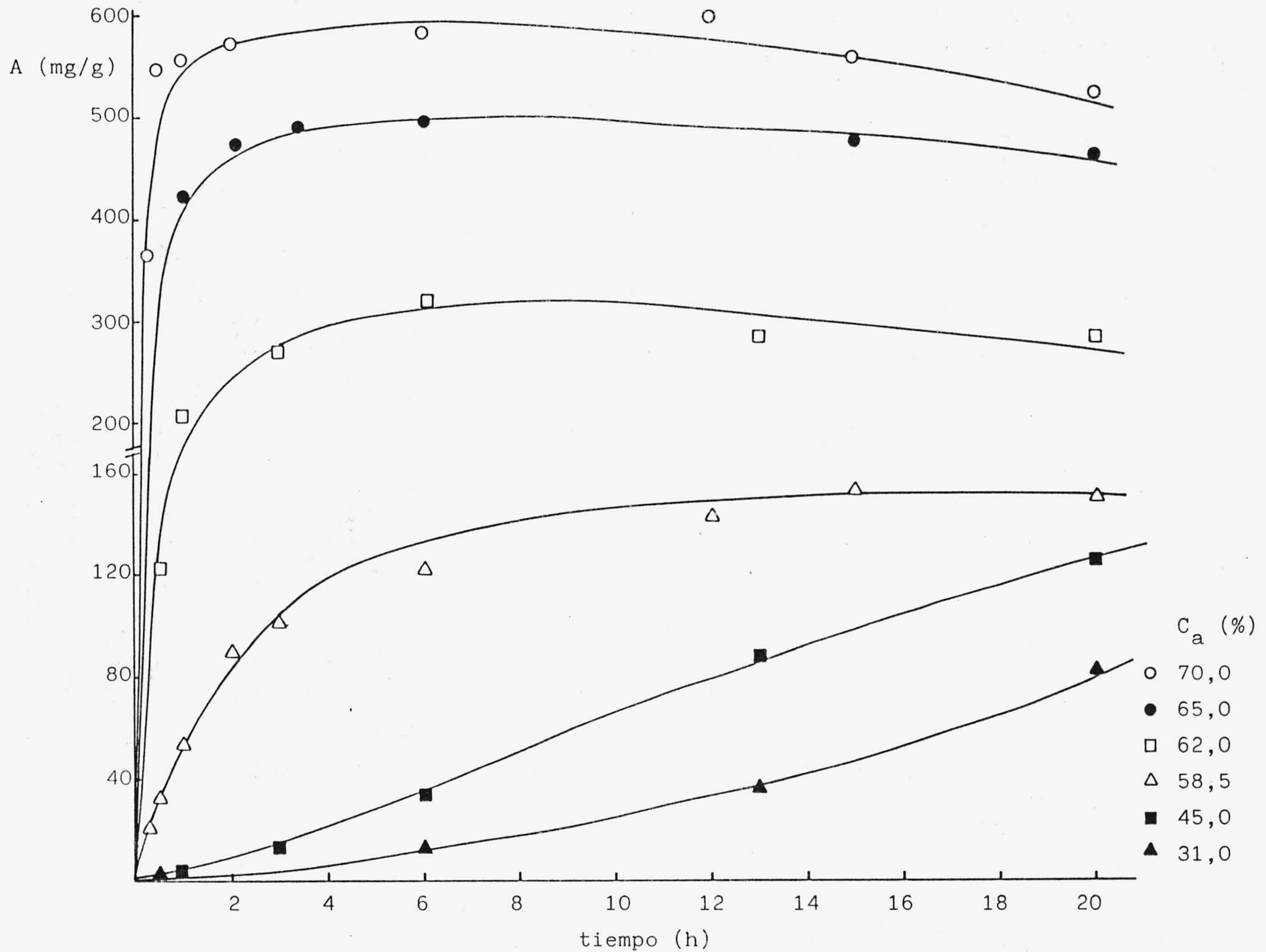


Figura 5.29.- Hidrólisis ácida de celulosa: influencia de la concentración de H_2SO_4 sobre la cantidad de azúcares reductores solubilizados (D/S = 3 ml/g y $40^\circ C$).

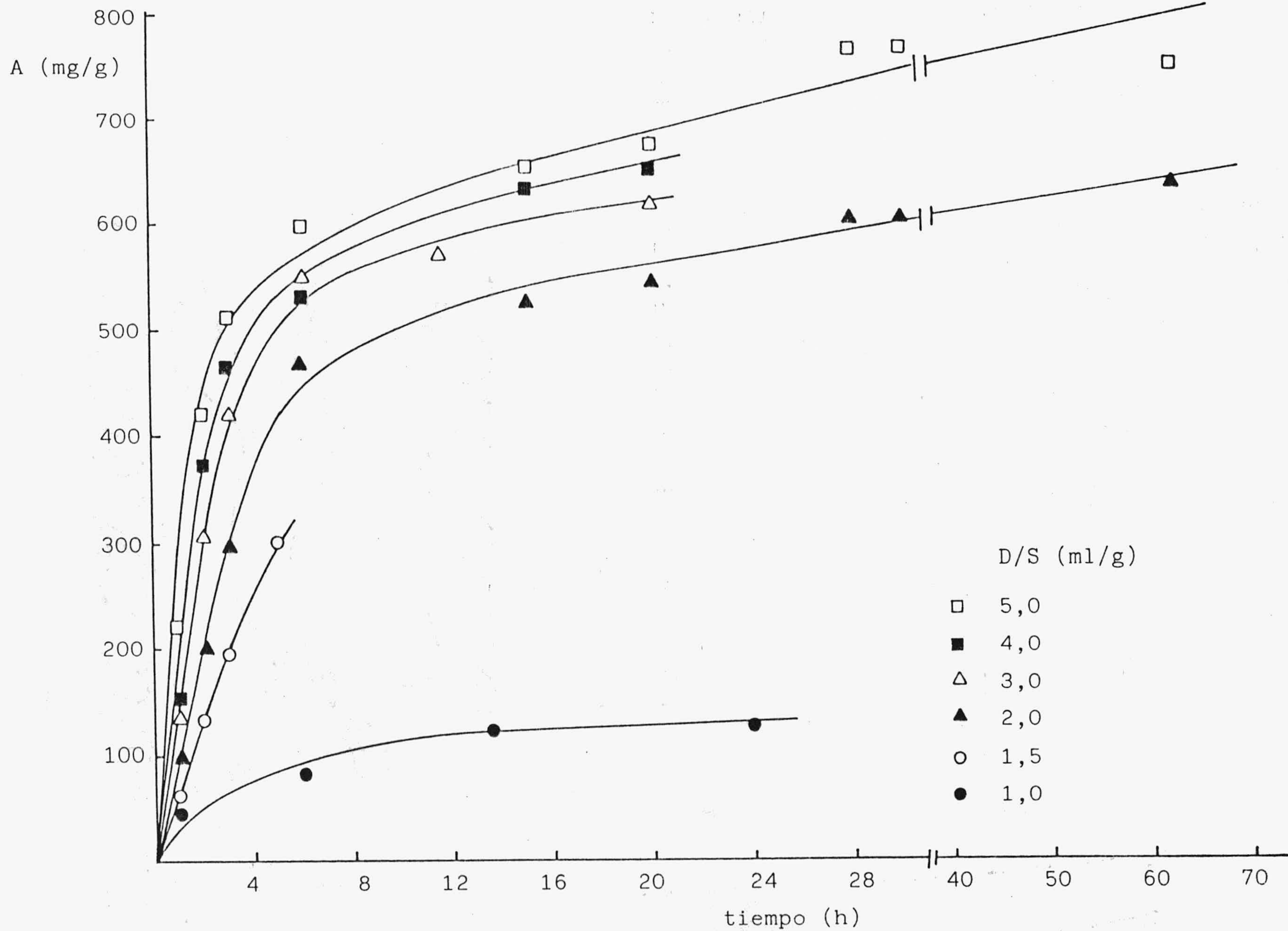


Figura 5.30.- Hidrólisis ácida de celulosa; influencia de la relación ácido/sustrato sobre la cantidad de azúcares reductores solubilizados (H_2SO_4 del 70% y $25^\circ C$).

res al 58,5% tan sólo llega a disolverse una pequeña fracción de la celulosa inicial (entre el 8% y el 15% a las 20 horas). Este resultado indica que a medida que se hace mayor la concentración de ácido es más intenso el efecto "swelling", que es posiblemente el predominante hasta concentraciones del orden del 58,5% de H_2SO_4 ; en cambio para las concentraciones iguales o superiores al 62% es más importante la hidrólisis de los enlaces β -1,4-glucosídicos, que da lugar a cadenas de pequeño grado de polimerización que pasan a disolución.

En la figura 5.30 se muestra la influencia de la relación D/S sobre la cantidad de cadenas solubilizadas con H_2SO_4 del 70% y 25°C. Como se observa, las curvas correspondientes a D/S = 2, 3, 4 y 5 ml/g presentan los períodos de disolución y estabilización; también para D/S = 1,5 ml/g se observó, en los experimentos realizados, una progresiva desaparición de la fase sólida. Sin embargo, en los ensayos realizados con D/S = 1 ml/g se obtuvo una escasa solubilización de la celulosa; en este caso, debido posiblemente a la escasez de fase líquida, puede considerarse controlante la difusión del ácido hacia las moléculas de celulosa y/o de los azúcares formados hacia la fase líquida, en lugar de la rotura por hidrólisis de los enlaces β -1,4-glucosídicos.

Experimentalmente se ha observado que las discontinuidades que separan las fases de disolución y estabilización, que se muestran en las figuras 5.28, 5.29 (curvas correspondientes al 62%, 65% y 70%) y 5.30 (excepto la correspondiente a D/S = 1 ml/g), corresponden aproximadamente al instante en que termina de disolverse la fase sólida, quedando el sustrato en disolución y, por tanto, en forma de sacáridos de bajo grado de polimerización.

Para confirmar este hecho se ha estimado el grado medio de polimerización en cada instante a partir de los resultados experimentales correspondientes a azúcares reductores y glucosa (tablas 4.27 a 4.32). Esta estimación se ha realizado en la forma siguiente: teniendo en cuenta que en todos los experimentos se partió de 1 g de celulosa, que por cada enlace β -1,4-glucosídico que se rompe se incorpora a la masa total de sacáridos, M_T , una molécula de agua y que los azúcares reductores están expresados como glucosa equivalente, el valor de M_T vendrá dado por

$$M_T = 1 + \frac{A M_a}{M_G} \quad [5.62]$$

donde A es la cantidad de azúcares reductores, expresada en gramos, y M_G y M_a son los pesos moleculares de la glucosa y el agua, respectivamente. La masa de sacáridos de $DP > 1$, M, vendrá dada por

$$M = M_T - G \quad [5.63]$$

donde G es la cantidad de glucosa expresada en gramos. Por otra parte, el peso molecular medio de los azúcares de $DP > 1$ en un instante dado es

$$M_A = (p'-1) M_{Ga} + M_G \quad [5.64]$$

donde p' es el grado de polimerización medio de todos los sacáridos de $DP > 1$ y M_{Ga} es el peso molecular de la glucosa anhidra. El número de equivalentes (extremos reductores) de sacáridos disueltos de $DP > 1$, N, vendrá dado por

$$N = \frac{A - G}{M_G} \quad [5.65]$$

y si se tiene en cuenta que

$$\frac{M}{M_A} \approx N \quad [5.66]$$

sustituyendo [5.62], [5.63], [5.64] y [5.65] en [5.66] se obtiene:

$$\frac{1 + \frac{A M_a}{M_G} - G}{(p' - 1) M_{Ga} + M_G} \approx \frac{A - G}{M_G} \quad [5.67]$$

En la expresión [5.66], y por tanto en la [5.67], se han despreciado los grupos reductores no disueltos frente a los que han pasado a disolución; esta aproximación es válida si se tiene en cuenta la mayor longitud de las cadenas insolubles frente a las que han pasado a disolución; es decir, el número de extremos reductores en la disolución es mucho mayor que los correspondientes a la celulosa residual no solubilizada. Operando en la ecuación [5.67] se obtiene

$$p' = \frac{1111 - G}{A - G} \quad [5.68]$$

donde A y G están expresadas en mg y 1111 representa la máxima cantidad de glucosa en mg que es posible obtener partiendo de 1 g de celulosa. Si en [5.68] se sustituyen valores experimentales de A y G (tablas 4.27 a 4.32) puede estimarse p' con una precisión que irá decreciendo a medida que aumente la degradación de los azúcares disueltos, sobre todo de la glucosa, ya que todo este razonamiento está basado en suponer que el balance de materia

$$S_0 = S + A \quad [5.69]$$

se cumple en todo momento; en esta expresión A representa los azúcares reductores totales (incluyendo la glucosa), S la celulosa no disuelta y S_0 la celulosa inicial, expresados todos como glucosa potencial.

En las tablas 5.30, 5.31 y 5.32 se muestran los valores estimados para p' ; en general se observa que el grado de polimerización decrece rápidamente en los instantes iniciales (fase de disolución) hasta hacerse prácticamente igual a 2 en la zona de estabilización. Sin embargo se observa que p' tiende a aumentar con el tiempo tanto más cuanto más alta es la temperatura, tablas 5.30 y 5.31; esto es debido a la degradación de la glucosa lo que hace que el balance representado en [5.69] no se cumpla aceptablemente y la ecuación [5.68] conduzca a resultados por exceso.

Los valores de p' que se muestran en las tablas 5.31 y 5.32 indican que para concentraciones de ácido inferiores al 62% y $D/S = 1$ ml/g no llegan a obtenerse grados de polimerización que permitan suponer que se ha alcanzado la disolución total de la celulosa; este hecho está confirmado por lo observado experimentalmente, ya que en estos casos la cantidad de fase sólida residual siempre fue apreciable. Por otra parte, este hecho también se observa en las figuras 5.29 y 5.30, dadas las bajas cantidades de azúcares reductores solubilizados a las concentraciones del 58,5%, 45% y 31% y para $D/S = 1$ ml/g.

Comparando los valores de p' obtenidos, tablas 5.30, 5.31 y 5.32, con las figuras 5.28, 5.29 y 5.30, respectivamente, se observa que la transición entre los períodos de solubilización y estabilización se corresponde, aproximadamente, con los cambios bruscos ob-

Tabla 5.30

Hidrólisis ácida: influencia de la temperatura sobre el grado medio de polimerización de los azúcares reductores de DP > 1 (p').

T (°C)	p'			
	25	30	35	40
t (h)				
0,25	-	-	8,5	3,2
0,50	-	8,3	2,8	2,2
1,00	8,6	3,1	2,1	2,3
2,00	3,8	2,2	2,2	-
3,00	2,8	2,2	2,3	2,6
6,00	2,1	2,3	2,4	2,8
11,50	2,1	-	-	-
12,00	-	2,4	3,0	2,8
15,00	2,0	-	-	3,0
20,00	2,1	2,0	3,0	3,1

Tabla 5.31

Hidrólisis ácida: influencia de la concentración de H_2SO_4 sobre el grado medio de polimerización de los azúcares reductores de $DP > 1$ (p').

C_a (%)	p'					
	31,0	45,0	58,5	62,0	65,0	70,0
t (h)						
0,25	-	-	61	-	-	3,2
0,50	555	-	31	10,1	-	2,2
1,00	529	444	24	6,3	3,0	2,3
2,00	-	-	16	-	2,9	-
3,00	-	109	16	6,4	3,1	2,6
6,00	114	46	16	5,6	3,6	2,8
12,00	-	-	19	-	-	2,8
13,00	51	26	-	8,1	-	-
15,00	-	-	17	-	4,3	3,0
20,00	30	22	18	10,5	4,1	3,1

Tabla 5.32

Hidrólisis ácida: influencia de la relación D/S sobre el grado medio de polimerización de los azúcares reductores de DP > 1 (p').

D/S (ml/g)	p'					
	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0	5,0
t (h)						
1,0	-	20,2	12,0	8,6	7,8	5,2
2,0	-	9,0	5,9	3,8	3,1	2,8
3,0	29	6,0	4,0	2,8	2,5	2,3
5,0	-	3,9	-	-	-	-
6,0	16	-	2,5	2,1	2,3	2,1
11,5	-	-	-	2,1	-	-
13,5	10	-	-	-	-	-
15,0	-	-	2,3	2,0	2,0	2,0
20,0	-	-	2,3	2,1	2,1	2,1
24,0	10	-	-	-	-	-
30,0	-	-	2,1	-	-	2,0
62,0	-	-	2,2	-	-	2,2

servados en el grado de polimerización. Estos hechos están de acuerdo con la observación experimental y permiten estudiar por una parte la cinética de solubilización de la celulosa y por otra la hidrólisis ácida o enzimática de las cadenas solubilizadas para obtener un caldo rico en glucosa.

Como ya se ha mencionado, todas las curvas experimentales comentadas, excepto las correspondientes a las concentraciones de 58,5%, 45% y 31% de H_2SO_4 (figura 5.29) y la de $D/S = 1$ ml/g (figura 5.30) en las que el efecto "swelling" parece predominar sobre el efecto hidrolítico, presentan una fase de disolución por hidrólisis ácida. Esta solubilización o producción de azúcares reductores solubles parece no depender de la concentración de residuo sólido, es decir, parece ser de orden cero con respecto al sustrato, por tanto

$$\frac{dA}{dt} = k \quad [5.70]$$

que integrada es

$$A = k t \quad [5.71]$$

donde A está expresada en mg de azúcares reductores por gramo de celulosa inicial, t está en horas y k en mg/g.h.

A partir de los valores obtenidos en la etapa de disolución para las cantidades de azúcares reductores liberados por gramo de celulosa (tablas 4.27, 4.28 y 4.29) se han calculado los valores de las constantes cinéticas de disolución, k , correspondientes a cada uno de los experimentos realizados. Estos valores, que se muestran en la tabla 5.33, se han correlacionado con la temperatura, concentración de ácido y relación D/S .

Tabla 5.33

Hidrólisis ácida de celulosa: valores de la constante cinética de aparición de azúcares reductores (k) a distintas temperaturas, concentraciones de H_2SO_4 y relaciones D/S.

