
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES
FERMENTABLES A PARTIR DE LA CELULOSA CONTENIDA
EN DESECHOS AGRÍCOLAS O INDUSTRIALES, POR MEDIO
DE UNA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA**

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por el Brs. Narciso V, Daniela G
Para optar al Título de
Ingeniero Químico

Caracas, 2007

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES
FERMENTABLES A PARTIR DE LA CELULOSA CONTENIDA
EN DESECHOS AGRÍCOLAS O INDUSTRIALES, POR MEDIO
DE UNA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA**

TUTOR ACADÉMICO: Prof. Rafael Martín Belmonte

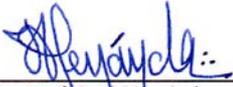
Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por el Brs. Narciso V, Daniela G
Para optar al Título de
Ingeniero Químico

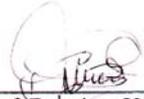
Caracas, Octubre de 2007

Los abajo firmantes, miembros del jurado designado por el Consejo de Escuela de Ingeniería Química, para evaluar el Trabajo Especial de Grado presentado por el Bachiller Daniela G Narciso V, titulado:

“ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES A PARTIR DE LA CELULOSA CONTENIDA EN DESECHOS AGRÍCOLAS O INDUSTRIALES, POR MEDIO DE UNA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA”

Consideran que el mismo cumple con los requisitos exigidos por el plan de estudios conducente al Título de Ingeniero de Químico, y sin que ello signifique que se hacen solidarios con las ideas expuestas por el autor, lo declaran APROBADO.


Prof. José Hernández


Prof. Francisco Yáñez


Prof. Rafael Martín Belmonte
Tutor



Facultad de Ingeniería

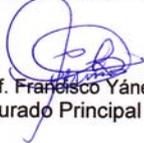


Universidad Central de Venezuela

ACTA MENCIÓN HONORÍFICA

Los abajo firmantes, miembros del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado de la Bachiller: **Daniela G. Narciso V., CI: 15.487.503**, cuyo título es **"ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES A PARTIR DE LA CELULOSA CONTENIDA EN DESECHOS AGRÍCOLAS O INDUSTRIALES, POR MEDIO DE HIDROLISIS ENZIMÁTICA"**. queremos dejar constancia del nivel del trabajo realizado, ya que el mismo en cuanto a su ejecución, presentación y utilidad de los resultados ameritó que se le asignara la nota máxima obtenible en estos casos: **Veinte puntos (20)**. Así mismo, hemos decidido concederle **Mención Honorífica** como un reconocimiento a la excelencia del trabajo realizado y por el aporte a la solución del problema de generar materia prima adicional para la producción de Etanol y/o Levaduras, sin afectar fuentes de producción de comestibles tales como yuca o harina de maíz, sino mas bien utilizando materiales principalmente de desecho.

Dado en Caracas, a los cinco días del mes de noviembre del año dos mil siete.


Prof. Francisco Yáñez
Jurado Principal


Prof. Rafael Martín
Coordinador del Jurado


Prof. José Hernández
Jurado Principal

DEDICATORIA

A mi querido abuelo Pedro Narciso por todo el amor que me diste en el poco tiempo que estuvimos juntos. Sé que aunque no estés físicamente conmigo me acompañas siempre y en todo momento.

A mi mamá Ligia por todo lo que ha hecho por mí, por su apoyo, paciencia, sacrificios y amor. Sé que sin ti no sería ni la mitad de lo que soy hoy en día.

AGRADECIMIENTOS

A la ilustre Universidad Central de Venezuela, por haberme dado no solo las herramientas para ser una profesional de la más alta excelencia, sino por las maravillosas experiencias vividas durante estos años de estudio.

Al profesor Rafael Martín Belmonte por haber confiado en mí y por haberme apoyado en todas las etapas de la realización de este proyecto.

A mi querida momi y compañera de tesis, Ligia Narciso, por haber sido mi amiga, guía y apoyo durante todos estos meses. No pude haber contado con mejor ayuda.

Al profesor Blas Dorta por haberme confiado el uso de su laboratorio y por todo el apoyo y guía brindado.

A todo el personal del Laboratorio de Procesos Fermentativos del Instituto de Biología Experimental (IBE), especialmente a las profesoras Luisa Mejías y Adriana por su gran apoyo para lograr los objetivos de este proyecto.

Al profesor Humberto Kum, por haber sido mi guía y fuente de inspiración durante toda mi carrera universitaria, además de que fue el impulsor de mi nueva etapa como profesional, no tengo como darle las gracias por todo el apoyo que me ha brindado.

A mi familia, por siempre haber creído en mí.

A mis queridos amigos de carrera: Santiago, Jhonny, Ricardo, Andrés, Liu y Laura. Ustedes siempre me apoyaron y me dieron ánimos para seguir adelante, y sé que podré contar con ustedes por el resto de mi vida.

Al ingeniero Raúl Páez por toda su comprensión durante los meses que estuve realizando este proyecto de tesis y por haberme dado la gran oportunidad de comenzar mi carrera como profesional.

Al personal del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” por la ayuda prestada a lo largo de toda mi vida; especialmente a: Araminta Marín de Moreno, Yajaira Oropeza, Lilibeth Lettaou, Antonio Quintana, Carmen Tamayo y Suraima Rodríguez, por el apoyo prestado para la realización de las pruebas de laboratorio.

A los departamentos de Matemáticas Aplicada y de Termodinámica y Fenómenos de Transporte, por haberme dado la oportunidad de desarrollarme a nivel docente.

Al personal de Baker Energy de Venezuela por el apoyo y la ayuda en estos meses tan difíciles.

Al personal del central azucarero Montalbán, especialmente al señor Fredis Alvarado por haberme apoyado en la adquisición del bagazo de caña de azúcar.

A todos aquellos que de una manera u otra hicieron posible la realización de éste proyecto.

Narciso V, Daniela G

**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES
FERMENTABLES A PARTIR DE LA CELULOSA CONTENIDA
EN DESECHOS AGRÍCOLAS O INDUSTRIALES, POR MEDIO
DE UNA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA**

Tutor Académico: Prof. Rafael Martín Belmonte

Tesis. Caracas. UCV. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química.

Año 2007. 104 p.

Palabras Claves: Hidrólisis Enzimática, Hidrólisis Química, Enzimas, Azúcares Fermentables, Celulosa.

Resumen: Desde hace varios años y como consecuencia de la crisis energética mundial y de los problemas ambientales ocasionados por el uso de los combustibles fósiles, los científicos han fijado su atención en el potencial energético que ofrece la naturaleza a través de la biomasa.

La biomasa constituye la fuente renovable de energía más abundante, y ha sido durante los últimos años objeto de numerosos estudios encaminados a la búsqueda de aquellos procesos más adecuados para su transformación.

Para obtener combustibles como el etanol a partir de la biomasa, se requiere una serie de procesos, siendo el primero de ellos la sacarificación o conversión de sus componentes como la celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables.

El presente trabajo se realiza con el fin de estudiar al proceso de hidrólisis enzimática, con lo cual se busca conocer las mejores condiciones de operación y verificar su viabilidad a nivel industrial.

Para ello, se realizaron una serie de pruebas de laboratorio para determinar los valores óptimos de las variables de operación (concentración de enzima, concentración de sustrato, tamaño de partícula de sustrato y tiempo de reacción), verificar las ventajas de la realización de pretratamientos, establecer las diferencias del proceso de hidrólisis enzimática para diferentes sustratos, comparar al proceso de hidrólisis enzimática con el de hidrólisis química y establecer las características más importantes del reactor que llevará a cabo al proceso a escala industrial.

Los resultados obtenidos demuestran que la enzima celulasa es capaz de hidrolizar a la celulosa contenida en el bagazo de caña y que el proceso de hidrólisis enzimática se ajusta a los fundamentos teóricos presentados por Michaelis y Menten.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se recomienda realizar estudios más profundos en el campo de la producción de enzimas para así optimizar dicho proceso y reducir costos.

INDICE

Capítulo I: Introducción

1.1	Introducción.....	1
1.2	Planteamiento del problema.....	2
1.3	Antecedente.....	3
1.4	Objetivos.....	5
1.4.1	Objetivo general.....	5
1.4.2	Objetivos específicos.....	5

Capítulo II: Marco Teórico

2.1	Biomasa.....	6
2.1.1	Definición.....	6
2.1.2	Historia.....	6
2.1.3	Ventajas del uso de biomasa.....	7
2.1.4	Características de la pared Celular.....	8
2.1.5	Definición de celulosa.....	9
2.1.6	Definición de hemicelulosa.....	9
2.1.7	Definición de lignina.....	10
2.2	Bagazo de Caña.....	11
2.2.1	Definición de bagazo de caña.....	11
2.2.2	Obtención de bagazo de caña.....	12
2.2.3	Composición.....	12
2.2.4	Usos del bagazo de caña.....	13
2.2.5	Ventajas del uso del bagazo de caña.....	14
2.3	Enzimas.....	15
2.3.1	Concepto de enzima.....	15

2.3.2	Características de las enzimas.....	15
2.3.3	Nomenclatura y clasificación.....	16
2.3.4	Concepto de cinética enzimática.....	18
2.3.5	Ecuación de Michaelis y Menten.....	18
2.3.6	Complejo enzimático celulasa.....	21
2.3.6.1	Concepto.....	21
2.3.6.2	Mecanismo de acción.....	21
2.3.6.3	Microorganismos productores de celulasa.....	23
2.3.7	Diferencia entre las enzimas y los catalizadores inorgánicos.....	24
2.4	Pretratamientos del sustrato.....	24
2.4.1	Justificación de los pretratamientos.....	24
2.4.2	Tipos de pretratamientos.....	26
2.5	Hidrólisis.....	30
2.5.1	Hidrólisis química.....	30
2.5.2	Hidrólisis enzimática.....	30
Capítulo III: Metodología.....		32
3.1	Materiales.....	32
3.1.1	Bagazo de caña.....	32
3.1.2	Papel reciclado.....	32
3.1.3	Complejo enzimático.....	33
3.2	Reactivos.....	33
3.2.1	Solución amortiguadora acetato.....	33
3.2.2	Acido dinitrosalicílico.....	34
3.2.3	Solución de glucosa de 40 mM.....	34
3.3	Equipos.....	34
3.4	Procedimiento Experimental.....	35
3.4.1	Método DNS.....	35
3.4.2	Construcción de la curva de calibración de glucosa.....	36

3.4.3	Pretratamiento con agua caliente a alta temperatura.....	37
3.4.4	Acondicionamiento de la materia prima.....	38
3.4.5	Hidrólisis enzimática.....	38
3.4.6	Hidrólisis química.....	39
Capítulo IV: Análisis de Resultados.....		41
4.1	Curva de calibración de glucosa.....	41
4.2	Comparación de la cantidad de azúcares reductores producidos a partir de una hidrólisis química con respecto a los obtenidos por medio de la hidrólisis enzimática de una muestra de bagazo de caña.....	42
4.3	Comparación del proceso de hidrólisis enzimática de una muestra de bagazo de caña pretratado para diferentes concentraciones de enzima...	44
4.4	Comparación del proceso de hidrólisis enzimática de una muestra de bagazo de caña pretratado para diferentes valores de la relación sólido – líquido.....	46
4.5	Comparación del proceso de hidrólisis enzimática para muestras de diferentes tamaños de partícula de bagazo de caña pretratado.....	48
4.6	Determinación del efecto producido por un pretratamiento del sustrato sobre la cantidad de azúcares fermentables obtenidos a partir de una hidrólisis enzimática de bagazo de caña.....	50
4.7	Determinación de la cantidad de azúcares fermentables producidos a partir de una hidrólisis de una muestra de papel reciclado.....	52
4.8	Optimización de las variables de operación.....	54
4.9	Características principales del reactor en el cual se realizará el proceso a escala industrial.....	59
4.9.1	Tipo de reactor.....	59
4.9.2	Selección de la forma del reactor.....	60
4.9.3	Selección del tipo de agitación.....	60
4.9.4	Selección del control de temperatura.....	64

4.9.5 Selección del material de construcción.....	65
4.10 Desarrollo de un software para el cálculo de las dimensiones de un reactor industrial para la realización de una hidrólisis enzimática de bagazo de caña.....	68
4.11 Optimización del tiempo de reacción para el proceso de hidrólisis enzimática de bagazo de caña.....	69
Capítulo V: Conclusiones.....	71
Capítulo VI: Recomendaciones.....	73
Capítulo VII: Bibliografía.....	75
Capítulo VIII: Anexos.....	78

LISTA DE TABLAS

Tabla # 1. Composición química del bagazo de caña.....	12
Tabla # 2. Composición media del bagazo de caña.....	13
Tabla # 3. Composición media de la fibra del bagazo de caña.....	13
Tabla # 4. Clasificación de las enzimas según la EC.....	17
Tabla # 5. Microorganismos productores de celulasas.....	23
Tabla # 6. Pretratamientos.....	26
Tabla # 7. Ventajas y desventajas de la hidrólisis enzimática.....	31
Tabla # 8. Especificaciones de la celulasa.....	33
Tabla # 9. Soluciones de glucosa de diferente concentración.....	36
Tabla # 10. Valores óptimos de las variables de operación.....	38
Tabla # 11. Condiciones de operación para el proceso de hidrólisis química.....	41
Tabla # 12. Condiciones de operación para el proceso de hidrólisis enzimática variando la concentración de enzima.....	45
Tabla # 13: Condiciones de operación para el proceso de hidrólisis enzimática variando la relación sólido - líquido.....	46
Tabla # 14: Condiciones de operación para el proceso de hidrólisis enzimática variando el tamaño de partícula de sustrato.....	49
Tabla # 15: Condiciones de operación para el proceso de hidrólisis enzimática para las pruebas con sustrato a diferentes condiciones de pretratamiento.....	51
Tabla # 16: Condiciones de operación para el proceso de hidrólisis enzimática para las pruebas con bagazo de caña y papel reciclado.....	53
Tabla # 17: Rendimientos en azúcares fermentables para la hidrólisis enzimática de bagazo de caña y papel reciclado.....	53
Tabla # 18: Concentración máxima de azúcares fermentables (mMol/l) para la hidrólisis enzimática variando la concentración de enzima y de la relación sólido – líquido.....	55