T (°C)	C_a (%)	C_a (m)	D/S (ml/g)	k (g/mg.h)	k_{calc} (g/mg.h)	Desv. (%)
25	70	23,81	3,0	142,5	133,5	6,3
30	70	23,81	3,0	305,8	284,5	7,0
35	70	23,81	3,0	641,9	591,8	7,8
40	70	23,81	3,0	1278,7	1202,5	6,0
40	65	18,95	3,0	422,0	445,1	5,5
40	62	16,65	3,0	255,8	236,2	7,7
25	70	23,81	1,5	62,6	66,7	6,6
25	70	23,81	2,0	98,7	89,0	9,9
25	70	23,81	4,0	163,7	177,9	8,7
25	70	23,81	5,0	215,1	222,4	3,4

Se ha comprobado que k varía con la temperatura según una expresión exponencial de tipo Arrhenius. En la figura 5.31 se han representado los valores de k obtenidos a 25°C, 30°C, 35°C y 40°C (para $C_a = 70\%$ y $D/S = 3$ ml/g) frente a $1/T$, observándose una buena correlación entre ambos. La expresión que relaciona k con T , obtenida a partir de la linealización, es

$$k = 1,18 \cdot 10^{22} \exp \left(\frac{-113,6}{RT} \right) \quad [5.72]$$

donde la energía de activación está expresada en KJ/mol, T en grados kelvin y k se obtiene en mg de azúcares reductores (expresados como glucosa equivalente) por gramo de sustrato inicial y hora de reacción (mg/g.h). Esta expresión es válida para $D/S = 3$ ml/g, $C_a = 70\%$ y para el intervalo de temperaturas 25 - 40°C.

También ha sido posible correlacionar con la concentración de ácido, C_a , los valores de k obtenidos a 40°C y con $D/S = 3$ ml/g para las concentraciones de 62%, 65% y 70%. La relación encontrada ha sido de tipo potencial y se representa en la figura 5.32; la expresión que relaciona k y C_a para $D/S = 3$ ml/g y 40°C es

$$k = 7,05 \cdot 10^{-4} C_a^{4,54} \quad [5.73]$$

donde C_a está expresada en molalidad, o bien

$$k = 2,24 \cdot 10^{-22} C_a^{13,41} \quad [5.74]$$

expresando C_a en tanto por ciento. Destaca el alto valor a que está elevada la concentración de ácido, lo que indica que el efecto hidrolítico crece muy rápidamente al aumentar levemente la concentración de ácido. Por



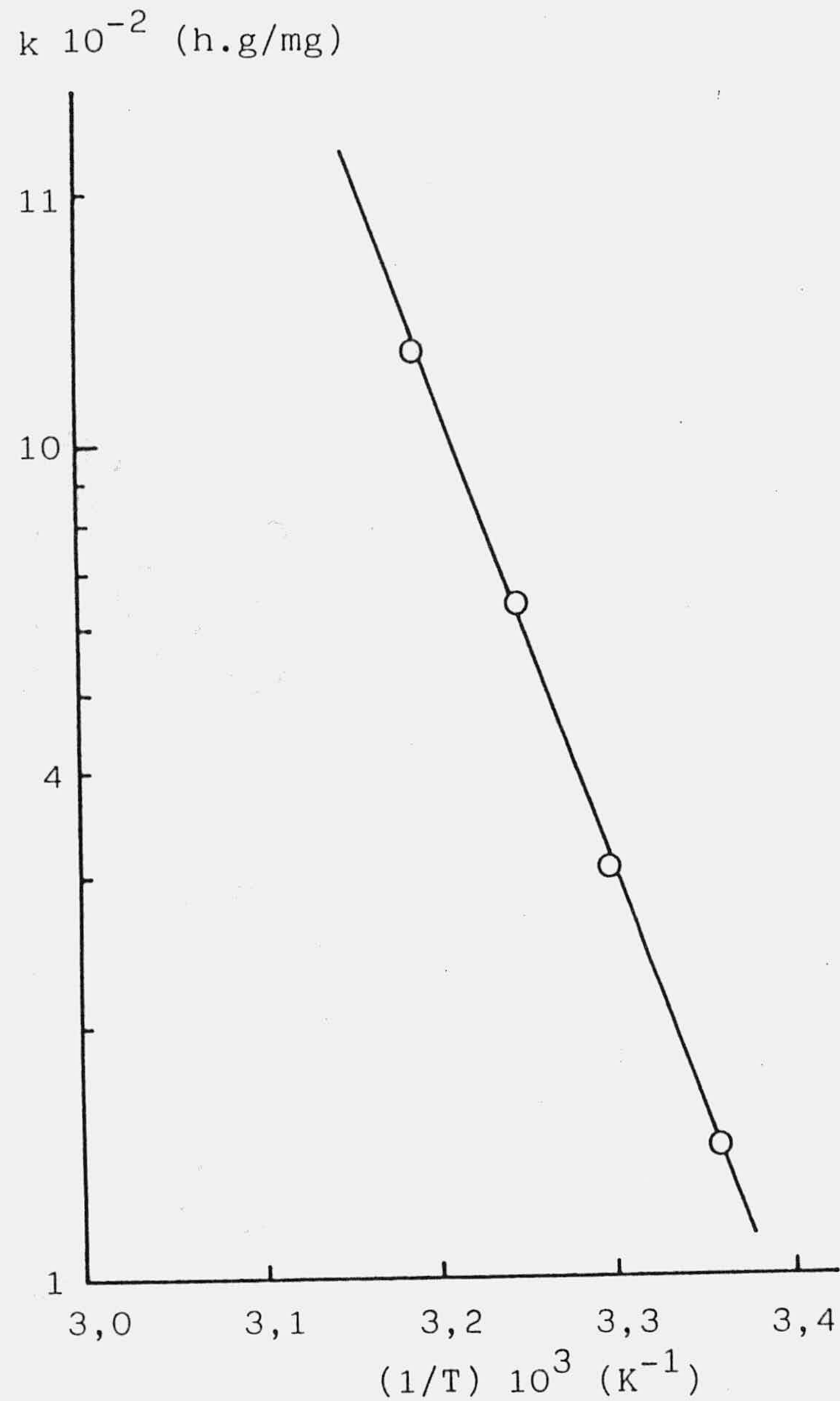


Figura 5.31.- Correlación de la constante de solubilización de la celulosa con la temperatura (ecuación [5.72]).

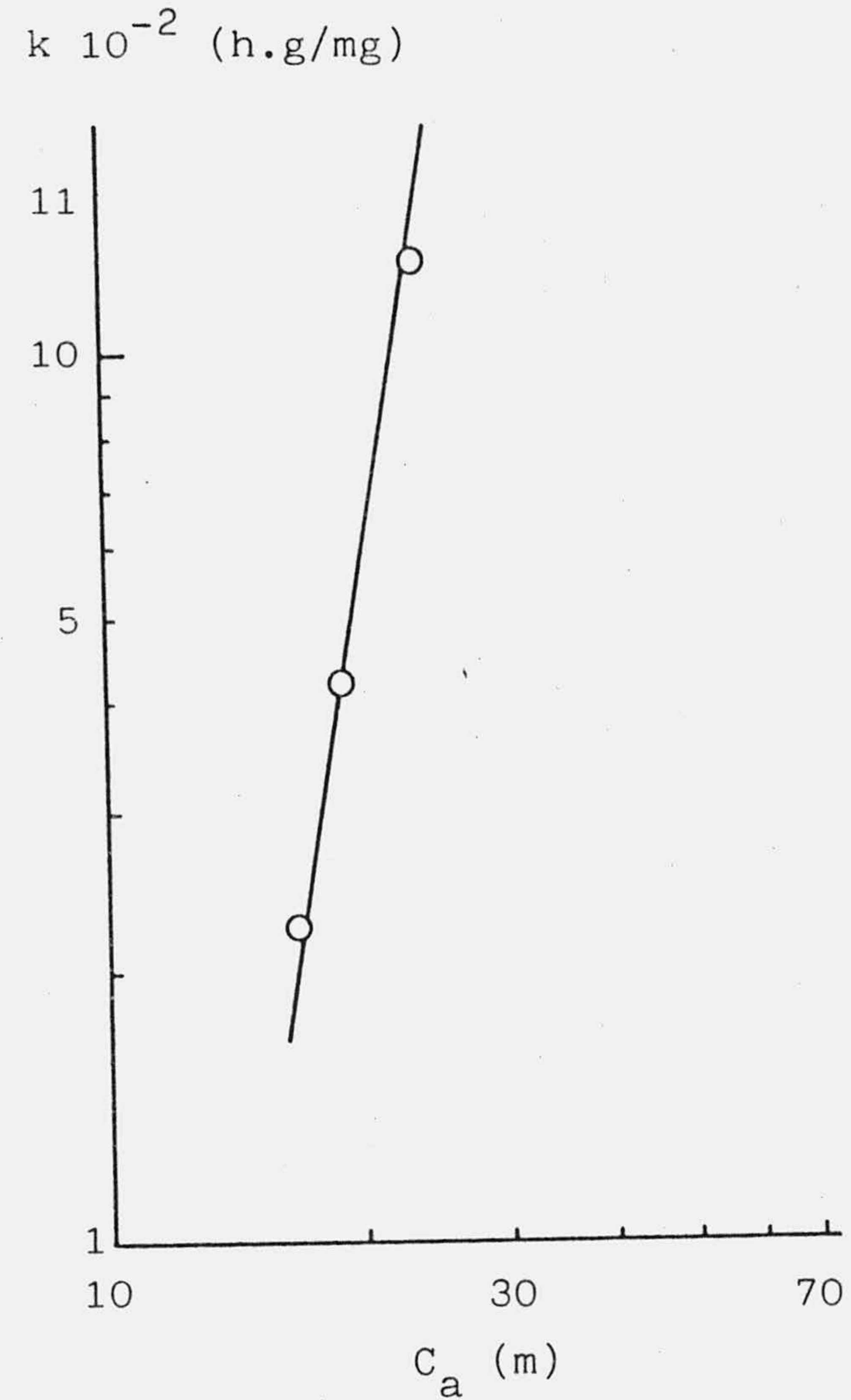


Figura 5.32.- Correlación de la constante de solubilización de la celulosa con la concentración de H_2SO_4 (ecuación [5.73]).

otra parte, algo similar ocurre al pasar de una concentración del 58,5%, en que prácticamente no hay efecto hidrolítico (se solubiliza un 15% a las 15 horas), a una del 62%, en que puede llegarse a un 30% en tan sólo 6 horas. Así pues la concentración de ácido es muy crítica a estos niveles y en estas condiciones, ya que pequeñas variaciones en ella dan lugar a grandes cambios en los efectos "swelling" e hidrolítico, afectando notablemente a la velocidad de disolución y cantidad de sustrato disuelto.

En el factor preexponencial de la ecuación [5.72] puede incluirse el efecto de la concentración de ácido en la forma

$$k = 6,55 \cdot 10^{15} C_a^{4,54} \exp\left(\frac{-113,6}{RT}\right) \quad [5.75]$$

expresando C_a en molalidad, o bien

$$k = 2,08 \cdot 10^{-3} C_a^{13,41} \exp\left(\frac{-113,6}{RT}\right) \quad [5.76]$$

expresando C_a en tanto por cien. Estas expresiones son válidas para $D/S = 3$ ml/g y para los intervalos de concentración de ácido y temperatura 62 - 70% y 25 - 40°C.

La relación encontrada entre k y D/S para H_2SO_4 del 70% y 25°C ha sido de tipo lineal y se representa en la figura 5.33; esta relación es

$$k = 44,5 (D/S) \quad [5.77]$$

donde D/S está expresada en ml/g; esta expresión se ha calculado en el intervalo 1,5 - 5 ml/g. Para valores de

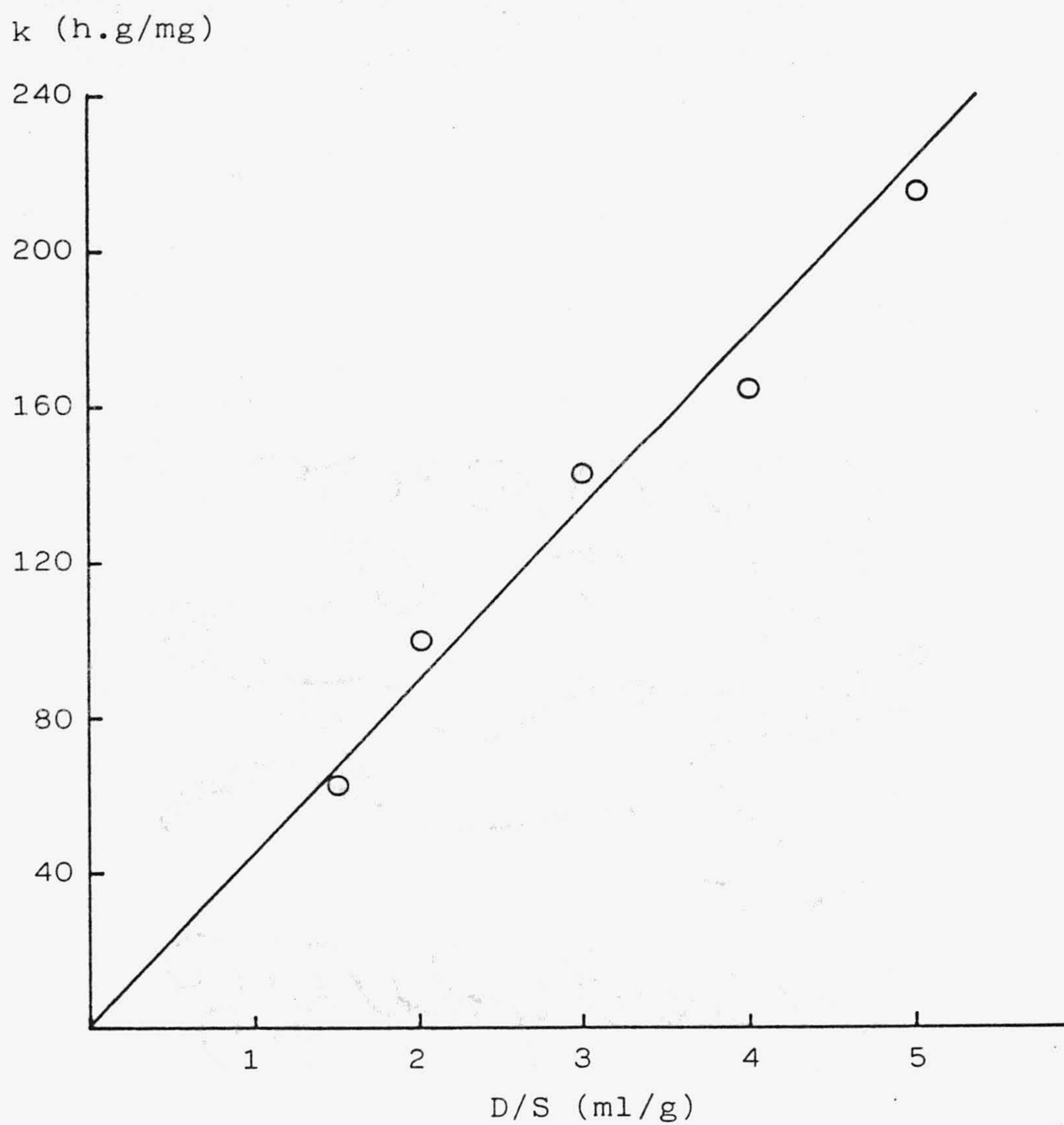


Figura 5.33.- Correlación de la constante de solubilización de la celulosa con la relación D/S (ecuación [5.77]).

D/S inferiores a 1,5 ml/g se ha comprobado que debido a la escasez de fase líquida hay un cambio en la cinética de la solubilización, lo que posiblemente sea debido, como ya se ha comentado, a que esta cinética pasa a estar controlada por las difusiones del ácido hacia las moléculas de celulosa o de los azúcares hacia el seno de la disolución. Para $D/S > 5$ ml/g es de preveer que tenga lugar una saturación del sustrato por parte del ácido, no obteniéndose un aumento de k al incrementar D/S.

La expresión [5.77] se ha integrado en las [5.75] y [5.76] obteniéndose las ecuaciones que relacionan la constante cinética de producción de azúcares reductores totales con la temperatura, concentración de ácido y relación D/S en los intervalos 25 - 40°C, 62 - 70% y 1,5 - 5 ml/g; estas expresiones son

$$k = 2,09 \cdot 10^{15} (D/S) C_a^{4,54} \exp\left(\frac{-113,6}{RT}\right) \quad [5.78]$$

donde C_a está expresada en molalidad, o bien

$$k = 6,73 \cdot 10^{-4} (D/S) C_a^{13,41} \exp\left(\frac{-113,6}{RT}\right) \quad [5.79]$$

para C_a expresada en tanto por cien.

En la tabla 5.33 se muestran los valores recalculados para k (kcal) a partir de la expresión [5.79]. Como se observa, estas expresiones reproducen adecuadamente los valores experimentales de k ya que las desviaciones son inferiores al 10% en todos los casos.

En las figuras 5.28, 5.29 y 5.30 se observa tam-

bién que la aplicabilidad de la ecuación [5.71], con las constantes cinéticas calculadas a partir de las expresiones [5.78] o [5.79], tiene como límite el fin de la fase de disolución. Dado que la transición entre esta fase y la de estabilización es un tanto brusca ha sido posible estimar los tiempos en que finaliza dicha fase de disolución, t_d ; para ello se han utilizado las figuras 5.28, 5.29 y 5.30 y los grados medios de polimerización en cada instante que se muestran en las tablas 5.30, 5.31 y 5.32. Los valores estimados para t_d se encuentran en la tabla 5.34. Como es lógico estos tiempos varían con las condiciones experimentales (T , C_a y D/S) de forma inversa a como variaba k , ya que cuanto más enérgicas sean estas condiciones antes se alcanzará la disolución del sustrato.

Los valores de t_d también se han correlacionado con la temperatura, concentración de ácido y relación D/S . En la figura 5.34 se ha representado la relación de t_d con la temperatura; la expresión que mejor reproduce esta relación es

$$t_d = 5,69 \cdot 10^{-16} \exp \left(\frac{89,6}{RT} \right) \quad [5.80]$$

donde R está en KJ/K.mol , T en grados kelvin y t_d en horas. En la figura 5.35 se han representado los valores de t_d estimados a cada una de las concentraciones de ácido ensayadas (representadas estas en molalidad); las ecuaciones que reproducen esta dependencia son

$$t_d = 2,77 \cdot 10^3 C_a^{-2,71} \quad [5.81]$$

expresando C_a en molalidad, o bien

$$t_d = 3,02 \cdot 10^{14} C_a^{-8,00} \quad [5.82]$$

Tabla 5.34

Hidrólisis ácida: valores estimados y calculados mediante las expresiones [5.84] y/o [5.85] de los tiempos de finalización de la disolución de la celulosa, t_d .

T (°C)	C_a (%)	C_a (m)	D/S (ml/g)	t_d (h)	t_{dcalc} (h)	Desv. (%)
25	70	23,81	3,0	3,0	3,2	6,7
30	70	23,81	3,0	1,5	1,8	17,3
35	70	23,81	3,0	1,0	1,0	0
40	70	23,81	3,0	0,5	0,6	20,0
40	65	18,95	3,0	1,0	1,0	0
40	62	16,65	3,0	1,3	1,5	15,4
25	70	23,81	2,0	4,0	3,8	5,0
25	70	23,81	4,0	2,6	2,6	0
25	70	23,81	5,0	2,0	1,9	5,0

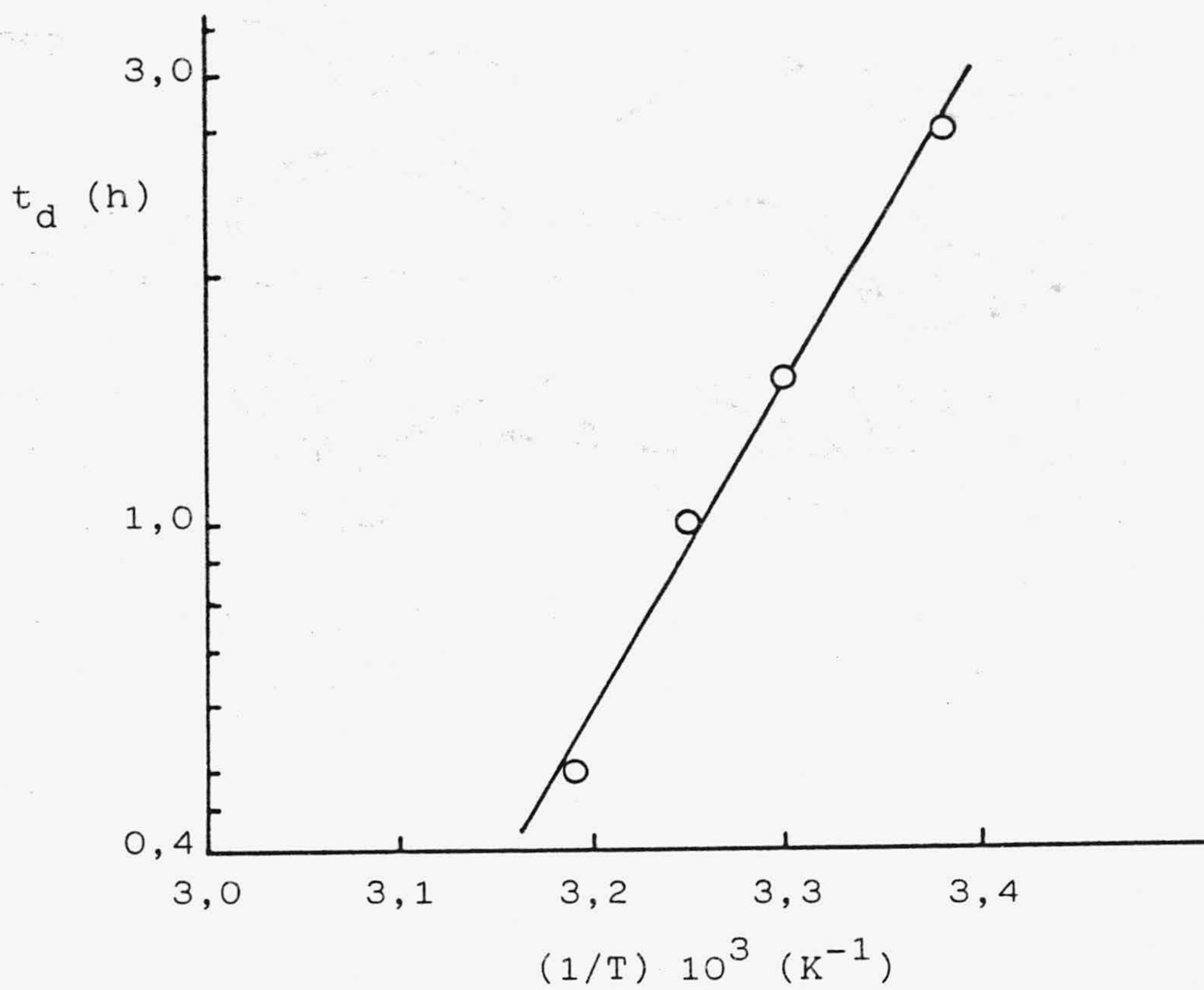


Figura 5.34.- Correlación del tiempo de disolución de la celulosa con la temperatura (ecuación [5.80]).

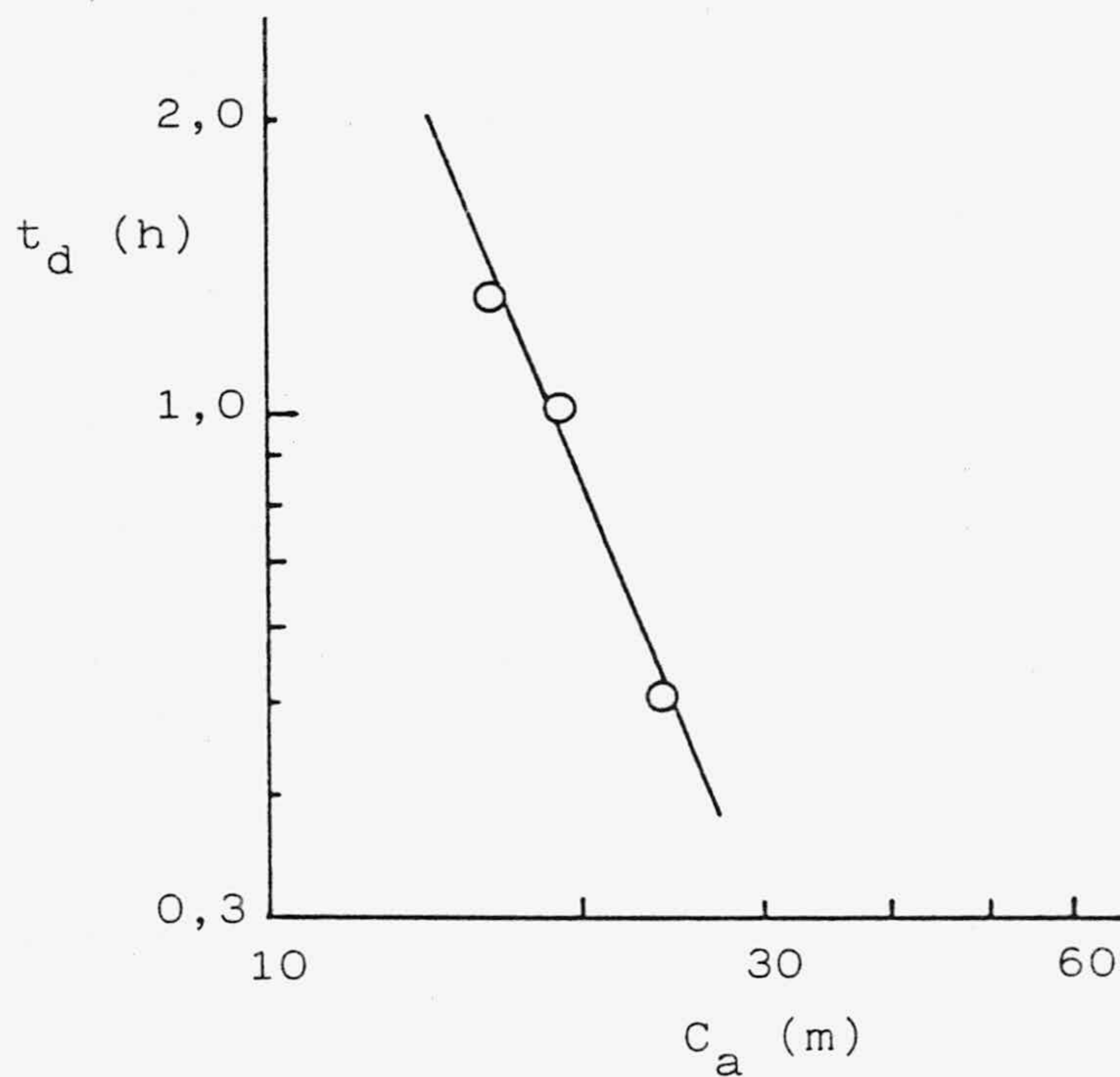


Figura 5.35.- Correlación del tiempo de disolución de la celulosa con la concentración de H_2SO_4 (ecuación [5.81]).

donde C_a está expresada en tanto por ciento. Al igual que con k , la variación del tiempo de disolución con la concentración de ácido sigue siendo muy brusca, lo que de nuevo pone de manifiesto la fuerte influencia de las variaciones de la concentración del ácido sobre el efecto hidrolítico de éste.

En la figura 5.36 se muestra la variación de t_d con la relación D/S, que conduce a la expresión

$$t_d = 5,14 - 0,64 (D/S) \quad [5.83]$$

donde D/S está expresado en ml/g.

Las expresiones que relacionan t_d con la temperatura, concentración de ácido y relación D/S pueden englobarse en una sola ecuación que reproduce los valores de t_d en los rangos de condiciones experimentales utilizados:

$$t_d = 5,35 \cdot 10^{-12} (1-0,125(D/S)) C_a^{-2,71} \exp\left(\frac{89,6}{RT}\right) [5.84]$$

donde C_a está expresada en molalidad, o bien

$$t_d = 0,57 (1-0,125(D/S)) C_a^{-8,00} \exp\left(\frac{89,6}{RT}\right) [5.85]$$

para C_a expresada en tanto por ciento. En la tabla 5.34 se comparan los valores de t_d estimados y los calculados mediante la expresión [5.85]. Estos valores representan, como ya se ha comentado, el límite de aplicabilidad de las ecuaciones [5.70] y [5.71].

El carácter empírico de estas ecuaciones determina que sólo puedan ser utilizadas dentro de los límites de temperatura, concentración de ácido y relación D/S en que han sido obtenidas; así, según las expresiones

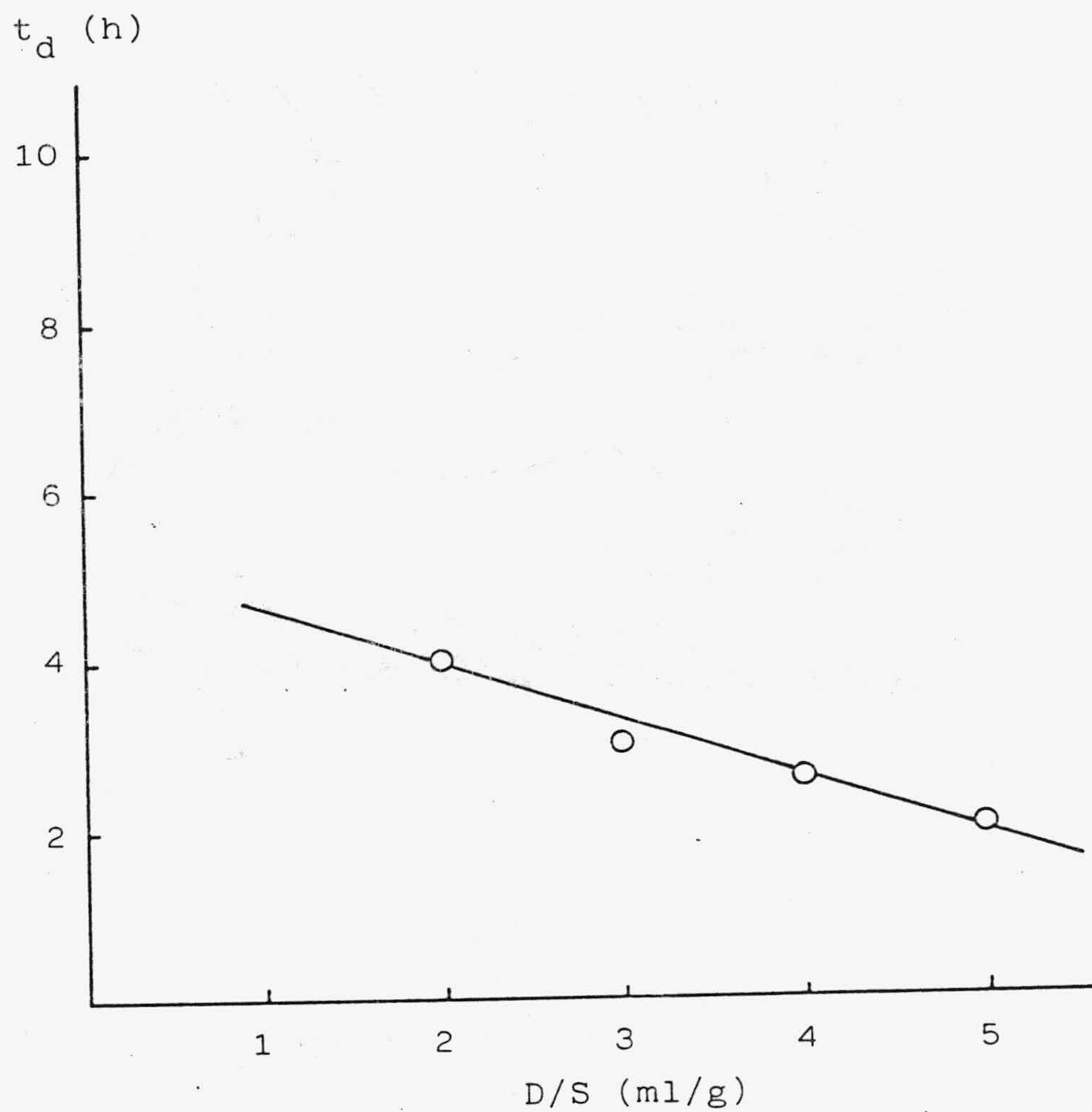


Figura 5.36.- Correlación del tiempo de disolución de la celulosa con la relación D/S (ecuación [5.83]).

[5.78] y/o [5.79], la velocidad de disolución debe crecer rápidamente con la concentración de ácido, sin embargo, en experimentos de hidrólisis realizados a 40°C y con H_2SO_4 del 75% tuvo lugar una rápida solubilización de la celulosa pero también una fuerte degradación de los azúcares obtenidos.

El conocimiento de la cinética de solubilización es útil para estimar a priori las condiciones de tratamiento más idóneas para obtener, con un coste mínimo, el sustrato deseado. Este sustrato puede ser destinado bien a hidrólisis ácida con ácido diluido, bien a hidrólisis enzimática con celulasas adecuadas, o bien a fermentación si el hidrolizado contiene una concentración en glucosa suficientemente alta.

5.3.2. Velocidad de aparición de glucosa

El tratamiento con H_2SO_4 , además de ser útil para facilitar la hidrólisis enzimática posterior y para solubilizar la celulosa, también sirve para obtener glucosa. El estudio de la cinética de producción de esta sustancia es útil para conseguir unas condiciones en las que se obtenga un rendimiento en glucosa alto y una degradación mínima o nula, tanto de este producto como del resto de los azúcares solubilizados.

En las tablas 4.30, 4.31 y 4.32 se muestran las cantidades de glucosa obtenidas en las distintas condiciones de tratamiento ácido ensayadas. Estos resultados se representan en las figuras 5.37, 5.38 y 5.39.

En la figura 5.37 se muestra la influencia de la temperatura; se observa que al elevar ésta aumenta notablemente la velocidad de producción de glucosa, pero también crece apreciablemente su velocidad de degradación. La temperatura parece no tener influencia sobre el valor del máximo rendimiento en glucosa, pero sí sobre el tiempo que tarda en alcanzarse, si bien es posible que a temperaturas bajas y tiempos altos lleguen a obtenerse rendimientos máximos en glucosa mayores que a temperaturas altas, debido a la menor degradación.