Tabla # 19: Rendimientos en azúcares fermentables para varias combinaciones de concentración de enzima y de relación sólido – líquido.....	56
Tabla # 20: Concentración y rendimientos en azúcares fermentables para las combinaciones más prometedoras de concentración de enzima y de relación sólido – líquido.....	57
Tabla # 21: Condiciones optimas de operación del proceso de hidrólisis enzimática de bagazo de caña.....	58
Tabla # 22: Resumen de las características del reactor.....	65
Tabla # 23: Resultados de las características del reactor industrial para diferentes tiempos de reacción.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura # 1. Distribución de los componentes en la Pared Celular.....	8
Figura # 2. Estructura Química de la Glucosa.....	9
Figura # 3. Estructura Química de la Celulosa.....	9
Figura # 4. Estructura Química de la Hemicelulosa.....	10
Figura # 5. Estructura Química de la Lignina.....	11
Figura # 6. Mecanismo de acción de las celulasas.....	23
Figura # 7. Mecanismo de acción del pretratamiento.....	25
Figura # 8. Metodología.....	40
Figura # 9: Curva de Calibración de Glucosa.....	41
Figura # 10: Comparación entre el proceso de hidrólisis química e hidrólisis enzimática de una muestra de bagazo de caña pretratado.....	43
Figura # 11: Comparación del proceso de hidrólisis enzimática de una muestra de bagazo de caña pretratado para diferentes concentraciones de enzima.....	45
Figura # 12: Comparación del proceso de hidrólisis enzimática de una muestra de bagazo de caña pretratado para diferentes valores de la relación sólido - líquido.....	47
Figura # 13: Comparación del proceso de hidrólisis enzimática de una muestra de bagazo de caña pretratado para diferentes tamaños de partícula.....	48
Figura # 14: Comparación del proceso de hidrólisis enzimática para muestras de bagazo de caña con diferentes procesos de pretratamiento.....	50
Figura # 15: Comparación del proceso de hidrólisis enzimática para diferentes sustratos lignocelulósicos.....	52
Figura # 16: Rendimientos en azúcares fermentables para varias combinaciones de concentración de enzima y de relación sólido – líquido.....	56
Figura # 17: Impulsor tipo turbina.....	62
Figura # 18: Reactor para la realización de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña.....	67

Figura # 19: Vista superior del reactor para la realización de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña.....	67
Figura # 20: Interfase para el cálculo de las dimensiones del reactor.....	68

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN

Debido a las crisis recurrentes de los precios del petróleo a nivel internacional, las consecuencias que esto trae a las economías de los países en vías de desarrollo y al impacto ambiental que causa el uso de los combustibles fósiles; la búsqueda de productos capaces de reducir la dependencia del petróleo es una tarea importante y urgente.

Es por ello que científicos y técnicos han fijado su atención en el potencial energético que ofrece la naturaleza en forma de biomasa, ya que esta constituye la fuente de energía mas abundante con la que cuenta el hombre, por lo cual es objeto de numerosos estudios encaminados a la búsqueda de aquellos procesos adecuados para su transformación. Estos estudios, cuya finalidad fundamental es la obtención de combustibles y productos de interés como materia prima de las industrias química, petroquímica y agroalimentarias, han ayudado a un notable desarrollo de la tecnología en diversas áreas como la biología, química o la ingeniería de procesos.

En Venezuela, existen plantas productoras de azúcar, cuyos desechos como el bagazo no están siendo aprovechados de una manera optima, lo cual representa una gran oportunidad para el desarrollo de nuevos procesos que contribuirán a aumentar el valor agregado de este tipo de recurso.

Es por ello que se plantea, el estudio del proceso de hidrólisis enzimática de desechos lignocelulósicos como el bagazo de caña para la producción de azúcares fermentables que luego podrán ser convertidas en combustibles como el etanol.

Para lograr dicho objetivo, se realizará un estudio cinético de la reacción enzimática para así obtener las condiciones de operación óptimas que resultarán en mayores rendimientos.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los recursos naturales renovables son aquellos que, tras ser utilizados, pueden regenerarse de manera natural o artificialmente, como el agua o los alimentos, ya que son recursos que, al estar sometidos a ciclos, se mantienen de forma más o menos constante en la naturaleza.

Se calcula que las reservas de fuentes de energía convencionales existentes en la Tierra pueden durar varios años. Esto implica que una crisis energética real de ausencia de estos productos, que tendría consecuencias catastróficas para la humanidad, no se va a producir durante, al menos, unas décadas; no obstante, la extracción de esta energía es cada vez más costosa ya que los pozos de carbón y petróleo deben perforarse cada vez más profundos, además de que las centrales nucleares han dado resultados inferiores a los esperados ya que el costo de purificación del uranio es muy elevado.

Es por ello que la búsqueda de nuevas fuentes de energías alternas a los combustibles fósiles resulta de gran interés, de manera de lograr la sustitución de estos por otras energías renovables, más económicas y con un menor impacto ambiental como la energía que se extrae de la biomasa.

La biomasa se define como el conjunto de materia orgánica, de origen vegetal o animal, incluyendo los materiales procedentes de su transformación natural o artificial, que contiene una gran cantidad de energía la cual puede ser recuperada por medio de su combustión directa o transformándola en otros combustibles como el etanol.

Al contrario de las energías extraídas de los combustibles fósiles, la energía derivada de la biomasa es renovable indefinidamente, posee un impacto ambiental mínimo comparada con la energía nuclear, además de que es mucho más fácil de almacenar si se compara con las energías eólica y solar.

La producción de combustibles a partir de la biomasa resulta ser una línea de desarrollo en auge, y en especial, usando residuos como el bagazo de caña, ya que posee numerosas ventajas como los grandes volúmenes de producción, bajo costo, fácil manejo, entre otros.

Una de las áreas de estudio más importantes a nivel de energías alternativas es la obtención de azúcares fermentables, materia prima para la producción de etanol, a partir de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña; con lo cual se busca realizar el proceso de la forma más amigable posible con el medio ambiente ya que es un proceso netamente biológico y sin el uso de reactivos peligrosos como el ácido sulfúrico de la hidrólisis química, lo cual constituye la mejor justificación para la realización de éste proyecto.

1.3. ANTECEDENTES

En los años 70, la crisis energética generó un gran interés en el uso de celulosa como una fuente de químicos y de energía. Uno de los primeros intentos fue el de hidrolizar a la celulosa para producir glucosa gracias a la acción de enzimas para luego fermentarlas hacia etanol, el cual puede ser utilizado posteriormente como combustible.

Debido al creciente interés en la búsqueda de procesos eficientes para la conversión de la biomasa en productos aprovechables, se ha desarrollado numerosas investigaciones relacionadas con la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos, entre los cuales se encuentran:

Charles Wilke y Gautam Mitra (1974), auspiciados por el “United States Energy Research and Development Administration” patentaron el proceso para la conversión de materiales celulósicos en azúcares por medio de una degradación enzimática, la cual comprende una hidrólisis del material celulósico en presencia de celulasa y la recuperación de la misma luego de la reacción para su reutilización.⁽¹⁾

Folke Tjerneld e Ingrid Persson (2004), del departamento de bioquímica y microbiología de la universidad de Lund, Suecia, en su trabajo titulado “Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. I . partition of cellulases from *Trichoderma reesei*”, estudiaron las particiones de la endo- β -glucanasa, exo- β -glucanasa y la β -glucosidasa de la *Trichoderma reesei* QM 9414 con el objeto de diseñar un sistema de fases para la bioconversión, de manera continua, de la celulosa hasta azúcares fermentables. ⁽²⁾

Las principales variables de estudio en esta investigación fueron la influencia del peso molécula y la concentración de los polímeros de celulosa, la composición iónica del medio, pH y la temperatura, lo cual constituye una buena guía para los estudios que se pretenden realizar.

Cabe destacar la importancia del desarrollo en el campo de la cinética de las reacciones enzimáticas. Okazaki y Moon-Young (2005) del grupo de ingeniería bioquímica y de alimentos de la universidad de Waterloo, Canadá, en su trabajo titulado “Kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose: Analytical description of a mechanistic model” desarrollaron un modelo matemático de la cinética de la reacción enzimática, basándose en el modelo de Michaelis-Menten. En ella, se cuantifica y se discute los parámetros básicos del modelo que pueden ser explicados sinérgicamente, así como también otros efectos observados experimentalmente. ⁽³⁾

Como conclusión de esta investigación se tiene que la cinética de la degradación de la celulosa es afectada en gran medida por la relación entre la endo-

β -glucanasa y la exo- β -glucanasa en la mezcla de reacción y por el grado de polimerización del sustrato.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo General

Estudio de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña o residuos agrícolas de composición similar para la producción de azúcares fermentables.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar las ventajas de la realización de un pretratamiento del sustrato antes de la realización del proceso de hidrólisis.
- Comparar el comportamiento de los diferentes sustratos en la producción de los azúcares fermentables.
- Determinar las condiciones de operación óptimas para cada uno de los sustratos por medio de la manipulación de las siguientes variables: concentración de enzimas, concentración de sustrato y tamaño de partícula de sustrato.
- Determinar las características principales del reactor que llevará a cabo dicho proceso a escala industrial.
- Establecer las diferencias básicas entre la hidrólisis ácida y la hidrólisis enzimática.

CAPÍTULO II

MARCO TEORICO

2.1 BIOMASA

2.1.1 Definición

Se denomina biomasa al grupo de productos energéticos y materias primas de tipo renovable que se originan a partir de la materia orgánica formada por vía biológica. (4)

En éste sentido, la biomasa comprende, además de la producida de manera natural, la de origen residual constituida principalmente por los residuos forestales, agrícolas y los residuos líquidos ganaderos, urbanos y algunos industriales, cuya carga orgánica es de carácter biológico.

La energía que se puede obtener de la biomasa proviene del la luz solar, la cual, gracias al proceso de fotosíntesis, es aprovechada por las plantas verdes mediante reacciones químicas en las células, la cuales toman el CO₂ del aire y lo transforman en sustancias orgánicas.

2.1.2 Historia

La biomasa fue el primer combustible utilizado por el hombre hasta la revolución industrial para actividades domésticas y comerciales. Sin embargo, debido a la necesidad de cantidades cada vez más grandes de energía, se empezó a promocionar el uso del carbón como combustible sustitutivo a mediados del siglo XVIII.

Desde este momento, se empezaron a utilizar fuentes de energía con mayor poder calorífico, y el uso de la biomasa fue bajando hasta mínimos históricos que coincidieron con el uso masivo de los derivados del petróleo.

A pesar de ello, la biomasa aun continúa jugando un papel importante como fuente de energía en diferentes aplicaciones industriales y domésticas. Por otro lado, el carácter renovable y no contaminante que tiene, hacen que la misma sea considerada una clara opción de futuro.

2.1.3 Ventajas del uso de la biomasa

Desde el punto de vista del aprovechamiento energético, la biomasa se caracteriza por tener un bajo contenido de carbono y un elevado contenido de oxígeno y compuestos volátiles. Estos últimos, formados por cadenas largas del tipo C_nH_m , CO_2 , CO y H_2 , son los que concentran una gran parte del poder calorífico de la biomasa, la cual puede oscilar entre los 3000 – 3500 kcal/kg para los residuos lignocelulósicos.

Estas características, junto con el bajo contenido de azufre, su carácter renovable, la posibilidad de generar gran cantidad de empleos y de reactivar las economías de países sin hidrocarburos; la convierte en un producto especialmente atractivo para ser aprovechado energéticamente.

Cabe destacar que, desde el punto de vista ambiental, el aprovechamiento energético de la biomasa no contribuye al aumento de los gases de efecto invernadero, dado que el balance de emisiones de CO_2 a la atmósfera es neutro. En efecto, el CO_2 generado por la misma es reabsorbido mediante la fotosíntesis en el crecimiento de las plantas para su producción. Al contrario, en el caso de los combustibles fósiles, el carbono que se libera a la atmósfera es el que esta fijo en la tierra desde hace millones de años.

2.1.4 Características de la pared Celular

Las paredes celulares vegetales están formadas por tres capas concéntricas. La capa externa, conocida como pared primaria, con un espesor entre 100 a 200 nm, posee microfibrillas de celulosa orientadas transversalmente a lo largo del eje de la fibra.