También aumentan la velocidad de producción y degradación de glucosa al aumentar la concentración de ácido (figura 5.38), si bien en este caso el máximo rendimiento parece estar limitado por esta concentración. Esto parece indicar que la degradación de la glucosa (y posiblemente de los demás azúcares solubilizados) depende mucho más de la temperatura que de la concentración de ácido, cuando ésta es suficientemente alta como para producir un efecto hidrolítico importante. Por otra parte, también en este caso parece observar-

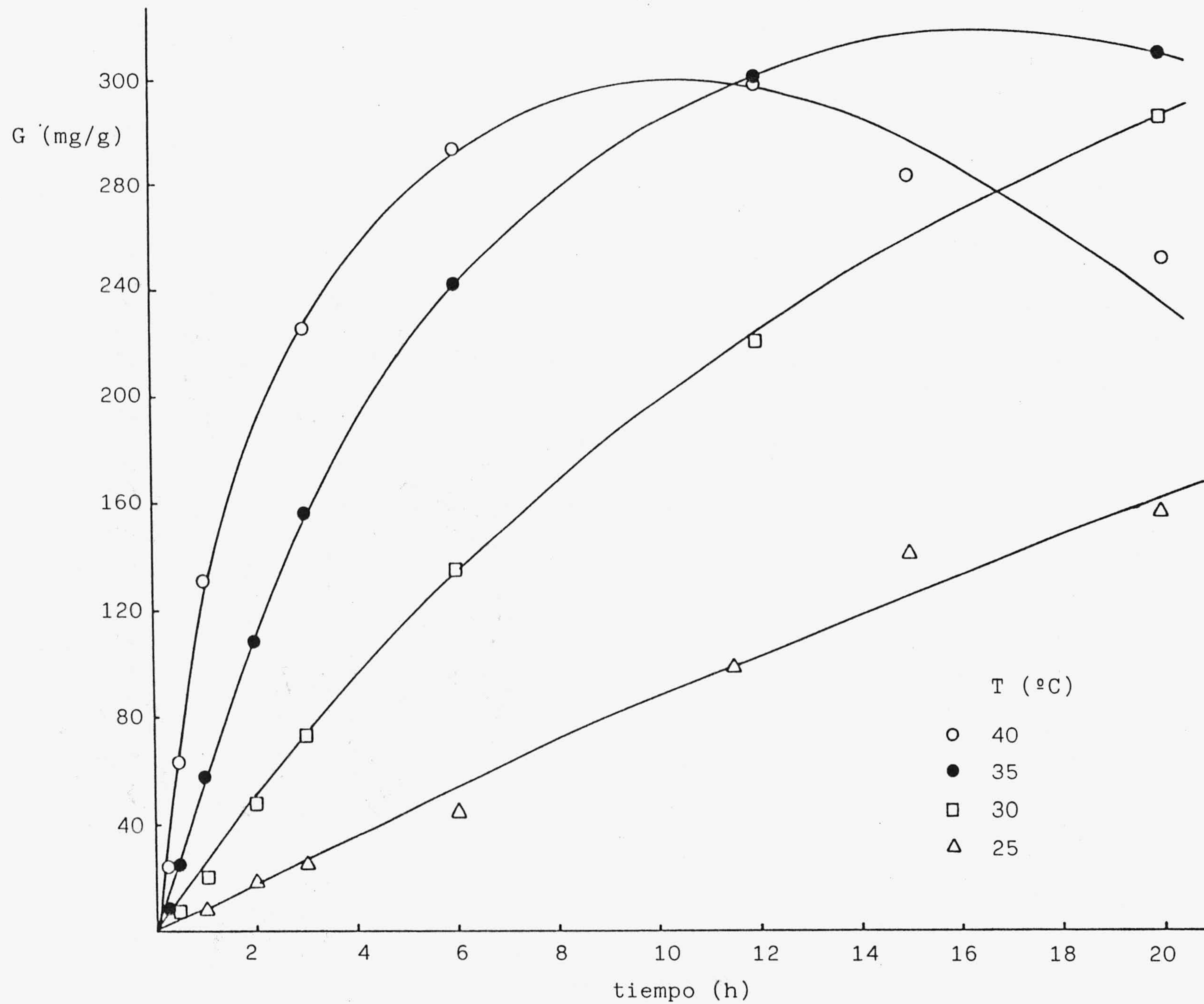


Figura 5.37.- Hidrólisis ácida de celulosa: influencia de la temperatura sobre la cantidad de glucosa obtenida (H_2SO_4 del 70% y D/S = 3 ml/g).

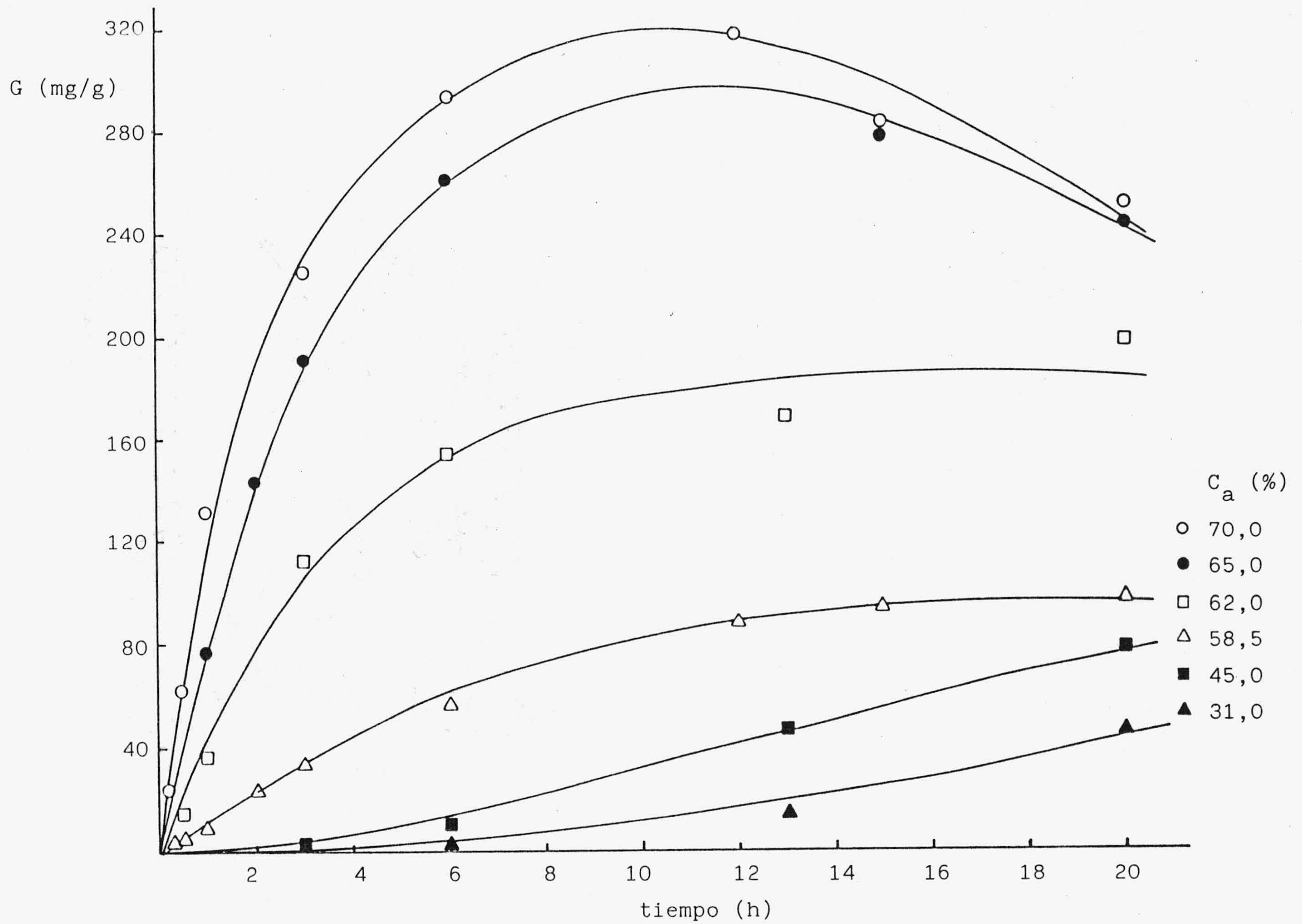


Figura 5.38.- Hidrólisis ácida de celulosa: influencia de la concentración de H_2SO_4 sobre la cantidad de glucosa obtenida ($D/S = 3$ ml/g y $40^\circ C$).

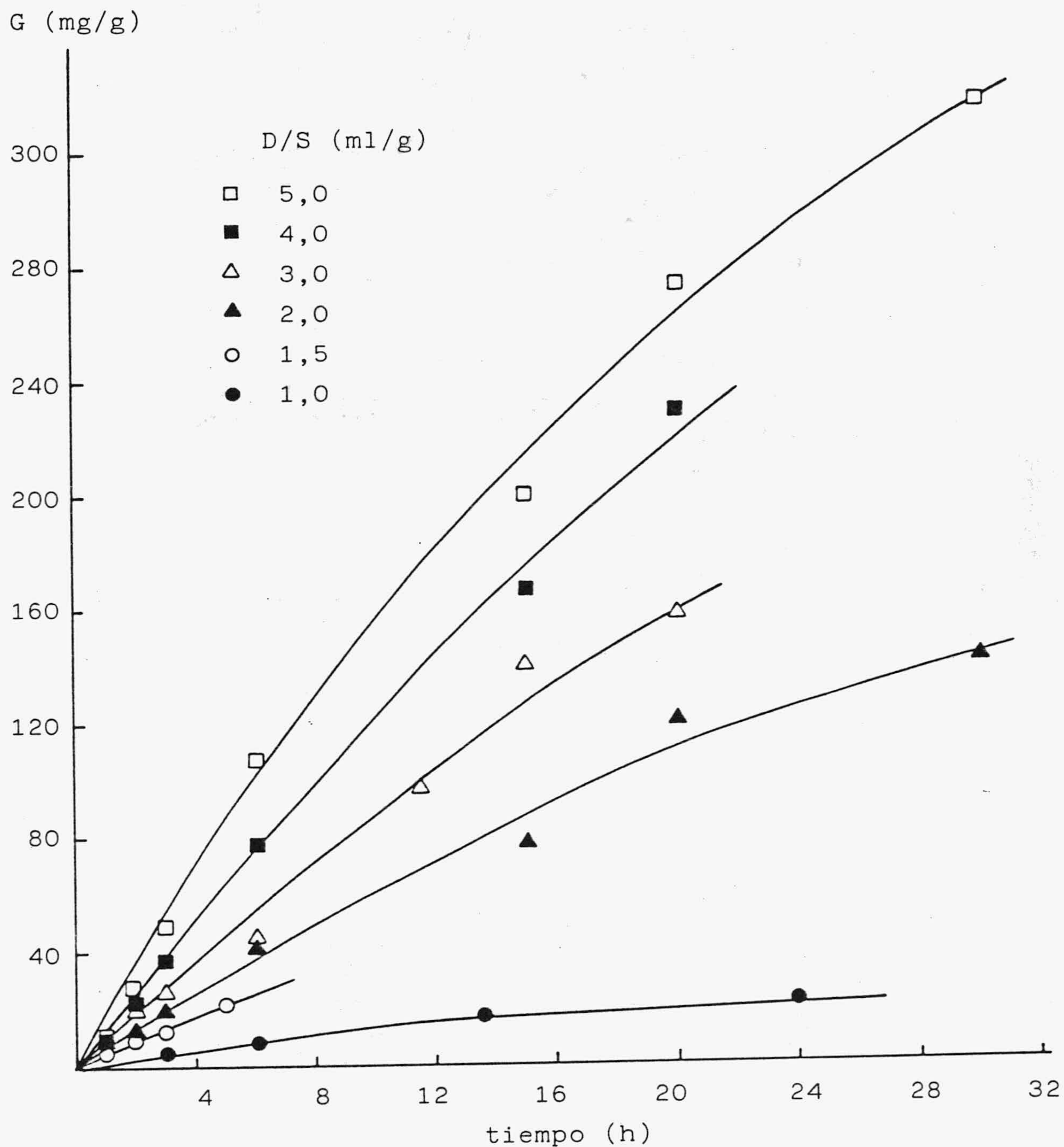


Figura 5.39.- Hidrólisis ácida de celulosa: influencia de la relación ácido/sustrato (D/S) sobre la cantidad de glucosa obtenida (H_2SO_4 del 70% y $25^\circ C$).

se un notable efecto de la concentración de ácido al pasar desde el 58,5% al 62%, ya que tanto en la velocidad inicial como en el rendimiento en glucosa obtenido al cabo de las 20 horas se observa un incremento apreciable al aumentar tan sólo un 3,5% dicha concentración. Esto pone de manifiesto de nuevo la existencia de unas concentraciones de ácido críticas, en torno al 60%, por encima y por debajo de las cuales predomina el efecto hidrolítico y el efecto "swelling", respectivamente.

En la figura 5.39 se muestra la influencia de relaciones D/S crecientes sobre las cantidades de glucosa liberadas a 25°C; en ella se observa un incremento constante tanto de las velocidades iniciales como de los rendimientos obtenidos al aumentar D/S. También parece evidente que no se da degradación de la glucosa debido a la baja temperatura utilizada.

Las curvas representadas en estas figuras presentan desde tiempo cero una forma continua, no observándose las discontinuidades que se daban en las curvas correspondientes a azúcares reductores (figuras 5.28, 5.29 y 5.30). Este hecho parece poner de manifiesto que la formación de glucosa tiene lugar según un sólo mecanismo y en una sola fase, ya que no parecen darse las diferencias entre sistema heterogéneo y homogéneo que se observaron en la producción de azúcares reductores. Parece lógico pensar que la producción de glucosa se dé fundamentalmente en disolución a partir de los sacáridos previamente solubilizados. Como se ha discutido anteriormente, las velocidades de solubilización o producción de azúcares reductores son relativamente altas, por lo que en todo momento puede haber suficiente cantidad de ellos en disolución como para que constituyan el sustrato de la formación de glucosa. De hecho, (como ya se comentó en la Introducción) prácticamente

la totalidad de los autores que estudian la hidrólisis ácida de la celulosa ajustan sus resultados a un modelo de dos reacciones en serie, homogéneas y de primer orden, si los tamaños de partícula son suficientemente pequeños para que pueda despreciarse la difusión del ácido hacia el interior de la partícula y de los azúcares formados hacia el exterior; Bhandari y col. (1984), Church y col. (1981), Ranganathan y col. (1985) y Thompson y col. (1979), es decir



De acuerdo con esta expresión la velocidad de aparición de glucosa es

$$\frac{dG}{dt} = k_1 S - k_2 G \quad [5.87]$$

donde S es la cantidad de sustrato en cada instante, expresada como glucosa potencial, y G es la cantidad de glucosa producida.

La ecuación [5.87] puede ser integrada para valores constantes de la temperatura, de la concentración de ácido y de la relación D/S , resultando

$$G = \frac{k_1}{k_1 - k_2} S_0 (\exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t)) \quad [5.88]$$

donde S_0 es la cantidad inicial de sustrato expresada como glucosa potencial. En este caso se ha partido de 1 g de celulosa, por tanto si llamamos p_0 al grado medio de polimerización de la celulosa inicial, S_0 vendrá

dado por

$$S_o = \frac{M_{Ga} p_o + M_a (p_o - 1)}{M_{Ga} p_o} \quad [5.89]$$

teniendo en cuenta que $M_{Ga} = 162$ y $M_a = 18$, $S_o = 1111$ mg para $p_o \geq 1000$.

Así pues, la ecuación [5.88] debe reproducir los resultados experimentales representados en las figuras 5.37, 5.38 y 5.39. Para ello se han tratado de estimar los valores de k_1 y k_2 que mejor reproduzcan estos resultados para todas las condiciones de temperatura, concentración de ácido y relación D/S ensayadas. En todos los casos, excepto para concentraciones de ácido inferiores al 62% y para D/S = 1 ml/g, se han encontrado valores para k_1 y k_2 que reproducen aceptablemente los resultados experimentales. Estos valores se han optimizado haciendo mínima la suma de los valores absolutos de las diferencias entre el valor experimental y el predicho por la ecuación [5.88], utilizando para ello el método Simplex de tanteos sucesivos. Estos valores se muestran en la tabla 5.35.

Si se comparan los valores de k_1 con los de k (tabla 5.33) para cada una de las condiciones experimentales utilizadas y se calculan las velocidades de producción de azúcares reductores (ecuación [5.70]) y de glucosa (ecuación [5.87]) para tiempos inferiores a t_d , se comprobará que en todo momento la velocidad de producción de azúcares reductores es muy superior a la de producción de glucosa (incluso a $t = 0$), lo que pone de manifiesto que en todo momento existe en disolución una concentración de sacáridos de $DP > 1$ que hacen que la producción de glucosa sea fundamentalmente en disolución, como ya se postuló para proponer el modelo

Tabla 5.35

Valores experimentales de las constantes cinéticas k_1 y k_2 y valores obtenidos para estas constantes con las expresiones [5.100] y [5.101].

T(°C)	C_a (%)	D/S(ml/g)	Experimentales		Calculados		Desv.(%)	
			$k_1 \cdot 10^2$ (h ⁻¹)	$k_2 \cdot 10^2$ (h ⁻¹)	$k_1 \cdot 10^2$ (h ⁻¹)	$k_2 \cdot 10^2$ (h ⁻¹)	k_1	k_2
25	70	3,0	0,803	0,563	0,818	0,564	1,9	0,2
30	70	3,0	2,03	1,88	1,91	1,72	8,5	8,5
35	70	3,0	5,00	6,50	4,33	5,03	13,4	22,6
40	70	3,0	9,13	13,4	9,59	14,3	5,0	6,7
40	65	3,0	7,40	12,7	6,15	13,5	16,9	6,3
40	62	3,0	4,25	12,2	4,63	13,0	18,9	6,6
25	70	1,5	0,402	0,282	0,409	0,282	1,7	0
25	70	2,0	0,536	0,376	0,545	0,376	1,7	0
25	70	4,0	1,11	0,752	1,09	0,753	1,8	0,1
25	70	5,0	1,41	0,940	1,36	0,941	3,5	0,1

cinético.

Pero no en todos los casos es controlante en la producción de glucosa la acción hidrolítica del ácido. Al igual que sucedía con la producción de azúcares reductores, a concentraciones de ácido y relaciones D/S pequeñas la ecuación [5.88] no reproduce los resultados experimentales, lo que indica que en este caso la producción de glucosa está controlada por otros mecanismos que, como ya se ha indicado, pueden ser la difusión del ácido hasta las moléculas de celulosa o de los azúcares de bajo grado de polimerización hacia la disolución.

Las constantes cinéticas de formación y degradación de glucosa, k_1 y k_2 (tabla 5.35), se han correlacionado con la temperatura, concentración de ácido y relación D/S. k_1 y k_2 varían con la temperatura según una expresión de tipo Arrhenius como se muestra en las figuras 5.40 y 5.41, en las que se han representado los valores de k_1 y k_2 obtenidos con H_2SO_4 del 70% y D/S = 3 ml/g frente a la inversa de la temperatura. Las expresiones que ajustan estos valores son

$$k_1 = 1,70 \cdot 10^{20} \exp\left(\frac{-127,2}{RT}\right) \quad [5.90]$$

$$k_2 = 1,11 \cdot 10^{27} \exp\left(\frac{-166,9}{RT}\right) \quad [5.91]$$

donde la energía de activación está expresada en KJ/mol, T en grados kelvin y k_1 y k_2 se obtienen en h^{-1} .

También se han correlacionado con la concentración de ácido los valores de k_1 y k_2 obtenidos a 40°C y

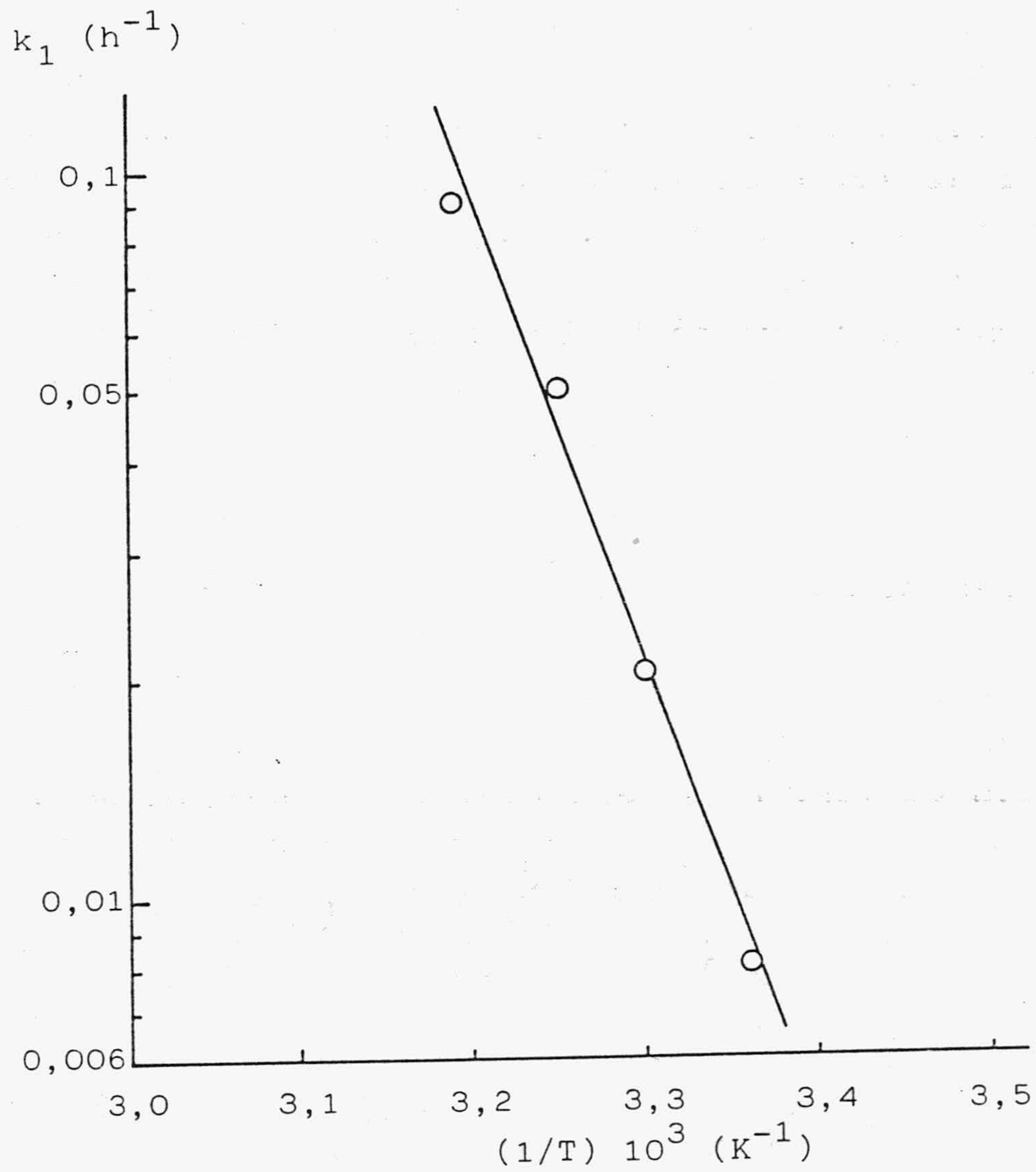


Figura 5.40.- Correlación de la constante cinética de producción de glucosa con la temperatura (ecuación [5.90]).

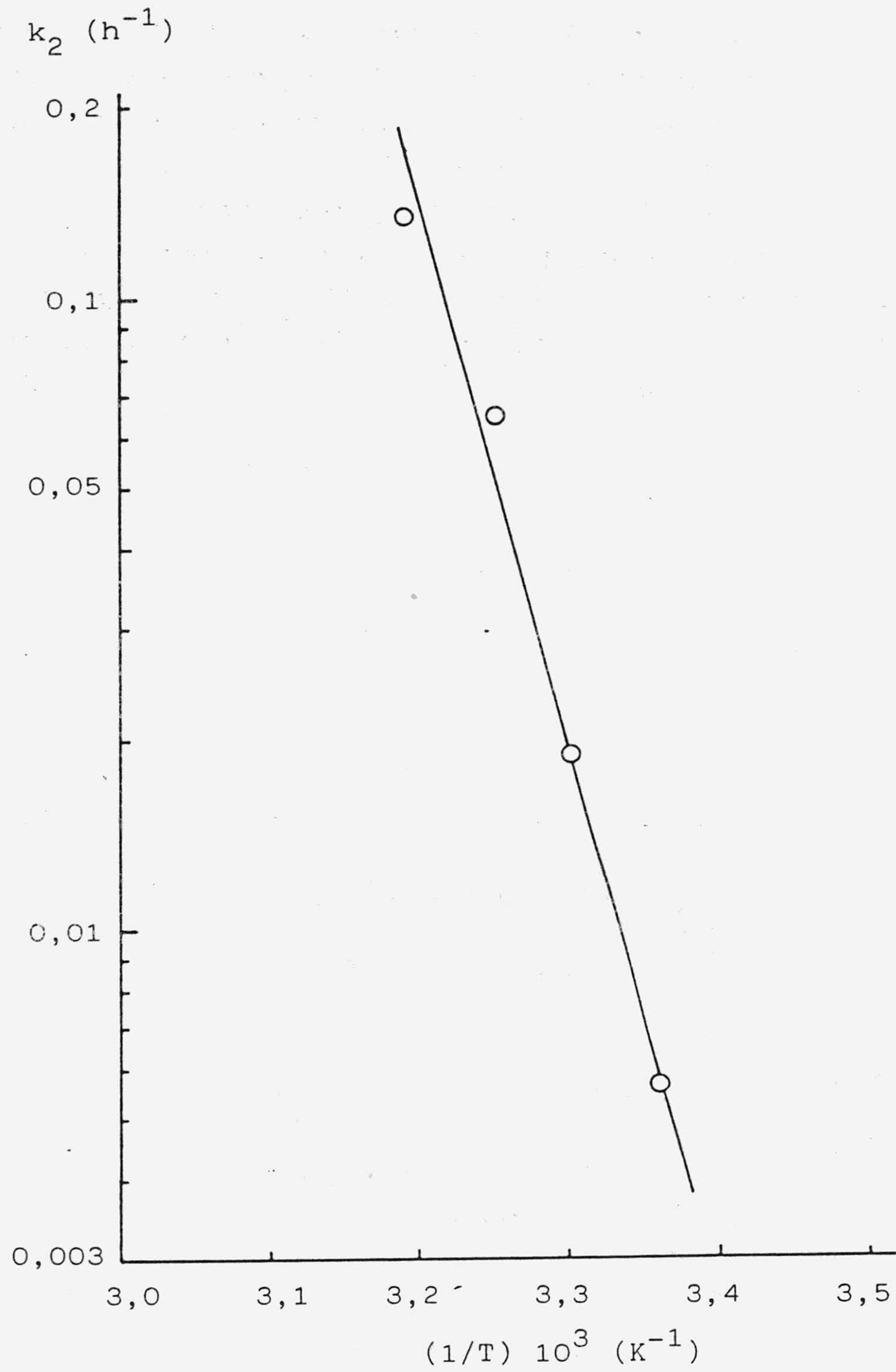


Figura 5.41.- Correlación de la constante cinética de degradación de la glucosa con la temperatura (ecuación [5.91]).

con $D/S = 3$ ml/g; en las figuras 5.42 y 5.43 se representan estas relaciones, estando C_a expresada en molalidad. La correlación de las constantes cinéticas con la concentración de ácido tiene el inconveniente de los múltiples efectos que el ácido ejerce sobre la celulosa y la brusquedad con que se pasa de unos a otros variando levemente la concentración. Las expresiones que relacionan k_1 y k_2 con C_a en las condiciones experimentales utilizadas son

$$k_1 = 8,52 \cdot 10^{-13} C_a^{6,00} \quad [5.92]$$

$$k_2 = 5,12 \cdot 10^{-3} C_a^{0,77} \quad [5.93]$$

donde C_a está expresada en tanto por cien, o bien

$$k_1 = 1,73 \cdot 10^{-4} C_a^{2,00} \quad [5.94]$$

$$k_2 = 5,90 \cdot 10^{-2} C_a^{0,26} \quad [5.95]$$

estando C_a expresada en molalidad.

En las figuras 5.44 y 5.45 se han representado los valores de k_1 y k_2 obtenidos a 25°C y con H_2SO_4 del 70%. Se observan relaciones de tipo lineal en este intervalo de D/S , que conducen a las ecuaciones

$$k_1 = 2,73 \cdot 10^{-3} (D/S) \quad [5.96]$$

$$k_2 = 1,88 \cdot 10^{-3} (D/S) \quad [5.97]$$

donde D/S está expresada en ml/g.

Las ecuaciones [5.90] a [5.97] pueden reagruparse obteniéndose las expresiones que relacionan k_1 y k_2 con las variables de operación ensayadas, que son



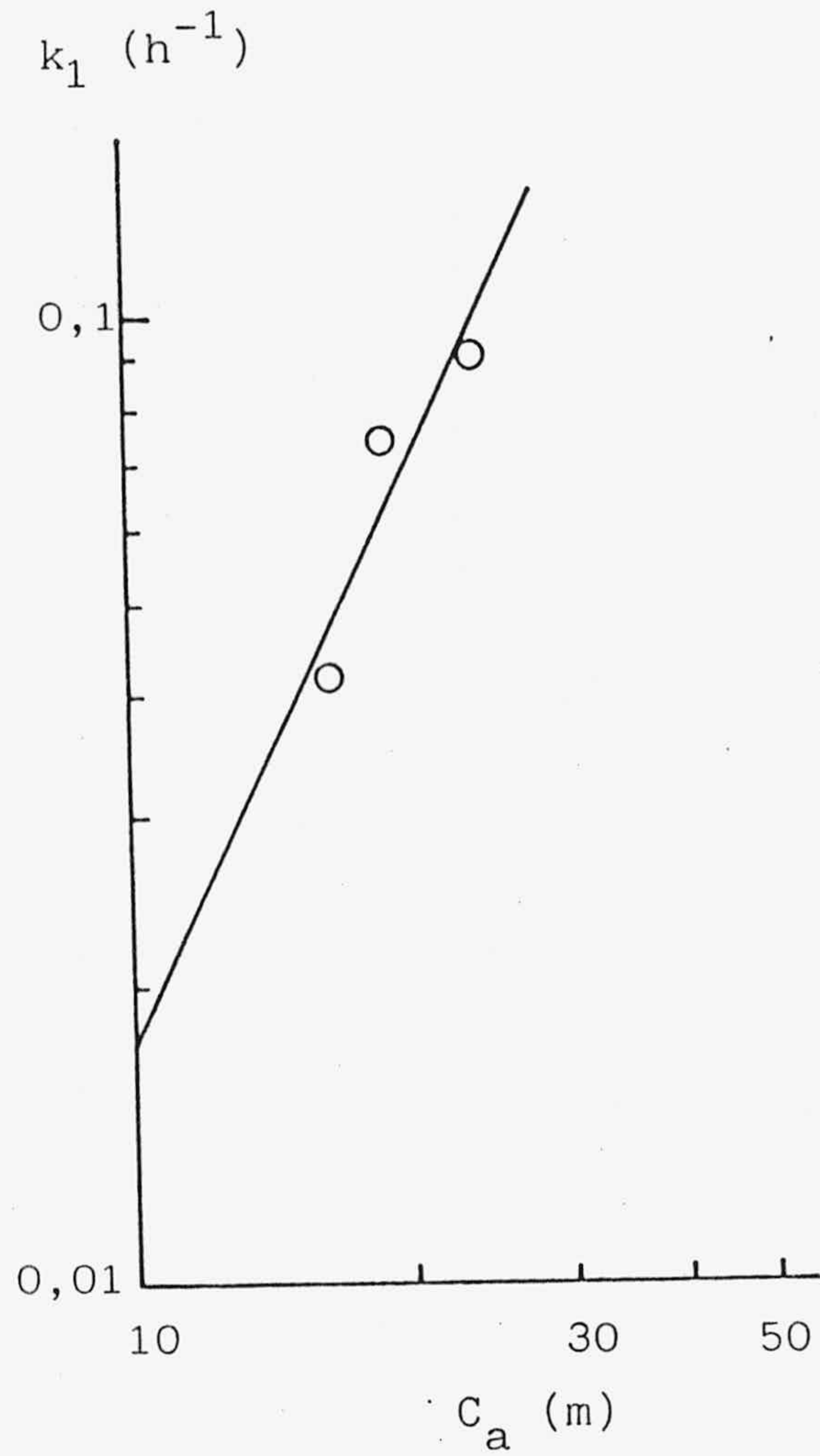


Figura 5.42.- Correlación de la constante cinética de producción de glucosa con la concentración de H_2SO_4 (ecuación [5.94]).

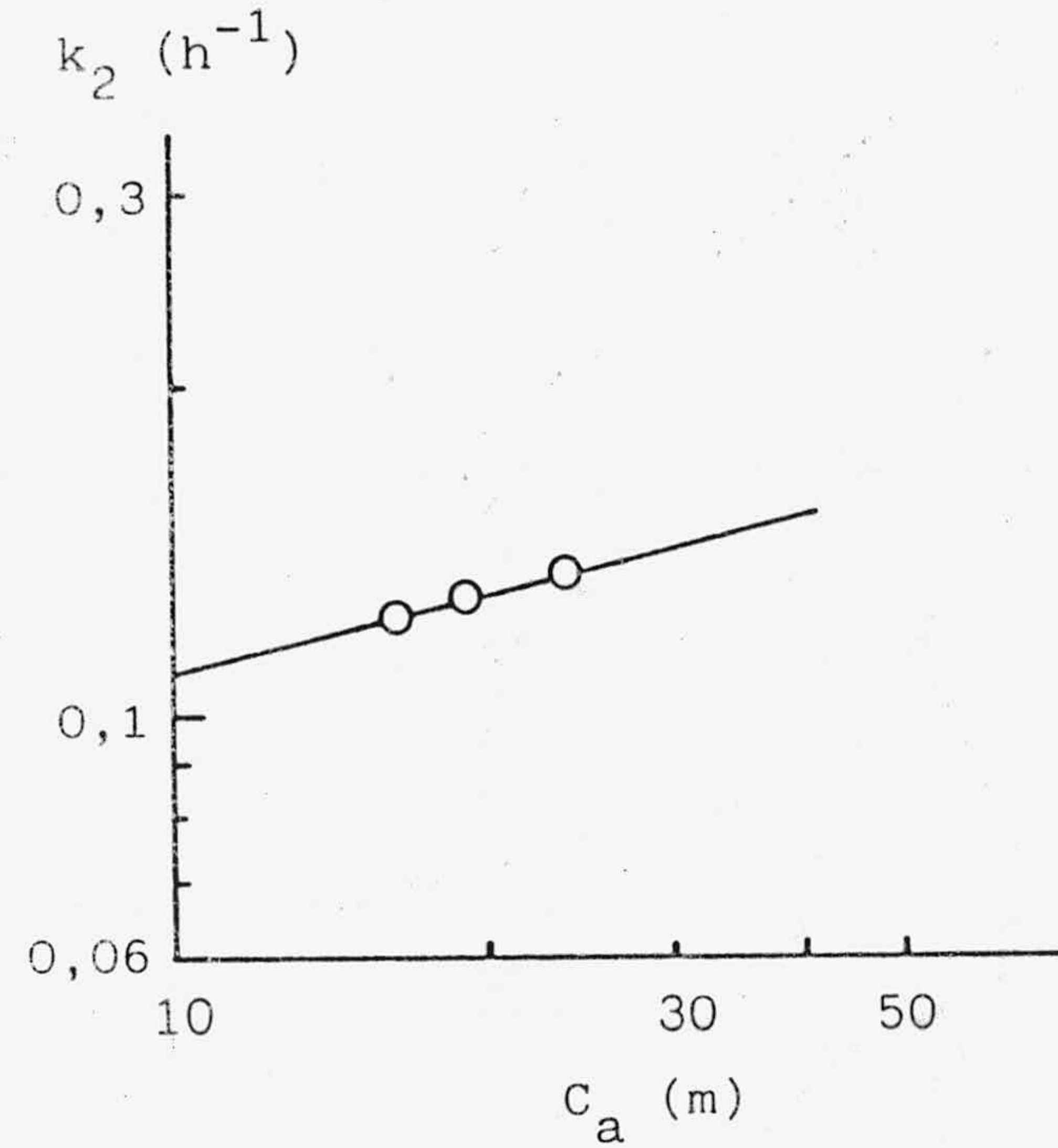


Figura 5.43.- Correlación de la constante cinética de degradación de glucosa con la concentración de H_2SO_4 (ecuación [5.95]).