La pared secundaria, contiene tres subcapas originadas durante etapas diferentes del crecimiento y desarrollo de la célula, las cuales contienen microfibrillas ordenadas de manera diferente dando lugar a la apariencia laminar. Por último, la pared terciaria o lámina media esta compuesta por sustancias pépticas ordenadas de manera amorfa. (5)

La pared celular presenta un comportamiento dinámico ya que la misma es continuamente modificada durante el crecimiento y la diferenciación celular; y esta compuesta principalmente por: celulosa, hemicelulosa y lignina. (6). A continuación se muestra la distribución de los constituyentes poliméricos en la pared celular:

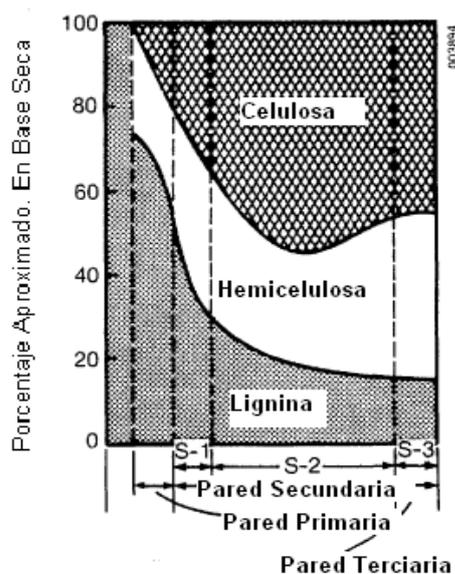


Figura # 1: Distribución de los Componentes en la Pared Celular

2.1.5 Definición de Celulosa

La celulosa es un polisacárido lineal formado por residuos de glucosa unidos por enlaces β 1-4. Éstas cadenas lineales de celulosa interaccionan entre si por medio de enlaces de puentes de hidrógeno dando lugar a la formación de microfibrillas con regiones altamente ordenadas que le dan las características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático y que se conocen como regiones cristalinas. (6)

A continuación se presenta la estructura química de dichos compuestos:

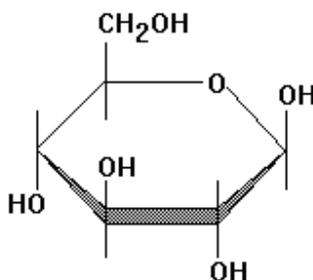


Figura # 2: Estructura Química de la Glucosa

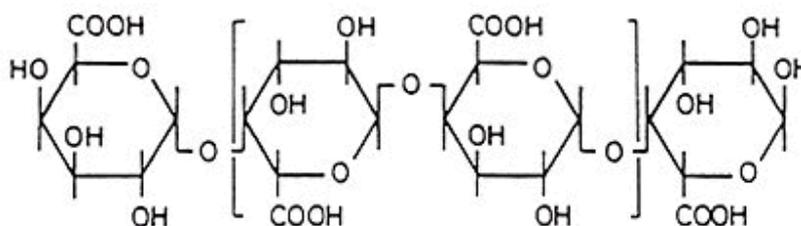


Figura # 3: Estructura Química de la Celulosa

2.1.6 Definición de Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero de cadena corta y ramificada cuyos monómeros pueden ser de cinco átomos de carbono (pentosas), tales como la xilosa, o de seis átomos de carbono (hexosas) como la glucosa. Son de naturaleza amorfa y

sirven, con la lignina, para formar la matriz en la cual se incrustan las fibrillas de celulosa. (7)

La hemicelulosa es un grupo más heterogéneo de polisacáridos y el segundo en abundancia en los tejidos vegetales. Los componentes principales de este grupo varían dependiendo del tipo de vegetal al que pertenezcan. La estructura química de la hemicelulosa es la siguiente: (8)

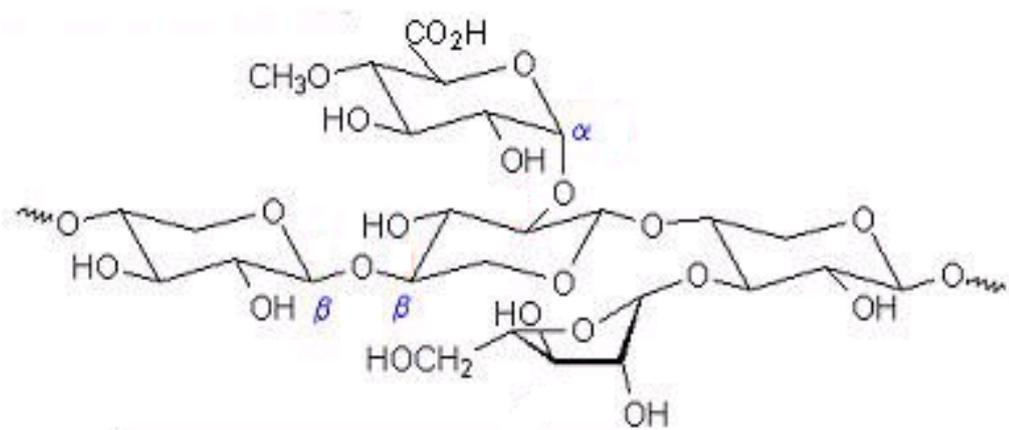


Figura # 4: Estructura Química de la Hemicelulosa

2.1.7 Definición de Lignina

La lignina, que es el tercer componente en importancia de la membrana celular, es un polímero tridimensional que se forma a partir de las unidades fenilpropánicas que se han desarrollado, de manera aleatoria, formando una molécula grande y compleja con muchas clases diferentes de ligamentos entre los bloques estructurales. (9)

Cabe destacar que este es un compuesto muy difícil de degradar ya que representa el sustento de la pared celular, por lo cual representa el mayor obstáculo para la realización de la hidrólisis.

La figura que se presenta a continuación representa a la compleja estructura química de la lignina:

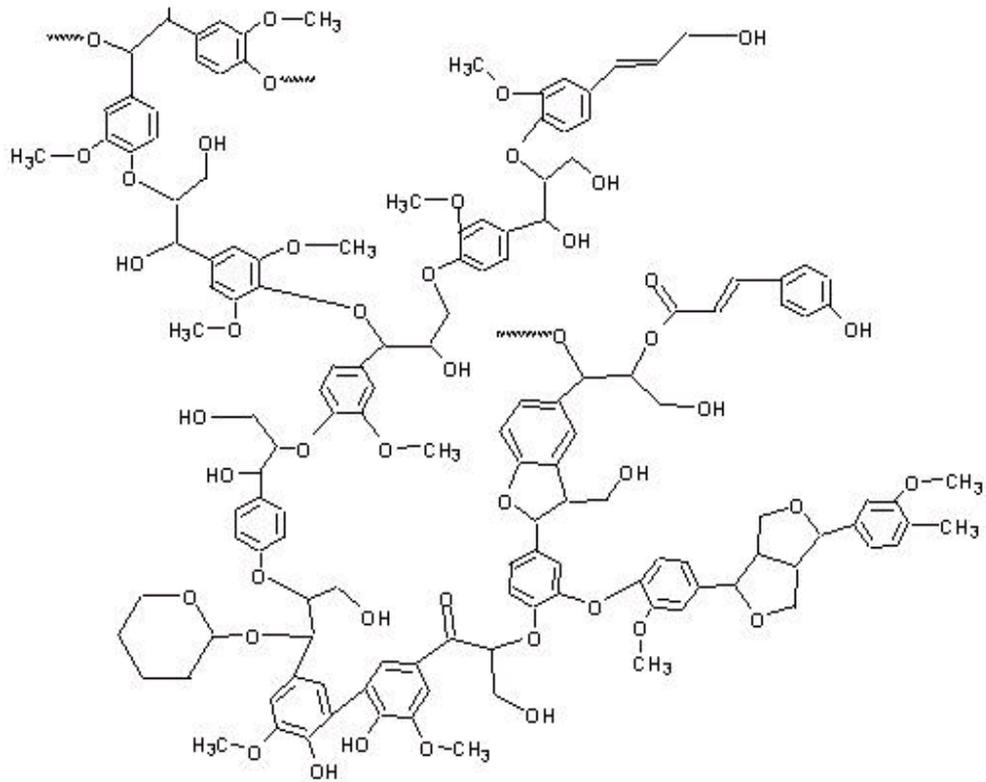


Figura # 5: Estructura Química de la Lignina

2.2 BAGAZO DE CAÑA

2.2.1 Definición de Bagazo de Caña

El tallo de la caña de azúcar también conocido como *Saccharum officinarum*, esta constituido por dos partes: una esponjosa central llamada médula, que es la que realmente se exprime, y una fibrosa, periférica denominada corteza.

El bagazo es el residuo del tallo o cuerpo de la caña de azúcar que queda después de que se le ha exprimido el jugo, ya sea en el ingenio o en el trapiche.

2.2.2 Obtención de Bagazo de Caña

Una vez que se exprime la caña de azúcar, el residuo de la misma es el bagazo, el cual, se comprime con prensas para formar pacas que se apilan en el exterior del ingenio, dejándose un espacio entre las pilas para que pueda circular el aire y las pacas se sequen. Posteriormente, se envían a otras industrias para utilizarlas de inmediato, para ser almacenadas hasta su uso en espacios abiertos.

2.2.3 Composición

El bagazo de caña esta compuesto principalmente por compuestos poliméricos de carbono e hidrogeno.

En las siguientes tablas, se muestra la composición química, la composición media y la composición de la fibra del bagazo de caña: ⁽¹⁰⁾

Tabla # 1: Composición Química del bagazo de caña

Componentes	(%)
Carbono	23
Oxigeno	22
Hidrogeno	3
Ceniza	2
Agua	50

Tabla # 2: Composición media del bagazo de caña

Componentes	(%)
Humedad	50
Fibra	46
Brix (Sólidos solubles en agua)	2
Impurezas minerales	2

Tabla # 3: Composición media de la fibra del bagazo de caña

Componentes	(%)
Celulosa	50
Hemicelulosa	25
Lignina	25

2.2.4 Usos del Bagazo de Caña

El bagazo de caña es un residuo muy versátil el cual puede ser utilizado en numerosas aplicaciones como: abono, cubierta protectora de la tierra recién sembrada, carbonizado y comprimido en ladrillos, mezclado con lodo para lubricantes de perforadoras en pozos petroleros, para obtener papel y cartón, así como otros usos en menor escala.

Alrededor de las dos terceras partes de los casi 250 millones de toneladas de caña que se producen cada año en el mundo se destinan a la producción de alcohol etílico para combustible automotor, tanto en forma directa, como para aditivo de gasolina.

Adicionalmente, el alcohol etílico obtenido por fermentación da origen a toda una industria alcoquímica, en la que pueden obtener masas plásticas, acetaldehído y sus derivados y otros productos. (11)

2.2.5 Ventajas del uso del Bagazo de Caña

La caña de azúcar es una planta de características excepcionales, capaz de sintetizar carbohidratos solubles y material fibroso a un ritmo muy superior al de otros cultivos comerciales. Esta propiedad le abre una posibilidad prácticamente infinita de aprovechamiento para la producción de cientos de derivados, en muchos casos, de mayor valor agregado e importancia económica que el azúcar.

Las distintas variedades de caña que hoy se cultivan en el mundo con fines comerciales son especies e híbridos del género *Saccharum*, de la familia de las gramíneas. Es un cultivo de los llamados permanentes, que se cosecha en períodos que oscilan entre 12 y 24 meses. La duración de la cepa tiene como promedio entre 5 y 10 cosechas, aunque esto varía bastante entre regiones y según las distintas prácticas agrotécnicas.

La alta productividad de la caña se explica por su elevada eficiencia fotosintética en comparación con otros cultivos comerciales, que le permite una mayor utilización de la energía solar y consecuentemente, un mayor coeficiente de absorción del CO₂ atmosférico. Solamente por esto, el cultivo de la caña de azúcar representa un aporte ecológico de importancia como vía para aliviar el calentamiento de la atmósfera que se origina a través del llamado "efecto invernadero".

Si se analiza la relación entre el valor energético de la biomasa contenida en la caña de azúcar y la energía necesaria para su cultivo y cosecha, se obtiene una relación de 20 a 1, calculada para un cultivo de caña con altos niveles de fertilización, uso de riego y cosecha mecanizada. Esto significa que la energía invertida en la producción de caña representa, cuando más, el 5% de su potencial.

En términos prácticos, esta potencialidad tiene que ser expresada en alguna de las formas de uso de la energía en la vida moderna. De ellas, las de mayor importancia actual son la producción de electricidad, los combustibles para la generación de vapor en la industria y los combustibles líquidos para vehículos automotores. (10)

2.3 ENZIMAS

2.3.1 Concepto de Enzimas

Son aquellos compuestos proteínicos que actúan como catalizadores de numerosas reacciones biológicas y que se caracterizan por su notable eficiencia y extraordinaria especificidad, además de que actúan en muy pequeñas cantidades y se recuperan indefinidamente.

Las enzimas no llevan a cabo reacciones energéticamente desfavorables y no modifican el sentido de los equilibrios químicos, sino que aumentan la velocidad de la reacción. (12)

2.3.2 Características de las Enzimas

Entre las características de las enzimas podemos mencionar:

- a) Son efectivas en pequeñas cantidades.
- b) No sufren modificaciones químicas irreversibles durante la catálisis. Esto quiere decir que luego de la reacción enzimática, las moléculas de enzimas que reaccionaron son indistinguibles de las que no lo han hecho, ya que la estructura de la molécula se mantiene exactamente igual.

-
- c) Pueden catalizar procesos químicos a bajas temperaturas
 - d) No afectan la posición de equilibrio de la reacción que catalizan. El estado inicial y final de la reacción es el mismo, solo que se llega al equilibrio de manera rápida.

2.3.3 Nomenclatura y Clasificación

Debido a su claridad, se recomienda el uso del sistema de nomenclatura IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) para trabajos de investigación, por esta razón, a continuación se presentan sus principios generales:

- a) Las reacciones y las enzimas que las catalizan se dividen en 6 clases principales, cada una con 4 a 13 subclases.
- b) El nombre de la enzima tiene 2 partes: la primera es el nombre del o los sustratos; la segunda, con terminación “asa”, indica el tipo de reacción catalizada.
- c) Información adicional si es necesario aclarar la reacción.
- d) Cada enzima tiene un número clave asignado por la Enzyme Commission (E.C.) que caracteriza al tipo de reacción según la clase (primer dígito), subclase 1 (segundo dígito) y subclase 2 (tercer dígito). El cuarto dígito es para la enzima específica.

Para una enzima con el número E.C. 3.2.1.4 significa que la misma pertenece a la clase 3 (una hidrolasa), subclase número uno 2 (glicosidasa), subclase número dos 1 (son las que hidrolizan al radical O- y S-). El último dígito denota a la enzima celulasa, la cual cataliza la reacción de hidrólisis de la celulosa.

La Enzyme Comisión, ha clasificado a las diferentes enzimas conocidas en seis clases que a su vez pueden tener diferentes subclases: (13)

Tabla # 4: Clasificación de las Enzimas según la EC

Grupo	Acción	Ejemplos
Oxidoreductasas	Catalizan reacciones de oxidorreducción.	- Dehidrogenasas - Aminooxidasa
Transferasas	Transfieren grupos activos (obtenidos de la ruptura de ciertas moléculas) a otras sustancias receptoras. Suelen actuar en procesos de interconversión de azúcares, de aminoácidos, etc.	- Transaldolasas - Transcetolasas - Transaminasas
Hidrolasas	Actúan en reacciones de hidrólisis con la obtención de monómeros a partir de polímeros.	- Celulasa. - Hemicelulasa - Glucosidasas
Isomerasas	Actúan sobre determinadas moléculas obteniendo de ellas sus isómeros de función o de posición. Suelen actuar en procesos de interconversión	- Isomerasas de azúcar - Epimerasas - Mutasas
Liasas	Realizan la degradación o síntesis de los enlaces fuertes sin ir acoplados a sustancias de alto valor energético.	- Aldolasas - Decarboxilasas
Ligasas	Realizan la degradación o síntesis de los enlaces fuertes mediante el acoplamiento a sustancias ricas en energía como los nucleosidos del ATP	- Carboxilasas - Peptidosintetasas

2.3.4 Concepto de Cinética Enzimática

La cinética enzimática es aquella rama de la química encargada de estudiar la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad de la enzima.