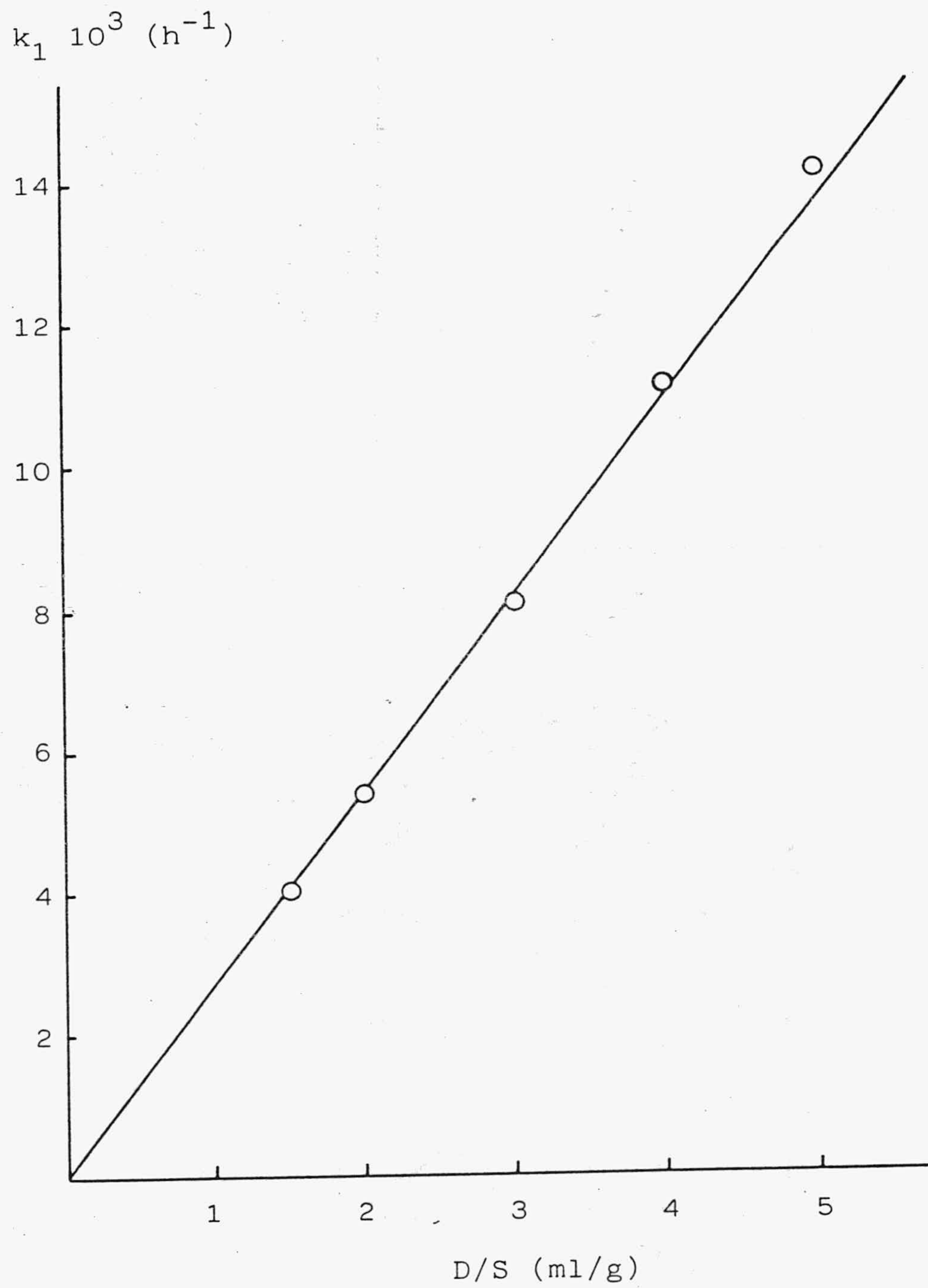


Figura 5.44.- Correlación de la constante cinética de formación de glucosa con la relación ácido/sustrato (D/S) (ecuación [5.96]).

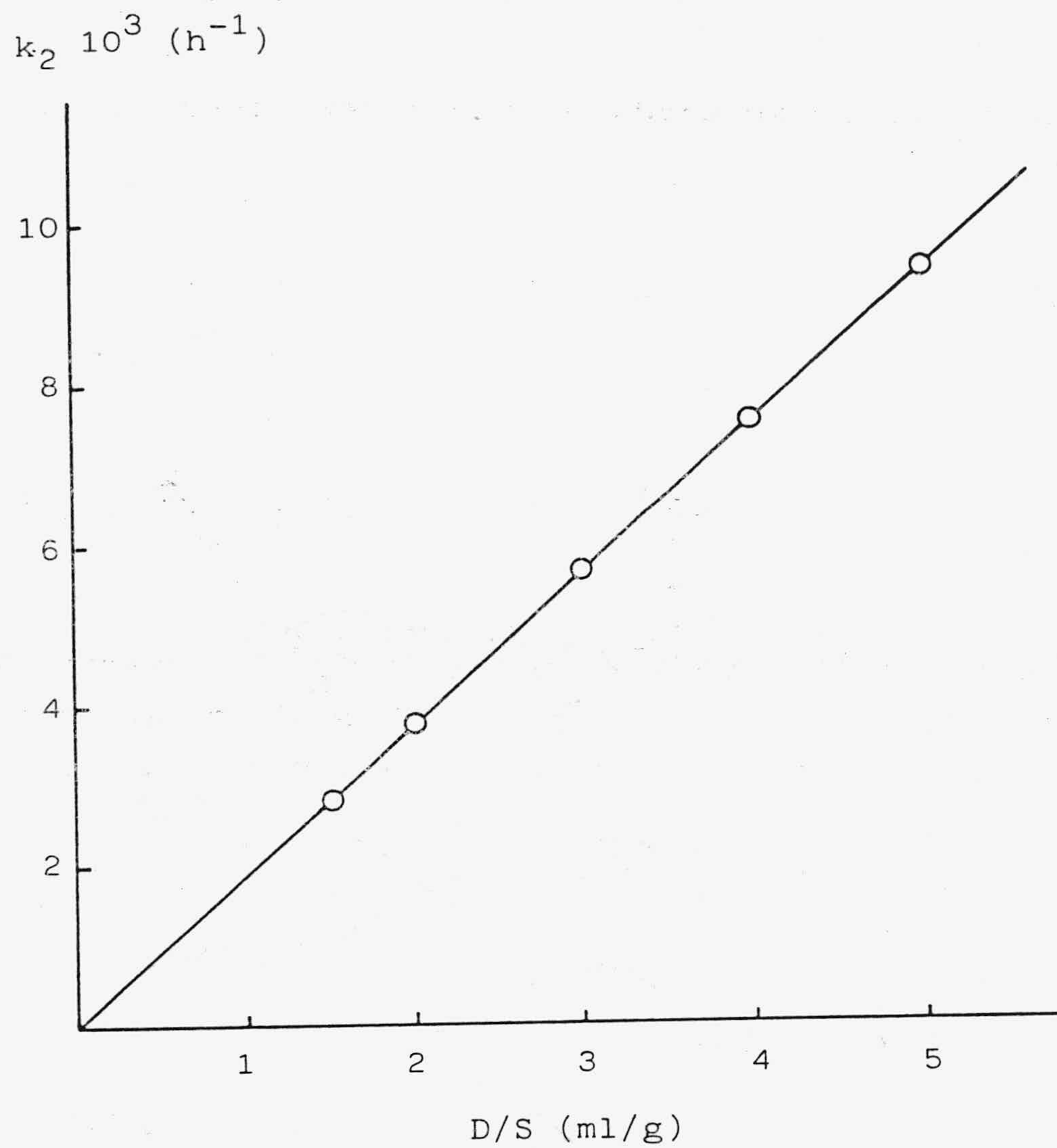


Figura 5.45.- Correlación de la constante cinética de degradación de la glucosa con la relación ácido/sustrato (D/S) (ecuación [5.97]).

$$k_1 = 4,91 \cdot 10^8 \text{ (D/S)} C_a^{6,00} \exp\left(\frac{-127,2}{RT}\right) \quad [5.98]$$

$$k_2 = 1,33 \cdot 10^{25} \text{ (D/S)} C_a^{0,77} \exp\left(\frac{-166,9}{RT}\right) \quad [5.99]$$

donde C_a está expresada en tanto por ciento en peso, o bien

$$k_1 = 9,77 \cdot 10^{16} \text{ (D/S)} C_a^{2,00} \exp\left(\frac{-127,2}{RT}\right) \quad [5.100]$$

$$k_2 = 1,53 \cdot 10^{26} \text{ (D/S)} C_a^{0,26} \exp\left(\frac{-166,9}{RT}\right) \quad [5.101]$$

donde C_a está expresada en molalidad. Estas expresiones son válidas para el sustrato utilizado en un intervalo de temperaturas de 25 a 40°C, concentraciones de H_2SO_4 entre el 62 y el 70% en peso y relaciones D/S entre 1,5 y 5 ml/g. En la tabla 5.35 se muestran los valores de k_1 y k_2 calculados con las expresiones [5.98] y [5.99]; como se observa, las desviaciones respecto a los valores experimentales son, excepto en algún caso, bajas.

Como ya se ha mencionado, la mayor parte de los investigadores que han estudiado la hidrólisis ácida de la celulosa han utilizado ácidos diluidos y altas temperaturas (tabla 2.13). En la tabla 2.14 se muestran algunos de los valores obtenidos para los parámetros que relacionan las constantes cinéticas con la temperatura y la concentración de ácido. En general se observa que en el rango de bajas concentraciones y altas temperaturas la dependencia de k_1 con la concentración de

ácido (exponente u) no es tan brusca como en el rango de altas concentraciones y bajas temperaturas ($u = 6,00$), mientras que la influencia de C_a sobre la cinética de degradación de glucosa es similar en ambas condiciones de operación.

Por otra parte, en todos los casos, excepto en los experimentos de Church y Wooldridge (1981) con serrín de roble, $u > v$, esto significa que un aumento de la concentración de ácido produciría un mayor incremento de la velocidad de formación de glucosa que de la velocidad de degradación, lo que conduce a un incremento del máximo rendimiento en glucosa. Este hecho, como lo demuestran los valores de u , debe producirse mucho más intensamente en el rango de altas concentraciones y bajas temperaturas, no obstante, esto es cierto solamente en el rango de concentraciones ensayado (62 - 70%), puesto que, como ya se ha comentado, un aumento de la concentración de ácido hasta el 75% dio lugar a una rápida carbonización de sustrato y productos, lo que hizo que las cantidades de glucosa disminuyeran con mayor rapidez de lo que el modelo preveía.

Si se compara la energía de activación aparente E_1 obtenida en este trabajo, con las obtenidas por otros investigadores (tabla 2.14) que operaron a bajas concentraciones de ácido y altas temperaturas, se observará que éstas son mayores que la obtenida en este trabajo a altas concentraciones de ácido y bajas temperaturas, mientras que con E_2 sucede lo contrario. Además, en todos los casos E_1 es mayor que su correspondiente valor de E_2 , excepto en las condiciones utilizadas en este trabajo en que $E_2 > E_1$. Esto significa que un aumento de la temperatura en el rango de bajas concentraciones de ácido y altas temperaturas favorece más la formación de glucosa que su degradación, lo que incrementa el máximo rendimiento en glucosa, mientras que a

altas concentraciones y bajas temperaturas, un aumento de ésta favorecería más la degradación de la glucosa. Por otra parte, a bajas concentraciones y altas temperaturas se incrementa más rápidamente la velocidad de formación de glucosa al incrementar la temperatura que en las condiciones utilizadas en este trabajo, mientras que con la degradación de glucosa sucede lo contrario. Sin embargo, dada la complejidad del sistema que se está considerando y el tratamiento empírico que realizan todos los investigadores que lo abordan, las conclusiones anteriores tan sólo puede asegurarse que son ciertas en los rangos experimentales estudiados y no es correcto hacer una extrapolación fuera de estos intervalos. En este sentido, Church y Wooldridge (1981) observaron que a temperaturas superiores a 215 - 225°C tiene lugar una rápida polimerización de los productos de hidrólisis y, en definitiva, una compleja secuencia de degradación de la glucosa que reduce la validez del modelo; además ha de tenerse en cuenta la posible pirólisis de la celulosa, que suele iniciarse a temperaturas del orden de 250°C.

La comparación anterior se ha realizado en términos de los exponentes u y v y de las energías de activación aparentes E_1 y E_2 , aunque también puede realizarse calculando los valores de las relaciones k_1/k_2 . En general puede decirse que los máximos rendimientos en glucosa son esencialmente independientes de k_1 y k_2 , dependiendo tan sólo de su relación. En la tabla 5.36 se muestran los valores de estas relaciones calculadas a partir de los valores experimentales de k_1 y k_2 ; también se muestran los máximos rendimientos en glucosa calculados sobre la base de glucosa potencial. Como se observa, k_1/k_2 y X_{Gmax} están directamente relacionados y ambos varían en la forma comentada según los valores de u y v y de E_1 y E_2 . Tanto k_1/k_2 como X_{Gmax} se hacen más pequeños cuanto más alta es la temperatura, debido,

Tabla 5.36

Valores máximos de los rendimientos en glucosa y tiempos óptimos en las condiciones ensayadas según los valores experimentales de k_1 y k_2 ($X_{Gmax} = 100 G_{max}/1111$).

T (°C)	C_a (%)	D/S (ml/g)	k_1/k_2	X_{Gmax} (%)	t_{opt} (h)
25	70	3,0	1,43	43,5	146
30	70	3,0	1,08	38,2	51
35	70	3,0	0,77	32,0	17
40	70	3,0	0,68	30,0	9
40	65	3,0	0,58	27,4	10
40	62	3,0	0,35	19,8	13
25	70	1,5	1,43	43,5	284
25	70	2,0	1,43	43,5	213
25	70	4,0	1,48	44,1	103
25	70	5,0	1,50	44,4	81

como ya se ha comentado, a un mayor incremento de la degradación con la temperatura. Sin embargo, un aumento de la concentración, al igual que un aumento de D/S, se traduce en un incremento de los rendimientos en glucosa.

Así pues, para conseguir una alta conversión a glucosa parece conveniente utilizar bajas temperaturas y concentraciones de ácido y relaciones D/S altas, sin embargo, para conseguir las máximas conversiones a tiempos relativamente cortos es preciso utilizar temperaturas relativamente altas, por lo que las condiciones de operación óptimas surgirán de un compromiso entre estos dos factores.

Los rendimientos máximos que se muestran en la tabla 5.36 son del mismo orden que los obtenidos a partir de residuos lignocelulósicos a altas temperaturas y bajas concentraciones de ácido (tabla 2.13), sin embargo, los tiempos necesarios para conseguirlos son, en nuestro caso, mucho más altos.

Según lo expuesto, parece evidente que para la obtención de glucosa por hidrólisis ácida es más adecuado el proceso a bajas concentraciones de ácido y altas temperaturas, si bien, sería necesario un balance económico detallado para cada tipo de sustrato. Sin embargo, a modo de pretratamiento resulta más adecuado utilizar ácidos concentrados, ya que se obtiene una solubilización total de la celulosa y, por tanto, un alto rendimiento en azúcares de DP \approx 2 en tiempos no superiores a 4 horas (tabla 5.34), por lo que puede ser útil para eliminar la cristalinidad de la celulosa, para separarla de la lignina y como prehidrólisis. Utilizado como pretratamiento no sería necesario llegar al máximo rendimiento en glucosa, ya que en este punto las pérdidas por degradación pueden ser importantes.

Por tanto, es posible que la optimización de los procesos destinados a la obtención de hidrolizados de glucosa limpios de productos de degradación y a costos razonables pueda dirigirse hacia la utilización de un proceso en dos etapas; en la primera se utilizaría como pretratamiento el ácido concentrado y en la segunda se realizaría una hidrólisis enzimática con celulasas ricas en β -1,4-glucosidasa, ya que el porcentaje de celobiosa en la disolución es previsiblemente elevado.

5.3.3. Hidrólisis enzimática de celulosa prehidrolizada con ácido sulfúrico

Los resultados obtenidos durante la hidrólisis enzimática (pH = 4,9, 40°C y distintas relaciones E/S) de una celulosa prehidrolizada con H₂SO₄ del 70% (a 40°C, D/S = 3 ml/g y 6 h) se muestran en la tabla 4.33 y se han representado en la figura 5.46.

En esta figura se observa que el rendimiento en glucosa aumenta con la concentración inicial de enzima, es decir, con la relación E/S. Sin embargo, es de destacar que la velocidad de producción de glucosa es menor que la correspondiente a la hidrólisis ácida. Además, las cantidades absolutas de glucosa obtenidas son significativamente diferentes (306 mg/g durante la hidrólisis ácida frente a 169 mg/g en las mejores condiciones de hidrólisis enzimática). Estos resultados se pueden explicar teniendo en cuenta la posible inhibición de las enzimas por los sustratos y los productos de las reacciones, celobiosa y glucosa fundamentalmente, y por las características del complejo celulolítico. En efecto, las celulasas de T. viride suelen ser deficientes en β -1,4-glucosidasa y esta enzima es posiblemente controlante en la producción de glucosa para sustratos de DP \leq 6. Por tanto, para obviar este último inconveniente se han iniciado una serie de experimentos (que no se recogen en esta Memoria) en los cuales prehidrolizados ácidos se someten a hidrólisis enzimática con β -1,4-glucosidasa de A. niger y con mezclas de esta enzima y celulasas de T. reesei.

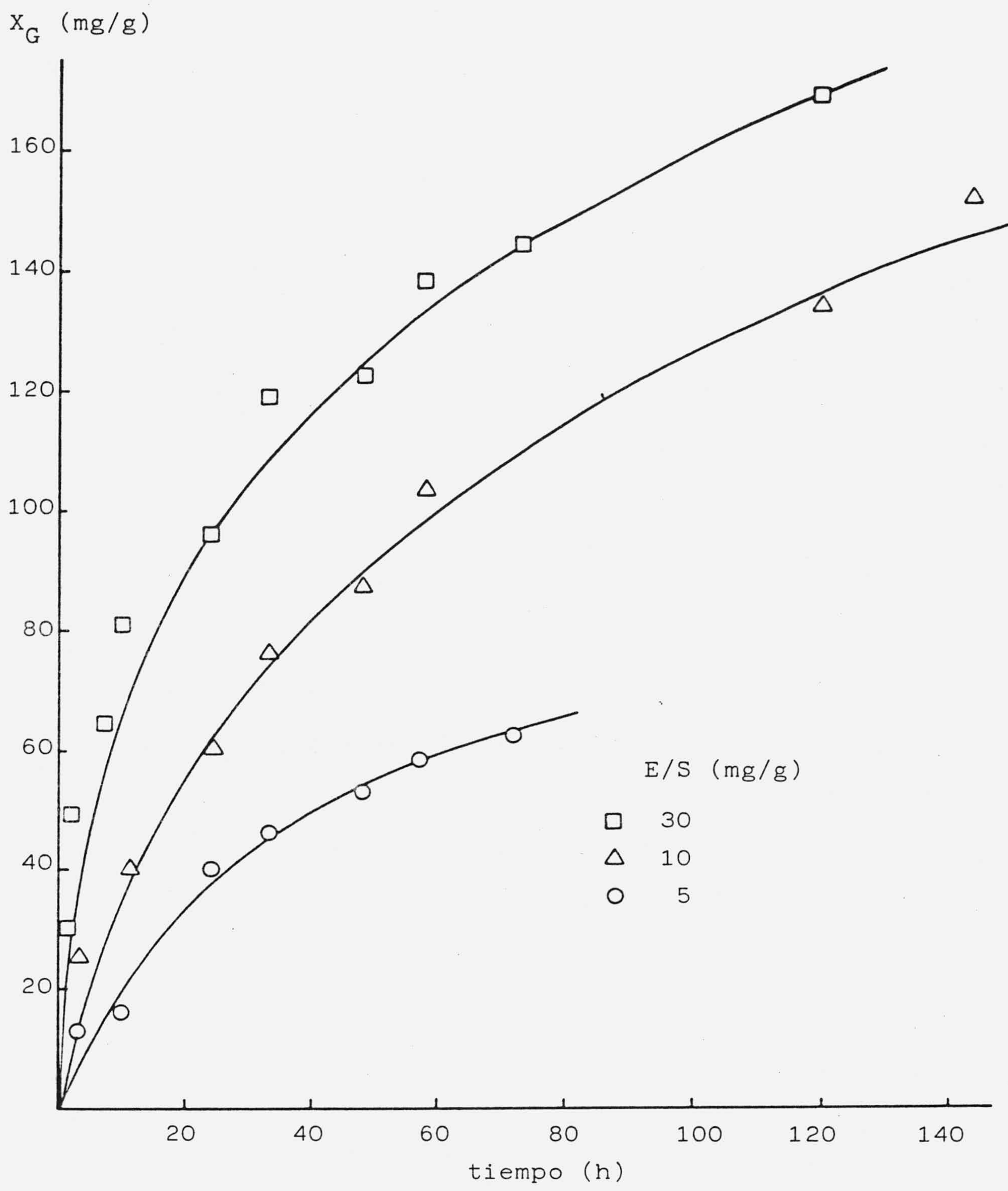


Figura 5.46.- Glucosa obtenida con distintas relaciones enzima/sustrato en la hidrólisis enzimática de celulosa prehidrolizada con H_2SO_4 del 70% (a $40^\circ C$, $D/S = 3$ ml/g y 6 h).

6. CONCLUSIONES

La interpretación de los resultados experimentales obtenidos en esta investigación, ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1.- En la hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa, en un sistema homogéneo, con celulasas de T. viride, a pH = 4,9 y 40°C, se ha observado un efecto sinérgico apreciable entre las endo y exoglucanasas, ya que mediante experimentos realizados con valores constantes de $C_{E_0} t$ se demuestra la contribución de un término de 2º orden (con respecto a la concentración de enzima) en la conversión obtenida.

2.- El efecto sinérgico observado es independiente de la concentración de sustrato, aumenta con la concentración de enzima y disminuye con el tiempo de hidrólisis. Este fenómeno se ha cuantificado mediante la expresión

$$C_A - C_{A\infty} = \frac{2,34}{t} (C_{E_0} t)^{0,8} \quad (\text{mg/l})$$

en los intervalos investigados. $C_A - C_{A\infty}$ representa la contribución del sinérgismo.

3.- Los experimentos de hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa (realizados en ausencia de sinérgismo, a pH = 4,9 y 40°C) con celulasas de T. viride, se han interpretado mediante un modelo de dos reacciones en serie con inhibición competitiva de producto

en ambas:



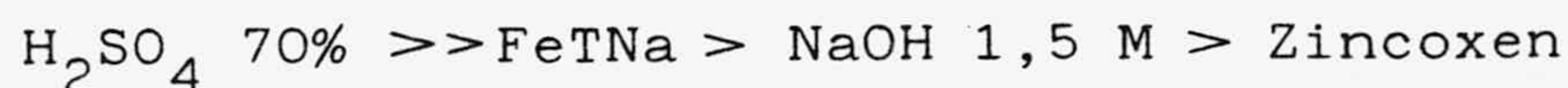
Este esquema de reacción sugiere que el sistema puede representarse por la acción combinada de la exoglucanasa y de la β -1,4-glucosidasa. El modelo permite evaluar las conversiones obtenidas, en función del producto $C_{E_0}t$, con desviaciones inferiores a $\pm 10\%$.

- 4.- Los resultados cinéticos obtenidos durante la hidrólisis enzimática de una celulosa microcristalina (con celulasas de T. viride a pH = 4,9 y 40°C) pretratada con H₂SO₄ del 70% en peso, FeTNa, zincoxen y NaOH 1,5 M, se ajustan al modelo hiperbólico de Holtzaple y col., definido por:

$$X_D = X_{Dmax} \frac{t}{t_{1/2} + t}$$

con desviaciones inferiores a $\pm 10\%$. Este modelo también es válido para estimar la velocidad inicial de producción de cadenas solubles.

- 5.- De los pretratamientos realizados (H₂SO₄ 70%, FeTNa, zincoxen y NaOH 1,5 M a 30°C y 300 rpm) el más eficaz, con gran diferencia, es el llevado a cabo con H₂SO₄ del 70%. Para la comparación entre los distintos pretratamientos se ha utilizado la velocidad inicial de producción de cadenas solubles durante la hidrólisis enzimática (con celulasas de T. viride a pH = 4,9 y 40°C) de los sustratos pretratados. Los pretratamientos se han clasificado de acuerdo con su eficacia en el siguiente orden:



- 6.- Para el pretratamiento realizado con H_2SO_4 del 70%, la velocidad inicial de producción de cadenas solubles durante la hidrólisis enzimática (r_o) ha resultado ser función de las condiciones de pretratamiento (relación disolvente/sustrato y tiempo) de acuerdo con la ecuación:

$$r_o = 2,8 (D/S) t_p^{0,30}$$

D/S en ml/g y t_p en horas.

- 7.- Los resultados obtenidos para el pretratamiento de celulosa microcristalina con H_2SO_4 , indican que para las relaciones ácido/sustrato inferiores a 1,5 ml/g y concentraciones de ácido menores que el 62%, el H_2SO_4 ejerce fundamentalmente un efecto "swelling" sobre el sustrato. En cambio, para relaciones comprendidas entre 1,5 y 5 ml de H_2SO_4 /g de sustrato y concentraciones de ácido entre el 62% y el 70%, se obtiene (a todas las temperaturas ensayadas) la hidrólisis parcial de la celulosa y su solubilización total, en un tiempo que depende de las variables de operación ensayadas:

$$t_d = 0,57 (1-0,125(D/S)) C_a^{-8,00} \exp\left(\frac{89,6}{RT}\right)$$

donde D/S está en ml/g, C_a es la concentración del ácido expresada en tanto por cien, la energía de activación aparente se expresa en KJ/mol y t_d en horas.

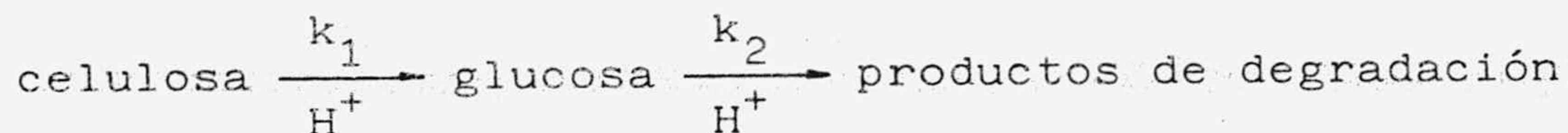
- 8.- En las condiciones en que se produce la solubiliza-



ción total de la celulosa, $D/S \geq 1,5$ ml/g y $C_a \geq 62\%$, los resultados experimentales se ajustan a una cinética de orden cero; la velocidad específica de aparición de azúcares reductores ha resultado ser función de la temperatura, de la concentración de ácido y de D/S, de acuerdo con la ecuación

$$k = 6,73 \cdot 10^{-4} (D/S) C_a^{14,31} \exp\left(\frac{-113,6}{RT}\right)$$

9.- La velocidad de aparición de glucosa, en el intervalo de temperaturas 25°C a 40°C , $62\% \leq C_a \leq 70\%$ y relaciones $1,5 \leq D/S \leq 5,0$ ml/g, se ajusta a un modelo de dos reacciones pseudohomogéneas, en serie y de primer orden:



10.- Los valores experimentales de las constantes cinéticas, k_1 y k_2 , de las reacciones anteriores, se han correlacionado con la temperatura, la concentración de H_2SO_4 y la relación ácido/celulosa, mediante las expresiones

$$k_1 = 4,91 \cdot 10^8 (D/S) C_a^{6,0} \exp\left(\frac{-127,2}{RT}\right)$$

$$k_2 = 1,33 \cdot 10^{25} (D/S) C_a^{0,77} \exp\left(\frac{-166,9}{RT}\right)$$

7. NOMENCLATURA

- A Cantidad de azúcares reductores, mg de glucosa equivalente (hidrólisis enzimática), mg de glucosa equivalente/g de sustrato inicial (hidrólisis ácida)
- A_0 Cantidad inicial de azúcares reductores, mg de glucosa equivalente
- A_{610} Absorbancia a 610 nm
- A_{640} Absorbancia a 640 nm
- B' Constante que relaciona la velocidad de producción de azúcares reductores por efecto sinérgico con la concentración inicial de enzima (ecuación [5.6]).
- C_A Concentración de azúcares reductores, mg/l de glucosa equivalente
- C_a Concentración de H_2SO_4 , % o m
- C_{As} Concentración de azúcares reductores obtenidos por efecto sinérgico, mg/l de glucosa equivalente
- C_{A_0} Concentración inicial de azúcares reductores, mg/l de glucosa equivalente
- C_{A_∞} Concentración de azúcares reductores obtenidos en ausencia de efecto sinérgico, mg/l de glucosa equivalente
- C_D Concentración de celobiosa, mg/l de glucosa equivalente

- C_E Concentración de enzima, mg/l
- C_{Ex} Concentración de endo y exoglucanasas, mg/l
- C_{Eo} Concentración inicial de enzima, mg/l
- C_{E_1} Concentración inicial de endoglucanasas, mg/l
- C_{E_2} Concentración inicial de exoglucanasas, mg/l
- C_{E_3} Concentración inicial de β -1,4-glucosidasa, mg/l
- C_G Concentración de glucosa, mg/l
- C_S Concentración de sustrato, mg/l o g/l de glucosa potencial o enlaces hidrolizables
- C_{Si} Concentración inicial de sustrato, g/l
- C_{So} Concentración inicial de sustrato, mg/l de glucosa potencial o enlaces hidrolizables
- D Celobiosa
- D_o Cantidad inicial de azúcares reductores de grado de polimerización mayor que uno, $DP > 1$, mg de glucosa equivalente
- D/S Relación entre el volumen de disolvente o agente de pretratamiento (hidrólisis enzimática) o el volumen de H_2SO_4 (hidrólisis ácida) y el peso de sustrato, ml/g
- E Enzima
- E_{ad} Enzima adsorbida sobre el sustrato

- E^f Enzima libre (en disolución)
- E_x Fracción de endo y exoglucanasas presentes en el complejo celulolítico
- E_o Cantidad inicial de enzima, mg
- E_1 Endoglucanasa
Energía de activación aparente para la relación de k_1 con T, KJ/mol (hidrólisis ácida)
- E_2 Exoglucanasa
Energía de activación aparente para la relación de k_2 con T, KJ/mol (hidrólisis ácida)
- E_3 Fracción de β -1,4-glucosidasa contenida en el complejo enzimático
- E/S Relación entre el peso de enzima y el peso de sustrato, mg/g
- G Cantidad de glucosa, mg (hidrólisis enzimática), mg/g de celulosa inicial (hidrólisis ácida)
- G_o Cantidad inicial de glucosa, mg
- K Parámetro del modelo potencial (ecuación [5.53]), mg/g.hⁿ
- k Constante cinética aparente de producción de azúcares reductores o de solubilización de la celulosa, mg/g.h
- k_1 Constante cinética (ecuación [5.27]), (mg min/l)⁻¹ (hidrólisis enzimática)

Constante cinética aparente de formación de glucosa, h^{-1} (hidrólisis ácida)

k_2 Constante cinética (ecuación [5.28]), min^{-1} (hidrólisis enzimática).

Constante cinética aparente de degradación de glucosa, h^{-1} (hidrólisis ácida)

Para el resto de las constantes cinéticas ver ecuaciones [5.27] a [5.32].

M Peso de sacáridos de $\text{DP} > 1$, mg o g

M_A Peso molecular medio de los sacáridos de $\text{DP} > 1$

M_a Peso molecular del agua

M_D Peso molecular de la celobiosa

M_G Peso molecular de la glucosa

M_{Ga} Peso molecular de la glucosa anhidra

M_T Peso total de sacáridos (solubles y no solubles)

N Número de equivalentes (extremos reductores) de sacáridos disueltos de $\text{DP} > 1$

n Parámetro del modelo potencial (ecuación [5.53])

p Grado medio de polimerización del sustrato en un instante dado

p_0 Grado medio de polimerización inicial de la celulosa

p' Grado medio de polimerización de todos los sacáridos de $\text{DP} > 1$

- R Constante de los gases perfectos, KJ/k.mol
- r Velocidad de producción de azúcares reductores, mg/l.min
- r_o Velocidad inicial de producción de azúcares reductores con respecto a $C_{Eo}t$, min^{-1} (hidrólisis de CMC)
- Velocidad inicial de producción de azúcares reductores de $DP > 1$, mg/g.h (hidrólisis enzimática de celulosa pretratada)
- S Cantidad de sustrato, mg de glucosa potencial
- S_{am} Fracción de celulosa en el sustrato de estructura amorfa
- S_{cr} Fracción de celulosa en el sustrato de estructura cristalina
- S^f Sustrato libre (sin enzima adsorbida)
- S_i Cantidad inicial de celulosa en la hidrólisis enzimática (g)
- S_o Cantidad inicial de celulosa en la hidrólisis ácida, mg de glucosa potencial
- T Temperatura, °C o K
- t Tiempo de hidrólisis enzimática o ácida, h o min
- Tiempo de permanencia de la enzima a 40°C y pH=4,9, h (desnaturalización de la enzima)
- t_d tiempo de disolución de la celulosa por hidrólisis ácida, h

- t_i Tiempo de incubación, h o min
- t_p Tiempo de pretratamiento, h
- t_{opt} Tiempo que tarda en alcanzarse el máximo rendimiento en glucosa, h
- $t_{1/2}$ Parámetro del modelo hiperbólico: tiempo que tarda en alcanzarse $\frac{1}{2}X_{Dmax}$ (ecuación [5.52]), h
- u Exponente a que está elevada C_a en la expresión que relaciona k_1 con las condiciones experimentales (ecuaciones [5.98] y [5.100])
- v Exponente a que está elevada C_a en la expresión que relaciona k_2 con las condiciones experimentales (ecuaciones [5.99] y [5.101])
- X_A Conversión del sustrato a azúcares reductores, tanto por uno de glucosa potencial (hidrólisis de CMC), mg de glucosa equivalente/g de sustrato o % (hidrólisis de celulosa pretratada)
- X_D Conversión de la celulosa a sacáridos solubles de DP > 1 por hidrólisis enzimática, mg de glucosa equivalente/g de sustrato inicial
- X_{Dmax} Parámetro del modelo hiperbólico que representa el valor máximo de X_D (ecuación [5.52]), mg de glucosa equivalente/g de sustrato inicial
- D_{D2} Conversión de la celulosa a sacáridos solubles de DP > 1, mg de celobiosa equivalente/g de sustrato
- X_G Conversión de la celulosa a glucosa por hidrólisis enzimática, mg/g de sustrato inicial o %

X_{Gmax} Máximo rendimiento en glucosa obtenido sobre la base de glucosa potencial, %

X_S Conversión de la celulosa a sacáridos solubles, mg/g de celulosa inicial o %

α Constante que relaciona B' y $C_{E_0} t$ (efecto sinérgico) (ecuación [5.8])

Relación entre la cantidad de endo y exoglucanasas (E_x) presentes en el complejo enzimático y la cantidad total de enzima (E_0)

8. BIBLIOGRAFIA

- AGUILERA SANCHEZ J. F.; Primeras Jornadas de Introducción a la Química Agrícola. Granada (1984).
- ALLEN A. L. y MORTENSEN R. E.; *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 2641 (1981).
- ANTAL M. J. Jr.; *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, 22, 2, 366 (1983).
- ARIAS ERGUETA P. L., LEGARRETA FERNANDEZ J. A., GUTIERREZ-CAÑAS MATEO C. y MINGUITO SALABARRIA J. J.; VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias. Murcia. Octubre (1985).
- ARRIETA-ESCOBAR A., BELIN J. M.; *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 983 (1982).
- BARNETT S. M., CLARK J. P. y NYSTROM J. M., Eds.; *AIChE Symposium Series*, 72, 158 (1976).
- BELTRANE P. L., CARNITI P., FOCHER B., MARZETTI A. y SARTO V.; *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1233 (1984).
- BEN-BASSAT A., LAMED R. y ZEIKUS J. G.; *J. Bacteriol.*, 146, 192 (1981).
- BEN-GHEDALIA D. y MIRON J.; *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 823 (1981).
- BERGHEM E. R. y PETERSSON L. G.; *Eur. J. Biochem.*, 53, 55 (1975).