2.3.5 Ecuación de Michaelis y Menten

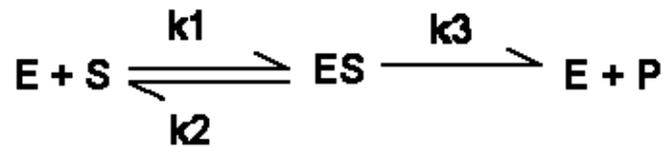
Todas las reacciones químicas del metabolismo celular se realizan gracias a la acción de catalizadores o enzimas las cuales son biocatalizadores de naturaleza proteica.

Los estudios del efecto de la concentración inicial del sustrato sobre la actividad enzimática comenzaron a realizarse a finales del siglo XIX. Ya en 1882 se introdujo el concepto del complejo enzima-sustrato como intermediario del proceso de catálisis enzimática. En 1913, Leonor Michaelis y Maud Menten desarrollaron esta teoría y propusieron una ecuación de velocidad que explica el comportamiento cinético de las enzimas. (3)

Para explicar la relación observada entre la velocidad inicial (v_0) y la concentración inicial de sustrato ($[S]_0$) Michaelis y Menten propusieron que las reacciones catalizadas enzimáticamente ocurren en dos etapas.

La enzima (E) se combina con el sustrato (S) formando el complejo de transición enzima-sustrato (E-S), mediante una reacción reversible, cuya energía de activación es menor que la de la reacción no catalizada. Cuando se forma el producto de la reacción (P), se regenera de nuevo la enzima (E) de forma libre, la que puede combinarse de nuevo con otra molécula de sustrato (S).

La siguiente es la reacción propuesta por Michaelis y Menten:



En este esquema, k_1 , k_2 y k_3 son las constantes cinéticas individuales de cada proceso que también reciben el nombre de constantes microscópicas de velocidad. Adicionalmente, se define a $[E_T]$ como la concentración total de enzima, (que es constante a lo largo de la reacción).

Este modelo cinético adopta la hipótesis del estado estacionario, según la cual la concentración del complejo enzima-sustrato ($[ES]$) es pequeña y constante a lo largo de la reacción. Por tanto, se tiene que $[ES]$ se puede expresar de la siguiente manera:

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_m + [S]} \quad \text{siendo} \quad K_m = (k_2 + k_3) / k_1,$$

en donde la expresión $(k_2+k_3)/k_1$ se ha sustituido por K_M , o constante de Michaelis-Menten. Este enlace nos aporta una explicación sobre las razones que hacen de la K_M un parámetro cinético importante.

Por lo tanto, en el estado estacionario, la velocidad de formación del producto se puede describir como sigue:

$$v = v_3 = k_3[ES] = \frac{k_3[E_T][S]}{K_M + [S]}$$

Para cualquier reacción enzimática, [ET], k_3 y KM son constantes. Si se consideran dos casos extremos se tiene lo siguiente:

- *A concentraciones de sustrato pequeñas:* ($[S] \ll KM$) $v = (k_3 [ET]/KM) [S]$: Como los términos entre paréntesis son constantes, pueden englobarse en una nueva constante, k^* , de forma que la expresión queda reducida a: $v = k^* [S]$, con lo cual la reacción es un proceso cinético de primer orden.
- *A concentraciones de sustrato elevadas:* ($[S] \gg KM$), $v = k_3 [ET]$. La velocidad de reacción es independiente de la concentración del sustrato, y por tanto, la reacción es un proceso cinético de orden cero. Además, tanto k_3 como [ET] son constantes, y nos permite definir un nuevo parámetro, la velocidad máxima de la reacción (V_{max}): $V_{max} = k_3 [ET]$, que es la velocidad que se alcanzaría cuando toda la enzima disponible se encuentra unido al sustrato. (3)

Si introducimos el parámetro V_{max} en la ecuación general de la velocidad, obtenemos la expresión más conocida de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Como se puede observar, la aplicación de la ecuación clásica de Michaelis-Menten permite calcular los parámetros de velocidad máxima (V_{max}) de la hidrólisis a saturación y la constante media de saturación (K_m), que proporcionan información útil sobre el mecanismo de hidrólisis. (14)

Hay enzimas que no obedecen la ecuación de Michaelis-Menten. Se dice que su cinética no es Michaeliana. Esto ocurre con las enzimas alostéricas, cuya gráfica de v frente a [S] no es una hipérbola, sino una sigmoide. En la cinética sigmoidea,

pequeñas variaciones en la [S] en una zona crítica (cercana a la KM) se traduce en grandes variaciones en la velocidad de reacción.

2.3.6 Complejo enzimático Celulasa.

2.3.6.1 Concepto

Las celulasas son enzimas hidrolíticas, es decir, biocatalizadores de naturaleza proteica, que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos β -1,4 presentes en los polisacáridos celulosa, liberando al medio glucosa y otros tipos de monosacáridos. (2)

El interés por éste tipo de compuestos comenzó alrededor de los años 50 debido a su enorme potencial para convertir a los residuos lignocelulósicos en glucosa y azúcares solubles.

Cabe destacar que este sistema enzimático esta conformado por un conjunto de enzimas extracelulares pertenecientes al grupo de las carbohidrolasas, las cuales son las siguientes: las endo- β -glucanasas, exo- β -glucanasas y las β -glucosidasas. (2)

2.3.6.2 Mecanismo de Acción

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinérgica de un grupo de celulasas, que presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa.

El sistema de celulasa típico incluye tres tipos de enzimas: La endo- β -1,4-glucanasa, la exo- β -1,4-glucanasa y la β -1,4-glucosidasa.

El mecanismo propuesto para la degradación de la celulosa puede resumirse en tres etapas:

- a) La endo- β -1,4-glucanasa actúa al azar sobre los enlaces β -1,4-glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de celulosa cortando las cadenas de celulosa, las cuales mantienen la configuración β de su estructura.

La acción de ésta enzima es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos no reductores que sirven de sustrato para la posterior acción de la exo- β -1,4-glucanasa.

- b) En la segunda etapa actúa la exo- β -1,4-glucanasa, la cual es una enzima que corta la cadena 1,4 β -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa liberando celobiosa y oligosacáridos de bajo peso molecular.

Ambas enzimas endoglucanasas y exoglucanasas son inhibidas por uno de los productos de la hidrólisis enzimática, la celobiosa, lo que disminuye la eficiencia de la hidrólisis.

- c) En la última etapa se produce la acción de la β -glucosidasa, la cual es la encargada de transformar a la celobiosa y a los otros oligosacáridos formados en glucosa. (2)

Las celulasas comerciales incluyen a las tres enzimas mencionadas anteriormente, ya que si existe la ausencia de una, la reacción no se llevaría a cabo.

La siguiente es una representación grafica del mecanismo de hidrólisis de la celulosa:

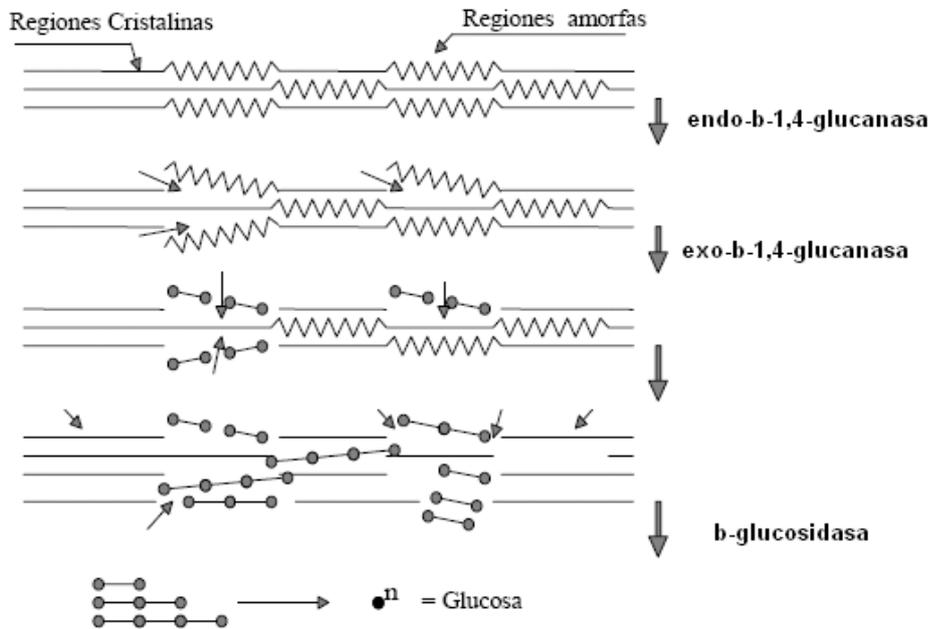


Figura # 6: Mecanismo de Acción de las Celulasas.

2.3.6.3 Microorganismos productores de celulasa

Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias, hongos aeróbicos, anaeróbicos, mesofílicos o termofílicos como lo son los siguientes: (9)

Tabla # 5: Microorganismos Productores de Celulasa

Microorganismo	Tipo de Respiración
Bacterias	
Cellulomonas	Aeróbico
Pseudomonas Fluorescens	Aeróbico
Clostridium Thermocellulaseum	Anaeróbico

Tabla # 5: Microorganismos Productores de Celulasa (continuación)

Microorganismo	Tipo de Respiración
Hongos	
Aspergillus Níger	Aeróbico
Fusarium Solani	Aeróbico
Trichoderma Reesei	Aeróbico
Trichoderma Viride	Aeróbico

2.3.7 Diferencias entre las enzimas y los catalizadores inorgánicos

Las enzimas difieren de los catalizadores inorgánicos en los siguientes aspectos:

- a) Su actividad depende del pH del medio.
- b) La acción de la enzima sobre el sustrato es altamente específico.
- c) Son muy eficientes, es decir, transforman un gran número de moléculas de sustrato por unidad de tiempo.
- d) Están sujetas a una gran variedad de controles celulares y genéticos.

2.4 PRETRATAMIENTOS DEL SUSTRATO

2.4.1 Justificación De los Pretratamientos

Uno de los factores que contribuyen decisivamente a limitar el rendimiento de un proceso de hidrólisis enzimática de celulosa es la estructura de este compuesto. La asociación de la celulosa con la lignina, que constituyen una auténtica barrera física a la penetración de las enzimas, unidas a la cristalinidad de las moléculas de celulosa,

dificultan en tal grado la acción de las enzimas que se hace necesario alterar previamente mediante tratamientos las características de dicha sustancia.

Los pretratamientos son requeridos para alterar la estructura de la biomasa para hacerla mas accesible a las enzimas que convertirán a las cadenas poliméricas en azúcares fermentables. La meta es romper el sello que forma la lignina e irrumpir en la estructura cristalina de la celulosa, como se muestra en el siguiente diagrama: (15)

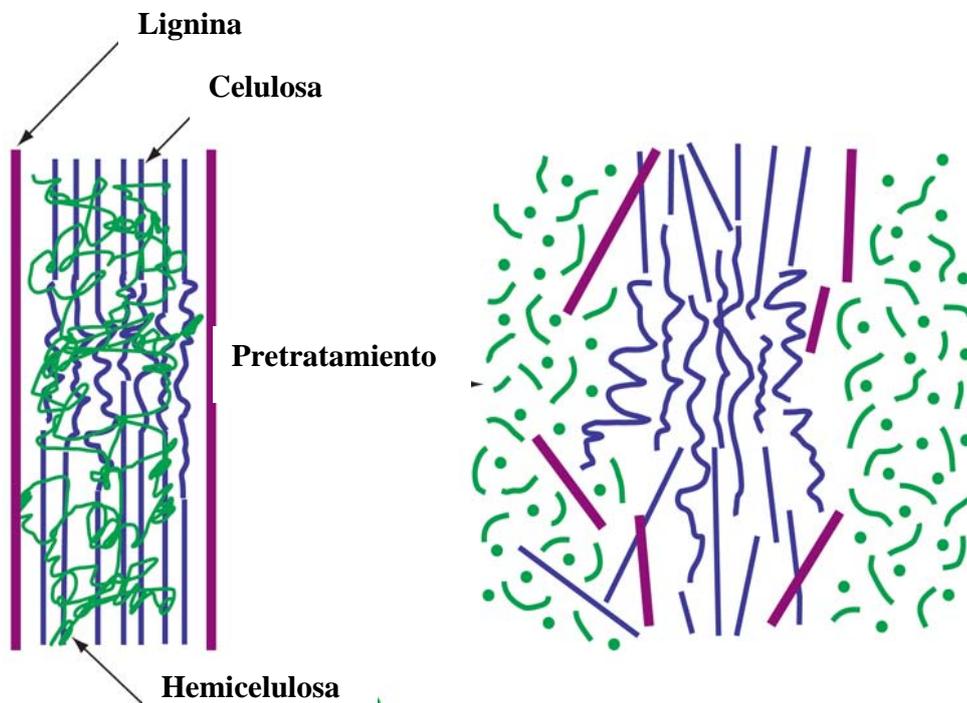


Figura # 7: Mecanismo de Acción del pretratamiento.

Los objetivos fundamentales de los pretratamientos de materiales lignocelulósicos son los siguientes:

- a) Reducir la cristalinidad de la celulosa.
- b) Disociar el complejo lignina-celulosa.

-
- c) Aumentar el área superficial de la fibra de celulosa.
 - d) Disminuir la presencia de aquellas sustancias que dificulten el proceso de hidrólisis.

Cabe destacar que las características principales que deben tener los pretratamientos son su eficacia, bajos costos de inversión y mantenimiento, bajo consumo energético, utilización de reactivos baratos y su posible aplicación a diversos sustratos. (16)

2.4.2 Tipos de Pretratamientos

A continuación se muestra una tabla resumen de los diferentes pretratamientos que se pueden aplicar a los residuos lignocelulósicos:

Tabla # 6: Pretratamientos

Métodos	Procedimientos/Agentes	Observaciones
Pretratamiento Físico		
Pulverizado Mecánico	Reducción a astillas, triturado, molienda	<ul style="list-style-type: none"> • Molinos vibratorios de bola, de martillo o de cuchillas. • Tienen como inconveniente su alto consumo energético.
Pirólisis	$T > 300\text{ °C}$	Formación de productos volátiles y carbón. Los residuos de la pirólisis pueden someterse a una hidrólisis ácida suave.

Tabla # 6: Pretratamientos (continuación)

Métodos	Procedimientos/Agentes	Observaciones
Pretratamiento Físico-Químico		
Explosión con Vapor	Se expone al material a vapor a unas condiciones de $T = 160 - 260 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $P = 0,69-4,85 \text{ MPa}$ por varios minutos para luego descomprimirse hasta la presión atmosférica	<ul style="list-style-type: none"> • Provoca la hidrólisis de la hemicelulosa. • Hay una reducción significativa del tamaño de las partículas. • Hay despolimerización de la celulosa. • Las moléculas de lignina sufren una redistribución. • Formación de inhibidores.
Agua líquida Caliente (LHW)	Se expone a la materia prima a agua caliente presurizada a una $T = 170-230 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos y a una presión tal de que el agua se mantenga en estado líquido.	<ul style="list-style-type: none"> • Hay una cierta despolimerización y conversión de la celulosa. • Solubilización parcial de la lignina. • No existe la formación de inhibidores

Tabla # 6: Pretratamientos (continuación)

Métodos	Procedimientos/Agentes	Observaciones
Explosión de fibra con amoníaco	1 – 2 Kg de amoníaco/kg de biomasa seca, a 90 °C por 30 minutos	<ul style="list-style-type: none"> • Necesita la recuperación del amoníaco. • No produce inhibidores. • No es eficiente para biomasas con altas concentraciones de lignina aunque solubiliza parte de esta. • Conversión parcial de celulosa y hemicelulosa.
Pretratamiento Químico		
Ozonólisis	Aire ozonizado a condiciones atmosféricas	<ul style="list-style-type: none"> • Degradación de la lignina. • No se forman inhibidores
Hidrólisis con ácido al 5%	Se usa H ₂ SO ₄ , HCL, HNO ₃ a una T = 160-200°C y P = 1 MPa	<ul style="list-style-type: none"> • Se requiere una neutralización para una posterior hidrólisis enzimática. • Ocurre despolimerización de la celulosa. • La lignina no se solubiliza mucho aunque si se redistribuye

Tabla # 6: Pretratamientos (continuación)

Métodos	Procedimientos/Agentes	Observaciones
Hidrólisis con ácido al 30%	H ₂ SO ₄ a una T= 170-190 °C con una relación líquido-sólido de 1.6	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere de tiempos de residencia mayores a los procesos con ácido diluido. • Requiere recuperación del ácido.
Hidrólisis Alcalina	Utiliza NaOH al 2% a 60 °C por 24 horas	<ul style="list-style-type: none"> • Existe remoción de lignina. • Cierta hidrólisis de la hemicelulosa.
Deslignificación oxidativa	Peroxidasa y H ₂ O ₂ al 2%, 20 °C por 8 horas	<ul style="list-style-type: none"> • Solubilización del 50% de la lignina.
Organosolventes	Solventes orgánicos (metanol, etanol, acetona, etilen glicol, etc) los cuales pueden ser mezclados con 1 % de H ₂ SO ₄ y HCL	<ul style="list-style-type: none"> • Ruptura de la lignina interior y de las unidades de hemicelulosa. • Se debe recuperar los solventes para no inhibir los procesos posteriores.
Pretratamiento Biológico		
Pretratamiento con hongos	Producción de celulasas con fermentación en sustrato sólido.	<ul style="list-style-type: none"> • Los hongos producen las enzimas para la degradación de los compuestos de la biomasa. • Es un proceso muy lento.

2.5 HIDROLISIS

La hidrólisis de los residuos lignocelulósicos tienen como finalidad la transformación de los polisacáridos que estos contienen en azúcares sencillos, fermentables a su vez a distintos productos de interés industrial, como etanol, acetona, butanol, etc. Esta hidrólisis puede llevarse a cabo tanto por vía química como por vía enzimática. (16)

2.5.1 Hidrólisis Química

Este proceso utiliza ácidos como H_2SO_4 , HCL y HF a diferentes concentraciones, altas temperaturas y en diversos procesos operativos, tales como precoladores, reactores de mezcla completa, de flujo pistón, entre otros.

Los principales inconvenientes de éste proceso de transformación radican en la heterogeneidad del hidrolizado obtenido debido a la poca especificidad de dicho proceso, así como a la aparición de productos de degradación de azucares que se generan durante el proceso. Adicionalmente, la necesidad de utilizar materiales resistentes a la corrosión y de recuperar los ácidos, ocasiona un aumento de los costos de inversión y de operación.

2.5.2 Hidrólisis Enzimática

La hidrólisis enzimática de la celulosa consiste en la utilización de enzimas celulolíticas, producidas por algunos hongos y bacterias, para obtener una solución de glucosa a partir de dicho sustrato que es originalmente insoluble.

A diferencia de la hidrólisis química, la enzimática proporciona un hidrolizado homogéneo debido a la alta especificidad de dichos catalizadores.

Las condiciones del proceso como temperatura, tiempo de hidrólisis, concentración de enzima y relación sólido – líquido dependen del sustrato elegido y de las características y actividad hidrolítica del complejo de enzimas utilizado, y deben ser determinadas experimentalmente para cada caso concreto.

Una de las ventajas de este tipo de proceso es la amplia gama de sistemas que se han estudiado para llevar a cabo los procesos de hidrólisis enzimática como lo son procesos continuos, por lotes, con enzimas inmovilizadas, con reutilización de enzimas, con fermentación simultánea, biorreactores de membrana, etc, cada uno de los cuales presentan ventajas e inconvenientes, lo cual nos facilitaría la elección del sistema más adecuado debido a la gran cantidad de información con la que se cuenta.⁽¹⁾

A continuación se presenta un cuadro con las ventajas y desventajas observadas durante varios estudios de la hidrólisis enzimática:

Tabla # 7: Ventajas y Desventajas de la Hidrólisis Enzimática

Ventajas	Desventajas
Opera a condiciones suaves de temperatura (30 – 50 °C)	La lentitud del proceso debido a la propia estructura de los sustratos celulósicos nativos.
La no utilización de agentes químicos, ya que así se evita la corrosión de los equipos y la degradación de los azúcares producidos.	
Alta especificidad.	La necesidad de recuperación de las enzimas del medio de reacción.

CAPITULO III

METODOLOGIA

A continuación se describen las consideraciones mas importantes para el desarrollo del procedimiento experimental, correspondientes a los tratamientos de hidrólisis que se realizarán sobre las materias objeto de estudio.

3.1 MATERIALES

Las principales materias primas de estudio comprenden, en lo que se refiere a los sustratos, al bagazo de caña y al papel reciclado, así como también al complejo enzimático utilizado para la catálisis de las reacciones de hidrólisis.

3.1.1 Bagazo de Caña

El bagazo de caña será suministrado por el central azucarero Montalbán, a las condiciones originales del entorno, tanto de humedad como de tamaño de partícula, para así tener una buena representación de la materia prima en el caso de que se aplique el proceso a nivel industrial.

3.1.2 Papel Reciclado

Este sustrato estará formado por hojas de papel que ya fueron utilizadas y desechadas para su reciclaje.

3.1.3 Complejo Enzimático

La enzima utilizada corresponde a un preparado enzimático comercial de Celulasa preparada a partir del hongo *Aspergillus Niger*, manufacturado e importado por la empresa Sigma–Aldrich a través de la compañía Biochrom de Venezuela. C.A.

Las especificaciones comerciales del producto son las siguientes:

Tabla # 8: Especificaciones de la Celulasa

Especificaciones de la Enzima Celulasa	
Numero EC (Enzyme commission)	3.2.1.4
Forma	Polvo
Unidades de Actividad Enzimática	300 unidades/g de sólido
Temperatura de Almacenamiento (°C)	2 – 8

3.2 REACTIVOS

Las características de los reactivos a utilizar para llevar a cabo el procedimiento experimental se suministran a continuación:

3.2.1 Solución Amortiguadora Citrato:

La solución amortiguadora o tampón acetato se utilizará con el fin de procurar un pH constante de la reacción enzimática.

Su preparación consiste en añadir una solución de ácido cítrico 0.05 M en una solución de citrato de sodio 0.05 M hasta que el pH de la solución alcance el valor deseado. (17)

3.2.2 *Acido Dinitrosalicílico:*

Esta solución se utilizará para el proceso de determinación de azúcares reductores luego del proceso de hidrólisis. Su preparación consta de los siguientes pasos (18):

- a) Disolver 0.1 g de ácido 3,5 – dinitrosalicílico y 30 g de tartrato sódico – potásico en 20 ml de hidróxido de sodio 2 M.
- b) Diluir hasta 100 ml con agua destilada.
- c) Guardar el reactivo en un frasco color topacio o en un frasco cubierto por papel de aluminio para protegerlo de la luz y bajo refrigeración.

3.2.3 *Solución de Glucosa de 40 mM:*

El objetivo de la preparación de dicha solución es el de tener una base para preparar soluciones de glucosa de diferentes concentraciones para la construcción de la curva de calibración. Para ello se diluye 0.792 g de glucosa en polvo en 100 ml de la solución buffer acetato que se utilizará para la hidrólisis. (18).

3.3 *EQUIPOS*

Los equipos utilizados para las diversas actividades que conforman el procedimiento experimental se listan a continuación:

- a) Estufa marca Felisa ajustada a una temperatura de 75 °C.
-

-
- b) Molino y tamiz marca Thomas Scientific U.S.A con tamices de 20 y 40 mesh incorporado al equipo.
 - c) Baño termostático modelo Unitronic de la marca Selecta.
 - d) Ph metro de la casa Hanna Instruments.
 - e) Espectrofotómetro Spectronic 20D+.
 - f) Plancha de calentamiento y Agitación Magnética marca Sybron – Thermolyne.
 - g) Balanza analítica marca Sartorius.
 - h) Balanza galénica modelo Explorer marca Ohaus.

3.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En esta sección se muestran cada uno de los pasos necesarios para la realización de los estudios sobre la hidrólisis de residuos lignocelulósicos, siendo los más importantes los siguientes:

3.4.1 Determinación de la Concentración Total de Azúcares Fermentables por medio del Método DNS (Método del Ácido Dinitrosalicílico):

El seguimiento de la hidrólisis se realizará por medio de la determinación del contenido de azúcares fermentables solubles (mMol/l) producidos a diferentes intervalos de tiempo. Para ello, se ha usado al ácido dinitrosalicílico (DNS) como reactivo sensible a los productos de reacción, empleando una solución de glucosa como patrón de la curva de calibración del método.

El ácido dinitrosalicílico se reduce en presencia del grupo reductor de la glucosa, formando el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, mientras que el grupo aldehído reductor se oxida para formar un grupo carboxílico, lo cual causa diferencias de

coloración que pueden determinarse por espectrofotometría visible, a una longitud de onda de 570 nm. (14).

El procedimiento experimental para la aplicación de este método se describe a continuación. (18):

- a) Se toma 0.4 ml de la solución azucarada y se coloca en un tubo de ensayo.
- b) Añadir 4 ml de la solución de DNS agitando para homogenizar.
- c) Calentar la muestra en un baño de agua a ebullición durante 10 minutos.
- d) Enfriar la solución a la temperatura ambiente en un baño de agua fría.
- e) Medir la absorbancia en un espectrofotómetro de 570 nm.

3.4.2 Construcción de la curva de Calibración de Glucosa:

La curva de calibración se determino tomando como referencia al reactivo glucosa grado analítico. Para su construcción se procederá como sigue:

- a) Preparar disoluciones con concentraciones conocidas de glucosa. Para ello se diluye a la solución buffer citrato en la solución de glucosa de 40 mM en las siguientes proporciones:

Tabla # 9: Soluciones de Glucosa de diferentes concentración

Tubo	Solución Buffer Citrato (ml)	Solución de Glucosa de 40 mM (ml)	Concentración (mM)
0	5.00	0.00	0
1	4.75	0.25	2
2	4.50	0.50	4

Tabla # 9: Soluciones de Glucosa de diferentes concentración (continuación)

Tubo	Solución Buffer Citrato (ml)	Solución de Glucosa de 40 mM (ml)	Concentración (mM)
3	4.25	0.75	6
4	4.00	1.00	8
5	3.75	1.25	10
6	2.50	2.50	20
7	0.00	5.00	40

- b) Aplicar el método del DNS para cada uno de los tubos.
- c) Enfriar las muestras a la temperatura ambiente.
- d) Calibrar el espectrofotómetro a cero con el blanco (solución que no posee glucosa).
- e) Determinar la absorbancia a 570 nm.
- f) Construir la curva de calibración de glucosa graficando a la absorbancia obtenida en función de la concentración de glucosa.
- g) Realizar este experimento por triplicado.

3.4.3 Pretratamiento con agua caliente a alta temperatura (LHWP):

La porción de bagazo de caña a ser pretratado se coloca en una olla de presión con 2 litros de agua por 1 hora a 2 atm de presión.

3.4.4 Acondicionamiento de la Materia Prima:

El bagazo de caña debe ser previamente acondicionado para su estudio. Para ello, se procede a la disposición de este en una estufa a 76 °C durante 24 h para eliminar en su totalidad la humedad contenido en el mismo.

Una vez seco, los sustratos son molidos, para luego ser pasados por tamices de diferentes diámetros para su clasificación según el tamaño de partícula, que luego serán almacenados en bolsas plásticas herméticas a temperatura ambiente para evitar la reabsorción de la humedad en los mismos.

3.4.5 Hidrólisis Enzimática:

Los tratamientos enzimáticos sobre las fibras del sustrato se realizarán con el fin de estudiar las siguientes variables: concentración de enzimas, relación líquido/sólido, tamaño de partícula y tiempo de reacción.

Cabe destacar que el pH y la temperatura de reacción serán unas constantes en este proceso experimental ya que el proveedor del complejo enzimático, luego de numerosos estudios, logró identificar los valores óptimos de dichas variables para la cual la enzima trabajará de manera óptima. Dichos valores de pH y temperatura se listan a continuación:

Tabla # 10: Valores Óptimos de las Variables de Operación

Valores Óptimos de las Variables de Operación	
Temperatura (°C)	37
pH	5,0

A continuación se explica de manera detallada el procedimiento experimental para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos, el cual será aplicado para ambos sustratos:

1. Preparar soluciones de celulosa en buffer acetato a pH = 5 y a las diferentes concentraciones de estudio.
2. Pesar 0,25 g de sustrato y sumergirlo en la solución de celulosa en buffer. La proporción dependerá de la relación líquido – sólido que se pretende estudiar.
3. Incubar la solución en un baño termostatzado a 37 °C con agitación suave.
4. Aplicar el método del DNS a la solución en ciertos intervalos de tiempo.
5. Realizar este procedimiento por triplicado para cada una de las condiciones de operación a estudiar.