- BERGHEM E. R., PETERSSON L. G. y AXIO-FREDRIKSSON U.-B.; Eur. J. Biochem., 53, 55 (1975).
- BHANDARI N., MACDONALD D. G. y BAKHUSHI N. N.; Biotechnol. Bioeng., 26, 320 (1984).
- BILBAO DUÑABEITIA R., ARAUZO PEREZ J., MILLERA PERALTA A. y LEZAUN NAVARRO J.; VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias. Murcia. Octubre (1985).
- BINDER A. y GHOSE T. K.; Biotechnol. Bioeng., 20, 1187 (1978).
- BINDER A., PELLONI L. y FIECHTER A.; Eur. J. Microbiol., 11, 1 (1980).
- BISSET F. y STERNBERG D.; Appl. and Environ. Microbiol., 35, 4, 750 (1978).
- BOZA J., MOLINA E., GUERRERO J. E. y AGUILERA J. F.; Anales de Edafología y Agrobiología, 41, 1063 (1982).
- BRENNER W., RUGG B., STANTON R., ARMSTRONG P. y ANG K.-M.; Municipal Solid Waste: Resource Recovery, Proceeding of the fifth Annual Research Symposium, EPA-600/9-79-0236, p. 99, Agosto (1979).
- BUCHHOLZ K., PULS J., GODELMANN B. y DIETRICH H. H.; Process. Biochemistry, Dec/Jan, 37 (1980/81).
- BUENO CORDERO J., ESTEVEZ SANCHEZ A. M., FERNANDEZ TENA A., MARTIN SANCHEZ J. L. y RAMOS CASTELLANOS P.; VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias. Murcia. Octubre (1985).
- CAMACHO RUBIO F., BRAVO RODRIGUEZ V., PAEZ DUEÑAS M.

- P. y MARTINEZ COBO T.; Anales de Química, Serie A, 83, 1, 71 (1987).
- CAMACHO RUBIO F., GONZALEZ TELLO P., JIMENEZ CASTILLO J. M. y MOYA VILAR M.; Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Pendiente de publicación (1987).
 - CAMINAL G., LOPEZ SANTIN J. y SOLA C.; Biotechnol. Bioeng., 27, 1282 (1985).
 - CASTANON M. y WILKE C. R.; Biotechnol. Bioeng., 22, 1037 (1980).
 - CLARKE A. E. y STONE B. A.; Biochem. J.; 96, 802 (1965).
 - CORELLA TUDANCA J., VALENCIA GARETA M., ADANEZ ELORZA J. y AZNAR VILLACAMPA M. P.; VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias. Murcia. Octubre (1985).
 - COUSIN M. A.; Annual Reports on Fermentation Processes. Tsao G. T., Ed. Academic Press, 4, 31 (1980).
 - CRAWFORD D. L. y McCOY E.; Appl. Microbiol., 24, 150 (1972).
 - CRAWFORD D. L., McCOY E., HARKIN J. M. y JONES P.; Biotechnol. Bioeng., 15, 833 (1973).
 - CHAHAL D. S., MOO-YOUNG M. y VLACH D.; Biotechnol. Bioeng., 23, 2417 (1981).
 - CHUNG I. S. y LEE Y. Y.; Biotechnol. Bioeng., 27, 308 (1985).
 - CHURCH J. A. y WOOLDRIDGE D.; Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., 20, 2, 371 (1981).

- DESROCHERS M., JURASEK L. y PAICE G.; Appl. and Environ. Microbiol., 42, 222 (1981).
- DETROY R. W., CUNNINGHAM R. L., BOTHAST R. J., BAGBY M. O. y HERMAN; Biotechnol. Bioeng., 24, 1105 (1983).
- DETROY R. W., LINDENFELSER L. A., SOMMER S. y ORTON W. L.; Biotechnol. Bioeng., 23, 1527 (1981).
- DIGHE A. S., PATEL P. M. y RAO K. K.; Biotechnol. Bioeng., 27, 1612 (1985).
- ERIKSSON K. E.; Biotechnol. Bioeng., 20, 317 (1978).
- ERIKSSON K. E. y LARSSON K.; Biotechnol. Bioeng., 17, 327 (1975).
- FAGAN R. D., GRETHLEIN H. E., CONVERSE A. O., PORTEOUS A.; Environ. Sci. & Technol., 5, 6, 545 (1981).
- FAN L. T., GHARPURAY M. M. y YONG-HYUN LEE; Biotechnol. Symp., 11, 29 (1981).
- FANTA G. T., ABBOTT T. P., HERMAN A. I., BURR R. C. y DOANE W. M.; Biotechnol. Bioeng., 26, 1122 (1984).
- FERNANDEZ GONZALEZ J.; Ingeniería Química, 12, 23 (1980).
- FONT MONTESINOS R., MARCILLA GOMIS A., VERDU SANCHEZ E. y DEVESA MARTINEZ J.; VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias. Murcia. Octubre (1985).
- FORZIATI F. H., STONE W. K., ROWEN J. W. y APPEL W. D.; J. Res. Nat. Bur. Stand., 45, 2, 109 (1950).

- FU T. T. y THAYER D. W.; *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 1749 (1975).
- FUJII M., MURAKAMI S., YAMADA Y., ONA T. y NAKAMURA T.; *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1393 (1981).
- GARCIA MARTINEZ D. V., SHINMYO A., MADIA A. y DEMAIN A. L.; *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 9, 3, 189 (1980).
- GARG S. K., NEELAKATAN S.; *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 737 (1982).
- GHOSE T. K., ROYCHOUDHURY P. K. y GHOSH P.; *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 377 (1984).
- GHOSH V. K., GHOSE T. K. y GOPALKRISHNAN K. S.; *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 241 (1982).
- GILBERT I. G. y TSAO G. T.; *Annual Reports on Fermentation Processes*. Tsao G. T., Ed. Academic Press, 6, 323 (1983).
- GONZALEZ G., LOPEZ SANTIN J., CAMINAL G. y SOLA C.; *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 288 (1986).
- GOULD J. M.; *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 46 (1984).
- GOULD J. M.; *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 225 (1985).
- GRETHLEIN H. E.; *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 503 (1978).
- GRETHLEIN H. E.; *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 5, 303 (1975).
- GRETHLEIN H. E. y CONVERSE A. O.; *Int. Symp. on Ethanol from Biomass*. Winnipeg (1982).

- GRETHLEIN H. E.; Dartmou College, Report on the visit to the Commercial and Research Center for the Acid Hydrolysis Industry, Gydrolizprom, Leningrad, URSS (1977).
- GROUS W., CONVERSE A., GRETHLEIN H. y LYND L.; Biotechnol. Bioeng., 27, 463 (1985).
- GUHA B. K. y TITCHENER A. L.; Acid Hydrolysis of Wood, Report n°. 56, New Zealand Emergy Research and Development Committee, January (1981).
- HAMILTON T. J., DALE B. E., LADISH M. R. y TSAO G. T.; Biotechnol. Bioeng., 26, 781 (1984).
- HAN Y. W. y CALLIHAN C. D.; Appl. Microbiol., 27, 159 (1974).
- HAN Y. W., TIMPA J., CIEGLER A., COURTNEY J., CURRY W. F. y LAMBREMONT E. N.; Biotechnol. Bioeng., 23, 2525 (1981).
- HARDT H. y LAMPORT D. T. A.; Biotechnol. Bioeng., 24, 903 (1982).
- HERRERO A. A. y GOMEZ R. F.; Appl. and Environ. Microbiol., 40, 571 (1980).
- HOLTZAPPLE M. T., CARAM H. S. y HUMPHREY A. E.; Biotechnol. Bioeng., 26, 753 (1984).
- HOLTZAPPLE M. T., CARAM H. S. y HUMPHREY A. E.; Biotechnol. Bioeng., 26, 775 (1984).
- HOLTZAPPLE M. T., CARAM H. S. y HUMPHREY A. E.; Biotechnol. Bioeng., 26, 936 (1984).

- HOLTZAPPLE M. T. y HUMPHREY A. E.; Biotechnol. Bioeng., 26, 670 (1984).
- HONG J., LADISCH M. R., GONG C. S., WANKAT P. C. y TSAO G. T.; Biotechnol. Bioeng., 23, 2779 (1981).
- HOWELL J. A. y MANGAT M.; Biotechnol. Bioeng., 20, 847 (1978).
- HOWELL J. A. y STUCK J. D.; Biotechnol. Bioeng., 17, 873 (1975).
- HUANG A. A.; Biotechnol. Bioeng., 17, 1421 (1975).
- HUMPHREY A. E.; Single Cell Protein. Tannenbaum S. R. y Wang C., Eds. Cambridge, M. A., 2, 1 (1975).
- JAIN D. y GHOSE T. K.; Biotechnol. Bioeng., 26, 340 (1984).
- JOGLEKAR R., CLERMAN R. J., OUELLETTE R. P. y CHEREMISINOFF P. N.; Biotechnology in Industry. Selected Applications and Unit Operations. Ann Arbor Science Publishers, Ed. Collingwood. Michigan (1983).
- KAMAKURA M. y KAETSU I.; Biotechnol. Bioeng., 24, 991 (1982).
- KOICHIRO K., KOEI K. A., FUMIHIDE S., KEUCHI K. y MAYUMI K.; Biotechnol. Bioeng., 24, 374 (1982).
- KOUKLOS E. G. y VALKANAS G. N.; Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., 21, 2, 309 (1982).
- LAMED R. y ZEIKUS J. G.; J. Bacteriol., 144, 569 (1980).

- LEE S. E., ARMIGER W. B., WATTEEUW C. M. y HUMPHREY A. E.; *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 141 (1978).
- LEE Y.-H. y FAN L. T.; *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2383 (1982).
- LEONARD R. H. y HAJNY G. J.; *Ind. Eng. Chem.*, 37, 4, 390 (1945).
- LOPEZ LEIVA M.; *Ingeniería Química*, Enero, 155 (1983).
- MANDELS M.; *Annual Reports on Fermentation Processes*. Tsao G. T., Ed. Academic Press. 5, 35 (1982).
- MANDELS M.; *ASM News*, 47, 174 (1981).
- MANDELS M., ANDREOTTI R. y ROCHE C.; *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 6, 21, (1976).
- MANDELS M., HONTZ L. L. y NYSTROM J.; *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 1471 (1974).
- MANDELS M., MEDEIROS J. E., ANDREOTTI R. E. y BISSETT F. H.; *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 2009 (1981).
- MANGAT M. N. y HOWELL J. A.; *AIChE Symp. Series*, 74, 172, 77 (1981).
- MCGINNIS G. D., WILSON W. W. y MULLEN C. E.; *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, 22, 2, 352 (1983).
- MCGINNIS G. D., WILSON W. W., PRICE S. E. y CHYL-CHENG CHEN; *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, 22, 4, 633 (1983).
- MEYER H. P. y HUMPHREY A. E.; *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 1901 (1982).

- MILLER G. L.; Anal. Chem., 31, 3, 426 (1959).
- MILLETT M. A., BAKER A. J. y SATTER L. D.; Biotechnol. Bioeng. Symp., 6, 125 (1976).
- MIRON J. y BEN-GHEDALIA D., Biotechnol. Bioeng., 23, 2863 (1981).
- MISHRA S., GOPALKRISHNAN K. S. y GHOSE T. K.; Biotechnol. Bioeng., 24, 251 (1982).
- MISHRA C., RAO M., SEETA R., SRINIVASAN M. C. y DESHPANDE V.; Biotechnol. Bioeng., 26, 370 (1984).
- MONTENECOURT B. S. y EVELEIGH D. E.; Appl. and Environ. Microbiol., 33, 1, 178 (1977).
- MOO-YOUNG M., CHAHAL D. S., SWAN J. E. y ROBINSON C. W.; Biotechnol. Bioeng., 19, 527 (1977).
- MOO-YOUNG M., MOREIRA A. R. y DAUGULIS A. J.; Can. J. of Chemical Engineering, 57, December, 741 (1979).
- MORGAN C. R., WARNER J. P. y JURCHAK S.; Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., 20, 1, 185 (1981).
- NEELY W. C.; Biotechnol. Bioeng., 26, 59 (1984).
- NEILSON M. J., KELSEY R. G. y SHAFIZADEH F.; Biotechnol. Bioeng., 24, 293 (1982).
- NISHIO N. y NAGAI S.; Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 11, 156 (1981).
- NISIZAWS K.; J. Ferment. Technol., 51, 4, 267 (1973).
- OHLSON I., TRAGARDH G. y HAHN-HÄGERDAL B.; Biotechnol. Bioeng., 26, 647 (1984).

- OKAZAKI M. y MOO-YOUNG M.; Biotechnol. Bioeng., 20, 637 (1978).
- PEITERSEN N.; Biotechnol. Bioeng., 17, 361 (1975).
- PEITERSEN N., MEDEIROS J. y MANDELS M.; Biotechnol. Bioeng., 19, 1091 (1977).
- PEMBERTON M. S., BROWN R. D. Jr. y EMERT G. H.; Can. J. Chem. Eng., 58, December, 723 (1980).
- PEW J. C. y WEYNA P.; Tappi, 45, 3, 247 (1962).
- PURI V. P.; Biotechnol. Bioeng., 26, 1219 (1984).
- PYE E. K. y HUMPHREY A. E.; Production of Liquid Fuels from Cellulosic Biomass. Proc 3rd. Ann. Biomass Energy Systems Conf. June, 69 (1979).
- RANGANATHAN S., NACDONALD D. G. y BAKHSKI N. N.; Can. J. of Chemical Engineering, 63, october, 840 (1985).
- REESE E. T. y MANDELS M.; Biotechnol. Bioeng., 22, 323 (1980).
- ROSS R. A. y FONG P.; Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., 20, 1, 197 (1981).
- RUBIO TORRES M., ABATZOGLOU N. y CHORNET E.; Afinidad, 42, mayo-junio, 305 (1985).
- RYU D., ANDREOTTI R., MANDELS M., GALLO B. y REESE E. T.; Biotechnol. Bioeng., 21, 1887 (1979).
- RYU D., LEE S. B., TASSINARI T. H. y MACY C. F.; Biotechnol. Bioeng., 24, 1047 (1982).

- SADDLER J. N., BROWNELL H. H., CLERMONT L. P. y LEVITIN N.; *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 1389 (1982).
- SADDLER J. N. y KHAN A. W.; *Can. J. Microbiol.*, 27, 288 (1981).
- SAEMAN J. F.; *Ind. Eng. Chem.*, 37, 43 (1945).
- SARKANEN K. V. y TILLMAN D. A., Eds.; *Progress in Biomass Conversion*. Academic Press. New York (1980).
- SCHUTZ E.; *Z. Physiol. Chem.*, 9, 577 (1885).
- SELKE S. M., HAWLEY M. C., HARDT H., LAMPORT D. T. A., SMITH G. y SMITH J.; *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, 21, 1, 11 (1982).
- SHIRKOT C. K., MANN D., DHAWAN S., GUPTA A. K. y GUPTA K. G.; *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 1233 (1982).
- SRINIVASAN V. R.; *AIChE Symposium Series*, 74, 172, 123 (1978).
- SRINIVASAN V. R. y BUMM M. W.; *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 1413 (1974).
- STERNBERG D.; *Appl. and Environ. Microbiol.*, 31, 5, 648 (1976).
- STERNBERG D. y DORVAL S.; *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 181 (1979).
- STERNBERG D., VIJAYAKUMAR P. y REESE E. T.; *Can. J. Microbiol.*, 23, 139 (1977).
- SUGA K., van DEDEM G. y MOO-YOUNG M.; *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 185 (1975).

- SUGA K., van DEDEM G. y MOO-YOUNG M.; *Biotechnol Bioeng.*, 17, 433 (1975).
- SUNDSTROM D. W., KLEI H. E., COUGHLIN R. W., BIEDERMAN G. J. y BROUWER C. A.; *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 473 (1981).
- TANAHASHI M., TAKADA S., AOKI T., GOTO T., HIGUCHI T. y HANAI S.; *Wood Res.*, 69, 36 (1982).
- TANIGUCHI M., KOMETANI Y., TANAKA M., MATSUNO R., y KAMIKUBO T.; *Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 14, 74 (1982).
- TASSINARI T. H., MACY C. F. y SPANO L. A.; *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 1495 (1982).
- THAYER D. W.; *AIChE Symposium Series*, 74, 172, 126 (1978).
- THOMSON D. R. y GRETHLEIN H. E.; *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, 18, 3, 166 (1979).
- TOCK R. W., RICHARDSON C. R., GANCARZ I., CHANG J. y OWSLEY M. R.; *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, 21, 1, 101 (1982).
- TSAO T. G., LADISCH M., LADISCH C., HSU T. A., DALE B. y CHOU T.; *Annual Reports on Fermentation Processes*. Perlman, Ed. Academic Press. 2, 1 (1978).
- UPDEGRAFF D. M.; *Biotechnol. Bioeng.*, 13, 77 (1971).
- VALLANDER L. y ERIKSON K. E.; *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 650 (1985).
- VIAN A.; *Curso de Introducción a la Química Industrial.*

- Ed. Alhambra (1976).
- WALD S., WILKE C. R. y BLANCH H. W.; *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 221 (1984).
 - WALSETH C. S.; *Tappi*, 35, 228 (1952).
 - WAYMAN M. y DZENIS A.; *Can. J. of Chem. Eng.*, 62, October, 699 (1984).
 - WEI C.-Y. y CHENG C.-Y.; *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1418 (1985).
 - WERNER W., REY G. y WIELINGER H.; *Z. Analyt. Chem.*, 252, 224 (1970).
 - WHEATLEY M. A. y MOO-YOUNG M.; *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 219 (1977).
 - WHITAKER D. R.; *The Enzymes*. Boyer, Ed., 4, 273.
 - WILKE C. R., MAIORELLA B., SCIAMANNAN A., TANGU R., WILEY D. y WONG H.; *Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*. Noye Data Corporation. Park Ridge. N. Jersey (1983).
 - WILSON D. U. y THAYER D. W.; *AIChE Symposium Series*, 74, 172, 136 (1978).
 - WOOD T. M.; *Biochem. J.*, 115, 457 (1969).
 - WOOD T. M. y McCRAE S. I.; *Adv. Chem. Ser.*, 181, 181 (1979).
 - WOOD T. M. y McCRAE S. I.; *Biochem. J.*, 128, 1183 (1972).
 - WOOD T. M. y McCRAE S. I.; *In Symposium on Enzymatic*

Hydrolysis of Cellulose. Bailey M., Enari T. M. y Linko M., Eds. SITRA. Helsinki. Finland. p. 231 (1975).

- WOODWARD J. y WISEMAN A.; Enzyme Microb. Technol., 4, March, 73 (1982).
- YU J. y MILLER S. F.; Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., 19, 2, 237 (1980).
- ZERTUCHE L. y ZALL R. R.; Biotechnol. Bioeng., 24, 57 (1982).