3.4.6 Hidrólisis Química:

El procedimiento para llevar a cabo la hidrólisis química es el siguiente ⁽¹⁹⁾:

1. En una erlenmeyer colocar la muestra de bagazo de caña en contacto con una solución de H₂SO₄ al 4% y a una relación líquido/sólido de 30/1.
2. Colocar el recipiente en un baño termostatzado y fijar la temperatura de reacción en 100 °C.
3. Agitar la mezcla de reacción con un agitador magnético.
4. Cada cierto tiempo se toman muestras de la solución y se le aplica un enfriamiento brusco y se filtra a través de papel de filtro whatman No 1 para detener la hidrólisis.
5. Añadir a la solución NaOH 2 M hasta lograr un pH de 4,5.
6. Aplicar el método del DNS.

La siguiente es una figura explicativa del procedimiento experimental:

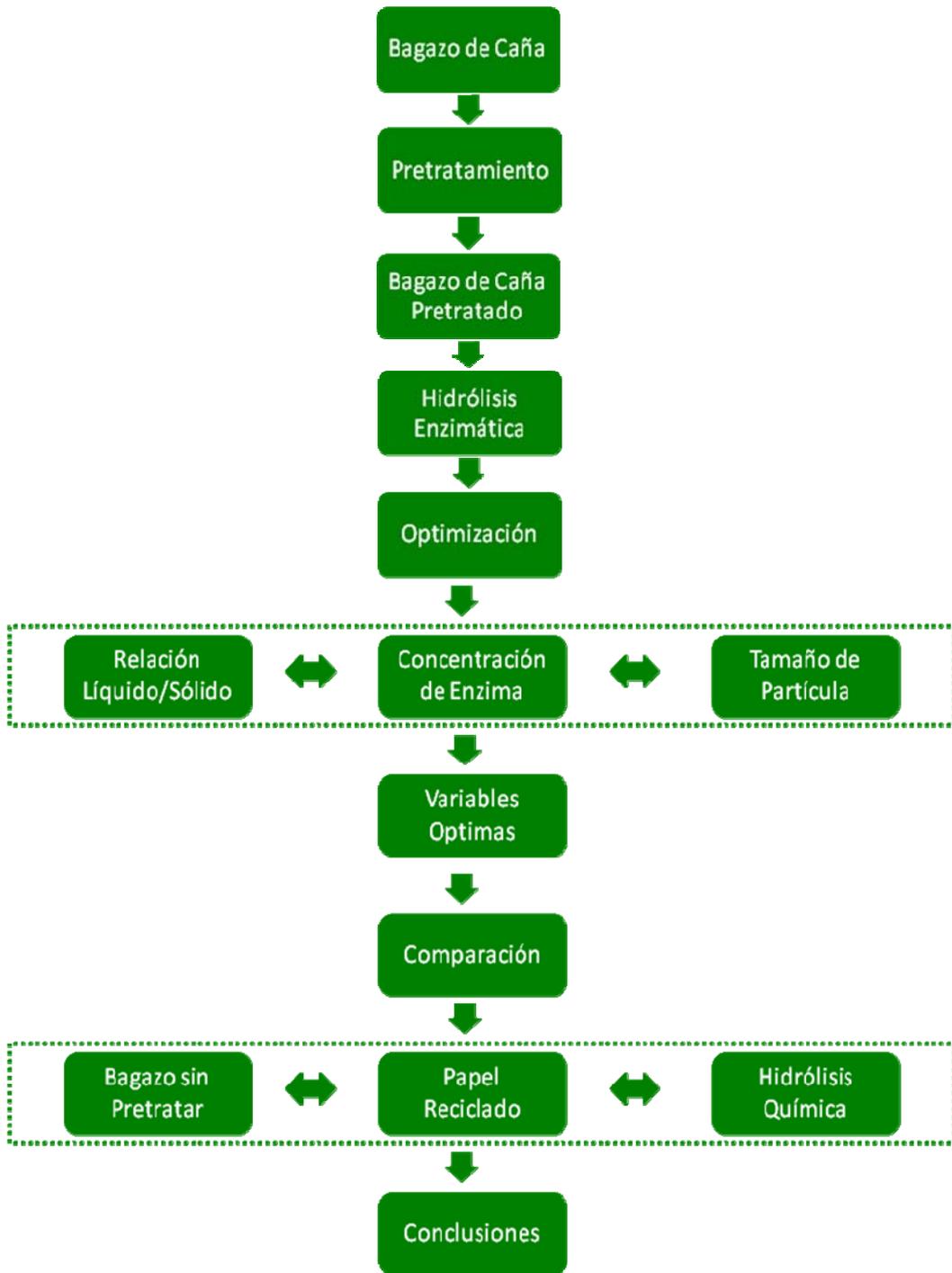


Figura # 8: Metodología

CAPITULO IV

ANÁLISIS DE RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados correspondientes a las pruebas de laboratorio de los procesos de hidrólisis de residuos lignocelulósicos, expresados en concentración de azúcares reductores, con el correspondiente análisis de las variables de operación motivo de estudio:

4.1 CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA

En la figura # 9 se muestra la curva de calibración de absorbancia vs concentración de glucosa con los puntos resultantes, el ajuste lineal y la ecuación de dicho ajuste con su respectiva desviación:

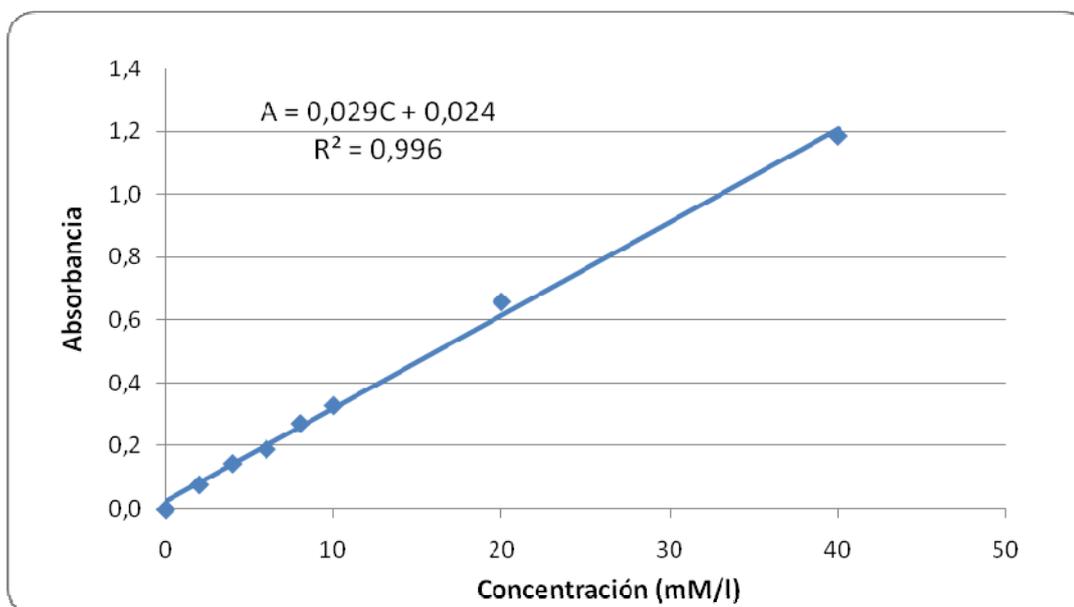


Figura # 9: Curva de Calibración de Glucosa

La curva de calibración, también conocida como curva patrón, es una gráfica de referencia construida con cantidades conocidas de una sustancia (en este caso glucosa) con el fin de determinar la cantidad de dicha sustancia presente en una muestra incógnita.

En ésta experiencia, se puede observar que la curva de calibración se ajusta muy bien a una recta, lo cual está acorde con lo que se especifica en la teoría, ya que la misma sigue los fundamentos establecidos por Lambert-Beer además de que ésta representa la relación entre la intensificación del color y la concentración de glucosa.

Dicha relación es proporcional, por lo que al graficar la absorbancia de la muestra (intensificación del color) en función de las concentraciones crecientes de la sustancia, se obtiene una recta. Esto se evidencia ya que el valor de la desviación del ajuste lineal es muy cercano a 1, lo cual corresponde al caso en el que no existe desviación.

Esta curva se utilizará en todas las experiencias de hidrólisis con el fin de determinar la cantidad de azúcares reductores producidos por unidad de tiempo.

4.2 COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE AZÚCARES REDUCTORES PRODUCIDOS A PARTIR DE UNA HIDRÓLISIS QUÍMICA CON RESPECTO A LOS OBTENIDOS POR MEDIO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE UNA MUESTRA DE BAGAZO DE CAÑA:

En este estudio se pretende comparar la efectividad de la hidrólisis enzimática con respecto al proceso de hidrólisis química, el cual es el proceso que tradicionalmente se ha venido utilizando a nivel industrial.

En la siguiente tabla se muestran las condiciones de operación a las que se llevaron a cabo cada una de las experiencias mencionadas:

Condiciones	Hidrólisis Química	Hidrólisis Enzimática
Condición del Bagazo	Pretratado con LHWP	Pretratado con LHWP
Relación Sólido/Líquido	12,5 g/l	12,5 g/l
Tamaño de Partícula	100 % < 40 Mesh	100 % < 40 Mesh
Catalizador	Ácido Sulfúrico al 4%	Solución Enzimática de 12 g/l

Tabla # 11: Condiciones de operación para el proceso de hidrólisis química.

A continuación se presenta la gráfica que muestra los resultados del progreso de la reacción para una muestra de bagazo de caña pretratado, al cual se le aplicó un proceso de hidrólisis química. Adicionalmente se presentan los resultados para la hidrólisis enzimática del mismo sustrato con el fin de comparar sus rendimientos:

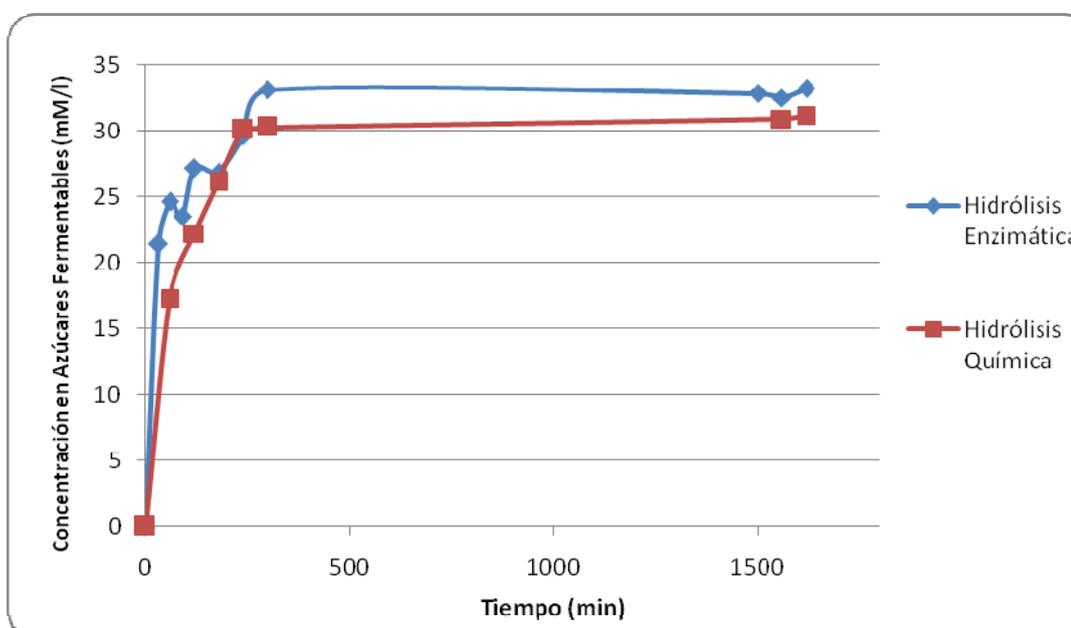


Figura # 10: Comparación entre el proceso de hidrólisis química e hidrólisis enzimática de una muestra de bagazo de caña pretratado.

Como todo proceso de hidrólisis, se obtienen unas curvas crecientes de pendiente considerable al comienzo de la reacción para luego llegar a una etapa de equilibrio que se evidencia por una concentración constante de producto, lo cual está de acuerdo con los fundamentos teóricos presentados por Michaelis y Menten.

Esto se debe a que por estarse llevando a cabo una reacción reversible, en las primeras horas de reacción existe una producción acelerada de azúcares reductores, lo cual se va reduciendo a medida que transcurre el tiempo, lo cual es causado por la disminución de la concentración de sustrato y por un aumento de la concentración de producto, afectándose así el equilibrio de la reacción.

Adicionalmente, se puede observar que para los mismos tiempos de reacción, la hidrólisis química presenta rendimientos menores comparados con la hidrólisis enzimática. Este comportamiento podría deberse al hecho de que el ácido sulfúrico, luego de cierto tiempo, puede comenzar a degradar las moléculas de glucosa produciendo menores rendimientos que en la hidrólisis enzimática.

Esto, junto con los problemas que este proceso ocasiona (corrosión de equipos y uso de elevadas temperaturas), lleva a pensar que la hidrólisis química no resulta ser un proceso tan efectivo para la conversión de la celulosa contenida en el bagazo de caña en azúcares reductores, por lo cual se concluye que es preferible realizar este proceso de manera enzimática.

4.3 COMPARACIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE UNA MUESTRA DE BAGAZO DE CAÑA PRETRATADO PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ENZIMA:

Esta experiencia se realiza con el fin de determinar cuál es la cantidad de enzima que logrará los mayores rendimientos en azúcares reductores.

En la siguiente tabla se especifican las condiciones a la cual se llevaron a cabo las pruebas de laboratorio:

Condiciones	Valores
Tipo de Bagazo	Pretratado con LHWP
Relación Sólido- Líquido	12,5 g/l
Tamaño de Partícula	100 % < 40 Mesh

Tabla # 12: Condiciones de operación para el proceso de hidrólisis enzimática variando la concentración de enzima.

A continuación, se presenta la Figura # 11 que representa al progreso de la reacción enzimática para diferentes concentraciones de enzima para una muestra de bagazo de caña pretratado:

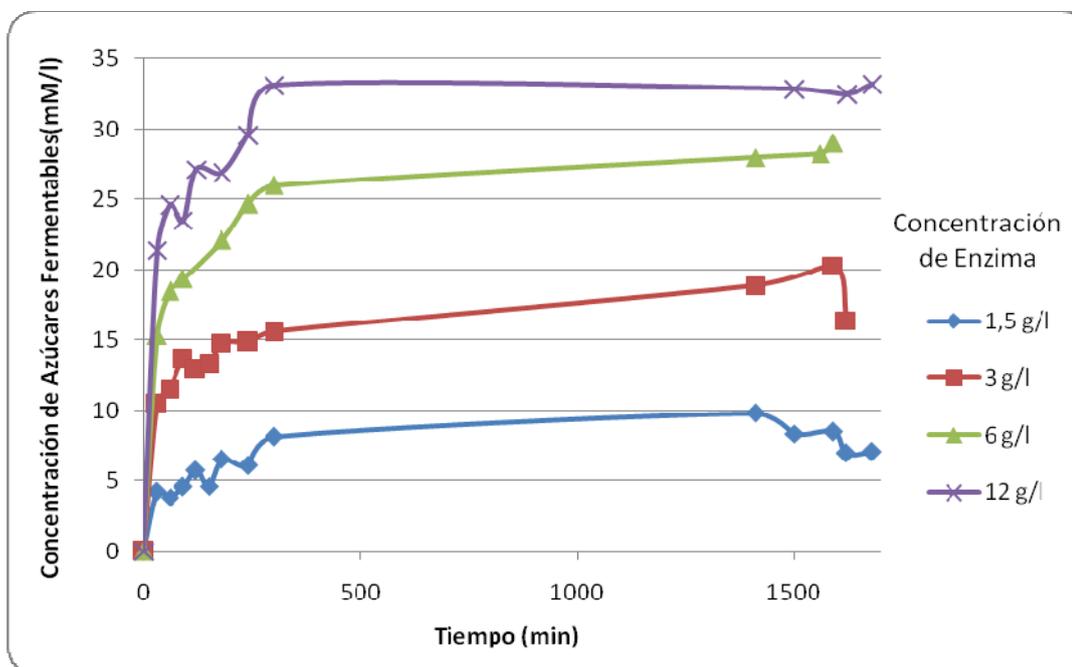


Figura # 11: Comparación del proceso de hidrólisis enzimática de una muestra de bagazo de caña pretratado para diferentes concentraciones de enzima.

Como se puede observar, las curvas presentan un comportamiento creciente hasta llegar a una situación de equilibrio aproximadamente a los 300 minutos, comportamiento que se ajusta a lo presentado en la teoría.

Adicionalmente, los resultados obtenidos demuestran que a medida que se aumenta la concentración de enzimas en la solución, la producción de azúcares fermentables se incrementa de manera notable.

Este incremento se debe a que existe una mayor cantidad de centros activos enzimáticos que pueden ser ocupados por moléculas de celulosa que reaccionarán para producir su ruptura con la consecuente formación de azúcares fermentables.

4.4 COMPARACION DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE UNA MUESTRA DE BAGAZO DE CAÑA PRETRATADO PARA DIFERENTES VALORES DE LA RELACIÓN SÓLIDO - LÍQUIDO:

En estas pruebas se pretende verificar que cantidad de sustrato dará el mayor rendimiento en azúcares reductores. Para ello se realizaron diferentes pruebas experimentales a las condiciones que se muestran a continuación:

Condiciones	Valores
Tipo de Bagazo	Pretratado con LHWP
Volumen de la solución	20 ml
Concentración de Enzima	12 g/l
Tamaño de Partícula	100 % < 40 Mesh

Tabla # 13: Condiciones de operación para el proceso de hidrólisis enzimática variando la relación sólido - líquido.

La siguiente figura muestra el progreso de la reacción enzimática para diferentes valores de la relación sólido - líquido, de una muestra de bagazo de caña pretratado:

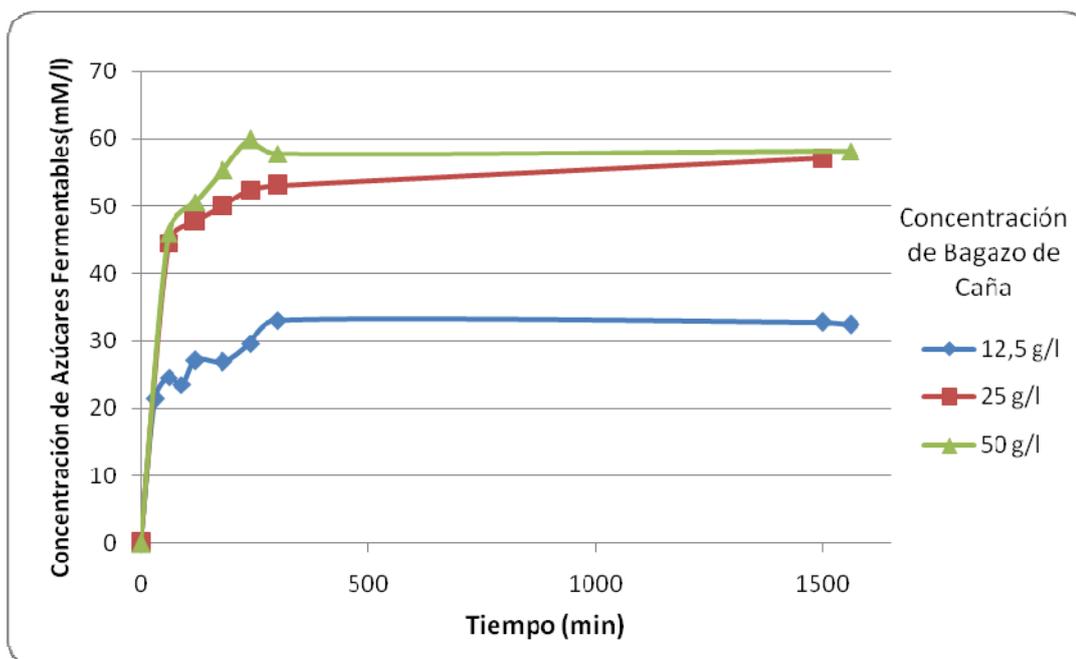


Figura # 12: Comparación del proceso de hidrólisis enzimática de una muestra de bagazo de caña pretratado para diferentes valores de la relación sólido - líquido.

En la figura, se evidencia el hecho de que a medida de que se aumenta la cantidad de sustrato en la solución, los rendimientos en azúcares reductores aumentan ya que existe una mayor cantidad de celulosa disponible.

Sin embargo, éste incremento no es notable para grandes cantidades de sustrato, lo cual podría estar sucediendo por la saturación de los centros activos enzimáticos por parte de las moléculas de celulosa y por la falta de movilidad de los reactivos debido a lo concentrado de la solución a mayor cantidad de sustrato.

Esto podría llevar a pensar que una cantidad excesiva de sustrato sería innecesaria con lo cual se podría tener un ahorro de este material.

Adicionalmente la figura muestra una cinética que sigue el comportamiento michaeliano lo cual está acorde con los fundamentos teóricos presentados.

4.5 COMPARACIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA MUESTRAS CON DIFERENTES TAMAÑOS DE PARTÍCULA DE BAGAZO DE CAÑA PRETRATADO:

La siguiente figura muestra el progreso de la reacción enzimática para diferentes valores de tamaño de partícula para una muestra de bagazo de caña pretratado:

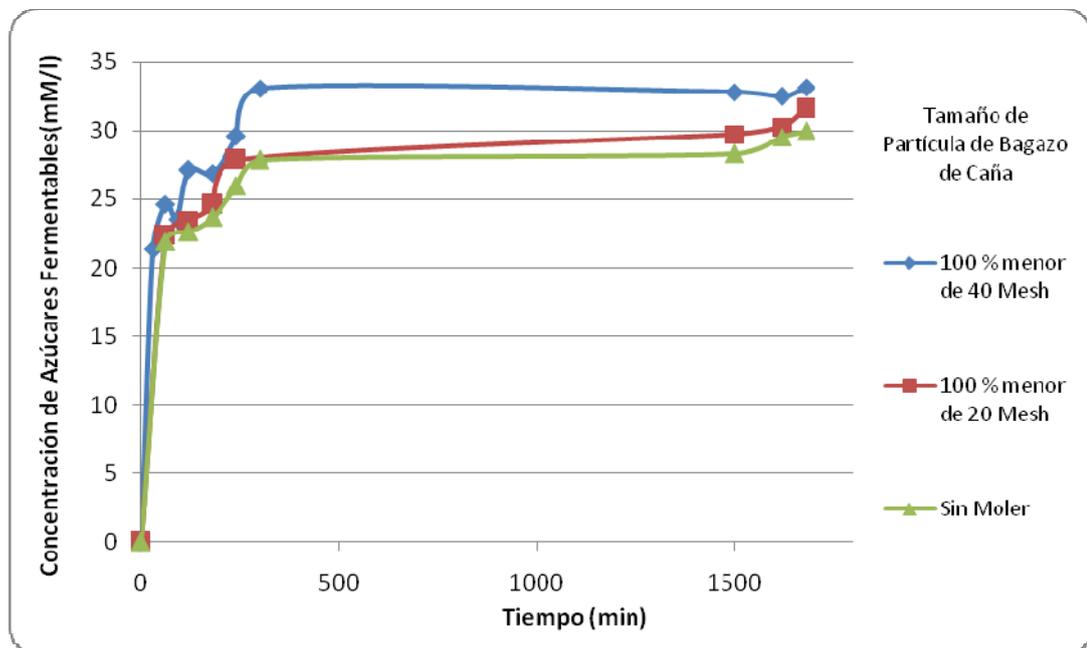


Figura # 13: Comparación del proceso de hidrólisis enzimática de una muestra de bagazo de caña pretratado para diferentes tamaños de partícula.

Las pruebas de laboratorio realizadas para muestras de bagazo con diferentes tamaños de partícula permitirán determinar la necesidad de un proceso de molienda adicional. A continuación se presentan las condiciones a las cuales se realizaron estas pruebas:

Condiciones	Valores
Tipo de Bagazo	Pretratado con LHWP
Concentración de Enzima	12 g/l
Relación Sólido- Líquido	12,5 g/l

Tabla # 14: Condiciones de operación para el proceso de hidrólisis enzimática variando el tamaño de partícula de sustrato.

Como se puede apreciar en la figura, los rendimientos en azúcares fermentables para las muestras de bagazo de caña con diferentes tamaños de partícula resultaron ser muy similares entre sí.

Por ello, se presume que una vez que el bagazo fue molido en el central azucarero llegó a un tamaño de partícula tal que permite lograr una sinergia con la enzima capaz de producir rendimientos similares a los que se lograron con partículas un poco más pequeñas, por lo cual se piensa que un proceso de molienda adicional es totalmente innecesario debido a que el costo que éste implica no justifica el incremento en rendimiento.

Al igual que con las gráficas de las experiencias anteriores, se observa que las curvas siguen el modelo cinético de Michaelis – Menten ya que las mismas presentan un crecimiento progresivo hasta llegar a una situación de equilibrio, por lo cual se concluye que las mismas representan de manera adecuada a la reacción enzimática que se lleva a cabo.

4.6 DETERMINACIÓN DEL EFECTO PRODUCIDO POR UN PRETRATAMIENTO DEL SUSTRATO SOBRE LA CANTIDAD DE AZÚCARES FERMENTABLES OBTENIDOS A PARTIR DE UNA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BAGAZO DE CAÑA:

A continuación se presentan los resultados del progreso de la reacción enzimática para una muestra de bagazo de caña a la cual se le aplicó varios tipos de pretratamiento:

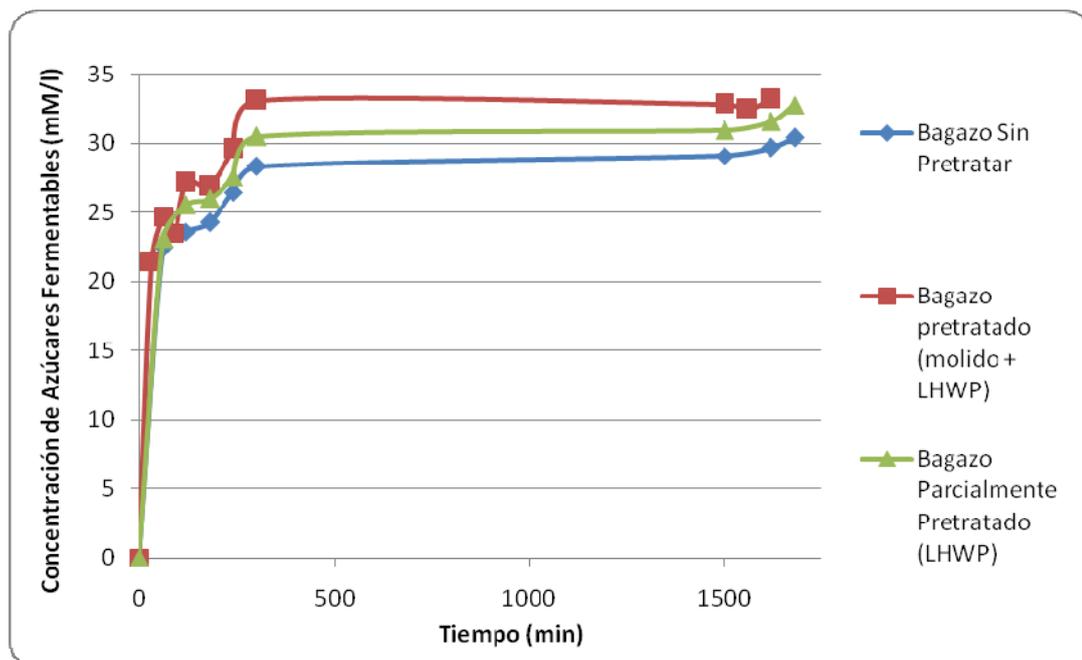


Figura # 14: Comparación del proceso de hidrólisis enzimática para muestras de bagazo de caña con diferentes procesos de pretratamiento.

Se pretende evaluar los procesos de pretratamiento para verificar las ventajas de aplicación de los mismos a escala industrial. Para ello se realizan varias pruebas de laboratorio a las siguientes condiciones:

Condiciones	Valores
Concentración de Enzima	12 g/l
Tamaño de Partícula	Sin moler
Relación Sólido- Líquido	12,5 g/l

Tabla # 15: Condiciones de operación para el proceso de hidrólisis enzimática para las pruebas con sustrato a diferentes condiciones de pretratamiento.

Los resultados obtenidos para esta experiencia demuestran que el proceso de pretratamiento con agua caliente a alta temperatura (LHWP) no provoca un incremento notable en la producción de azúcares reductores.

Este comportamiento puede deberse a las condiciones poco severas del pretratamiento ($P = 2 \text{ atm}$ y $T = 120,5 \text{ °C}$) por lo que se presume que el mismo no pudo causar la ruptura esperada de la estructura cristalina del bagazo lo cual hubiera permitido obtener mayores rendimientos.

Cabe destacar que la curva se mantiene dentro del modelo propuesto por Michaelis – Menten, ya que primero presenta un aumento en la concentración de azúcares reductores para luego llegar a una situación de equilibrio.

Todo esto lleva a concluir que si bien el pretratamiento con agua caliente a altas temperaturas no es efectivo, el mismo no afecta negativamente a la cinética de la reacción enzimática, sin embargo, el mismo no debería ser utilizado a nivel industrial ya que aumentaría los costos sin lograr los beneficios esperados, a menos de que se

realizara a unas condiciones de operación que provoque un aumento en el rendimiento de azúcares reductores.

4.7 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE AZÚCARES FERMENTABLES PRODUCIDOS A PARTIR DE UNA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE UNA MUESTRA DE PAPEL RECICLADO:

La siguiente gráfica muestra los resultados del progreso de la reacción enzimática para una muestra de papel reciclado. Adicionalmente, se graficarán los resultados para el caso en el que se utiliza bagazo de caña para así tener un patrón de comparación adecuado:

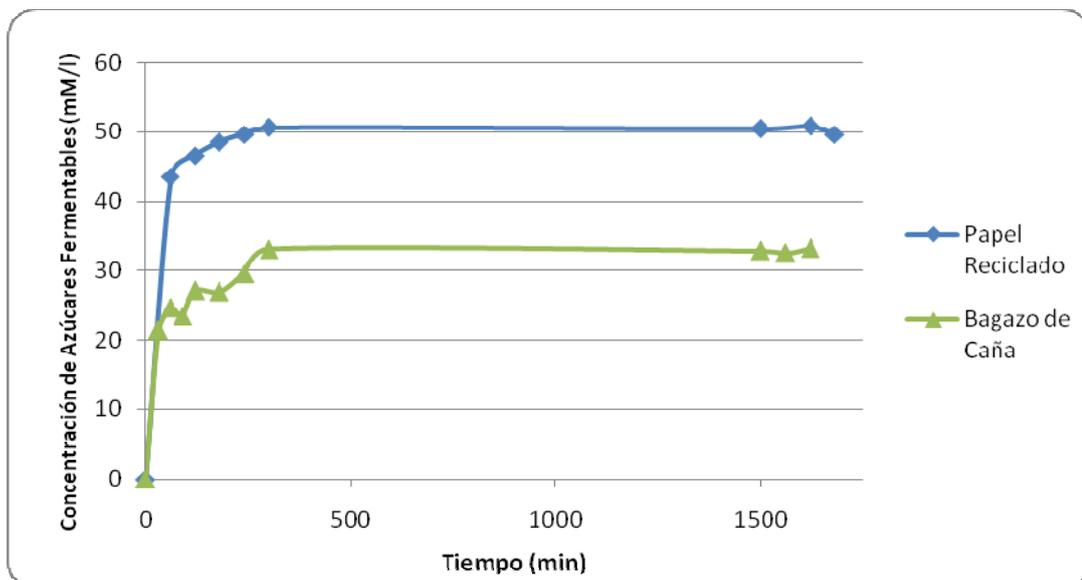


Figura # 15: Comparación del proceso de hidrólisis enzimática para diferentes sustratos lignocelulósicos.

En esta experiencia se busca comparar el comportamiento de diferentes sustratos ante un ataque enzimático. Para ello se realizaran pruebas a las condiciones

de operación que se muestran en la siguiente tabla para muestras de bagazo de caña y de papel reciclado:

Condiciones	Valores
Concentración de Enzima	12 g/l
Tamaño de Partícula de Bagazo	40 Mesh
Relación Sólido - Líquido	12,5 g/l

Tabla # 16: Condiciones de operación para el proceso de hidrólisis enzimática para las pruebas con bagazo de caña y papel reciclado.

La gráfica anterior muestra que los rendimientos en azúcares fermentables para papel reciclado son alrededor de un 40% mayor comparados con lo obtenido para muestras de bagazo de caña.

Este comportamiento se está presentando ya que el papel reciclado no contiene grandes cantidades de lignina y hemicelulosa en comparación con el bagazo de caña, compuestos que entorpecen la acción de las enzimas, por lo cual debe ser más fácil el acceso a la celulosa con un consiguiente aumento en el rendimiento en azúcares fermentables.

En la siguiente tabla se muestran los rendimientos en azúcares fermentables que se obtienen de las experiencias anteriores. Los cálculos tipos se encuentran en los anexos # 4:

Sustrato	Rendimiento
Papel Reciclado	71,52 %
Bagazo de Caña	95,61 %

Tabla # 17: Rendimientos en azúcares fermentables para la hidrólisis enzimática de bagazo de caña y papel reciclado

Como se observa, a pesar de que la cantidad de azúcares fermentables producidos es mayor para cuando se realiza la prueba con papel reciclado, los rendimientos de dicho proceso resultan ser menores en relación al proceso que utiliza bagazo de caña. Esto puede ser debido a que el tamaño de partícula del papel de filtro utilizado era mucho mayor que el tamaño de partícula del bagazo de caña, además de que las tintas que posee el papel pudieron causar un efecto inhibitorio en las enzimas.

También cabe destacar que dicho proceso sigue el modelo de Michaelis-Menten lo cual está de acuerdo a lo que se especifica en la teoría.

4.8 OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES DE OPERACIÓN (CONCENTRACIÓN DE ENZIMA Y RELACIÓN SÓLIDO- LÍQUIDO):

A continuación se presenta la estrategia de análisis para determinar cuáles son las variables óptimas para la realización del proceso de hidrólisis de bagazo de caña a escala industrial.

Por los resultados obtenidos en las pruebas anteriores se concluye que un proceso de pretratamiento y molienda no son necesarios, por lo cual se realizarán las pruebas de laboratorio con el bagazo de caña a las condiciones del central azucarero.

Cabe destacar que las condiciones de temperatura y pH a utilizar serán las recomendadas por la casa fabricante de las enzimas (Sigma-Aldrich), ya que los mismos realizaron un conjunto de pruebas para optimizar dichos valores. Estos valores se pueden verificar en la tabla # 10.

En lo que se refiere al tiempo de reacción, en todas las gráficas que se mostraron se observa que el proceso de hidrólisis llega al equilibrio en un tiempo de

300 min (5 h) aproximadamente. Por ello, éste se tomará como el tiempo de reacción para los cálculos que se presentan a continuación.

En la siguiente tabla se muestra la matriz de los resultados de las pruebas de laboratorio que se realizaron, mostrando la concentración de azúcares reductores máximos producidos, expresados en mMol/l, para todas las combinaciones posibles de concentración de enzima y de relación sólido - líquido:

		Concentración de Enzimas (g/l)			
		1,5	3	6	12
Concentración de Bagazo de Caña (g/l)	12,5	7,052	16,397	29,016	33,201
	25	8,534	18,672	35,069	57,023
	50	12,828	18,448	40,069	58,172
	Concentración Máxima de Azúcares Fermentables				

Tabla # 18: Concentración máxima de azúcares fermentables (mMol/l) para la hidrólisis enzimática variando la concentración de enzima y de la relación sólido - líquido.

Como se observa en la tabla anterior, a medida que se aumenta los valores de las variables de estudio, la producción de azúcares fermentables aumenta. Los mayores incrementos en la síntesis del producto se observa al variar la concentración de enzima, mientras que para cuando se varia la relación sólido – líquido dicho aumento es bastante pequeño.

Para tener una mejor representación de los resultados se decide calcular el valor del rendimiento en azúcares reductores.

Para ello se hace la suposición de que el bagazo de caña está compuesto por 50% de celulosa (ver tabla # 3) y que el máximo rendimiento que se puede obtener es si se convirtiera el 100 % de la celulosa contenida en el mismo.

A continuación se presenta la tabla y la gráfica de resultados de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña variando la concentración de enzima y la relación sólido – líquido, expresada en rendimientos en azúcares fermentables:

		Concentración de Enzimas (g/l)			
		1,5	3	6	12
Concentración de Bagazo de Caña (g/l)	12,5	20 %	47,2 %	83,2 %	96 %
	25	12,4 %	26,8 %	50,4 %	82 %
	50	9,2 %	13,2 %	28,8 %	41,8 %

Rendimientos Máximos de Azúcares Fermentables

Tabla # 19: Rendimientos en azúcares fermentables para varias combinaciones de concentración de enzima y de relación sólido – líquido.

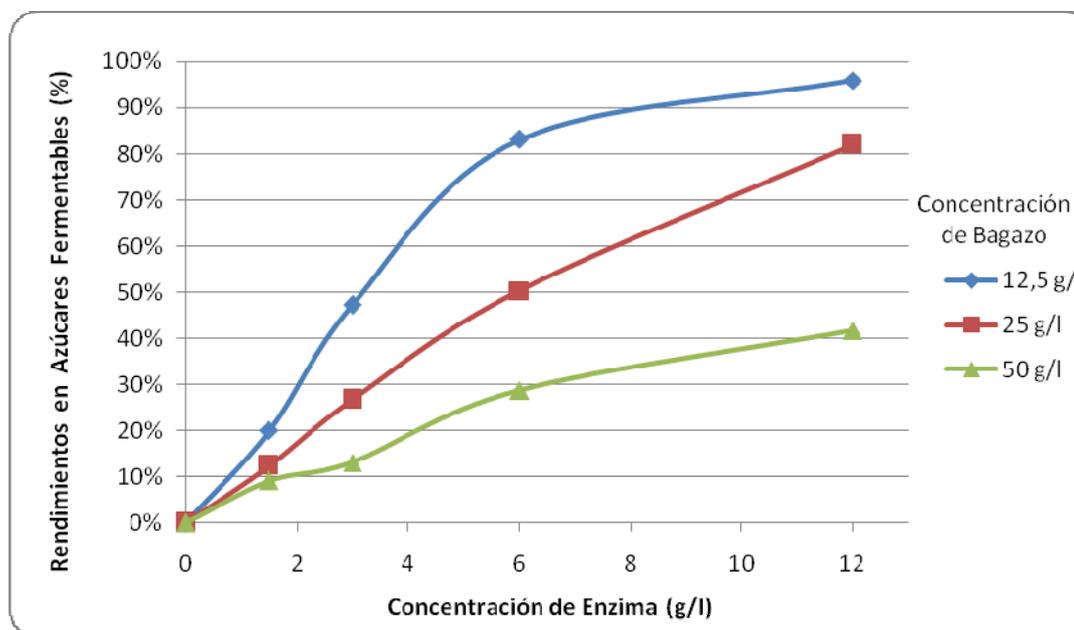


Figura # 16: Rendimientos en azúcares fermentables para varias combinaciones de concentración de enzima y de relación sólido – líquido.

Como se aprecia en la figura, a medida que se utiliza una menor concentración de bagazo de caña en la solución, los rendimientos en azúcares fermentables aumentan de manera notable. Este comportamiento se puede deber al hecho de que mientras la solución está más concentrada, la misma tendrá una viscosidad mayor lo cual impedirá el contacto adecuado entre el sustrato y los centros activos de la enzima.

Para seleccionar la combinación más adecuada se debe llegar a un compromiso entre rendimiento y concentración de azúcares fermentables.

En lo que se refiere a la concentración de enzima, las tablas y gráficas muestran el hecho de que mientras mayor sea su valor, se producirá una mayor cantidad de azúcares fermentables, además de un aumento en el rendimiento. Es por ello que se elige a la concentración de enzima de 12 g/l como la concentración óptima para la realización del proceso a escala industrial, desechando de ésta manera a la concentración de 1,5 g/l, 3 g/l y 6 g/l. Cabe destacar que ésta decisión fue basada únicamente en aspectos técnicos. Los análisis económico deberán ser analizados en otra investigación.

Si bien a medida que se disminuye la concentración de sustrato en la solución los rendimientos aumentan, se observa una gran diferencia en la concentración de azúcares fermentables producidos para una concentración de bagazo de 12,5 g/l y 25 g/l. Esto se puede observar en la siguiente tabla:

Concentración de Bagazo (g/l)	Concentración en Azúcares Fermentables (mMol/l)	Rendimientos
12,5	33,201	96 %
25	57,023	82 %

Tabla # 20: Concentración y rendimientos en azúcares fermentables para varias combinaciones más prometedoras de concentración de enzima y de relación sólido – líquido.

A partir de la tabla anterior se decide elegir al valor de 25 g/l como concentración de bagazo óptima ya que la misma, a pesar de presentar un rendimiento un poco menor, produce una cantidad de azúcares fermentables mucho mayor en comparación con el proceso que utiliza una concentración de bagazo de 12,5 g/l, lo cual justifica la pequeña disminución en rendimientos.

Cabe destacar que no se consideró en éste análisis al proceso que utiliza una concentración de bagazo de 50 g/l, ya que además de poseer un rendimiento muy pequeño, la diferencia en concentración de azúcares fermentables en relación al proceso que utiliza una concentración de 25 g/l de bagazo es casi insignificante.

A continuación se presenta la tabla resumen de las variables óptimas para la realización del proceso de hidrólisis enzimática de bagazo de caña a escala industrial:

Condiciones de Operación	Valores Óptimos
Temperatura	37 °C
Presión	1 atm
pH	5
Medio de Solución	Buffer Acetato
Concentración de Enzima	12 g/l
Concentración de Bagazo de Caña	25 g/l
Tamaño de Partícula	Bagazo con el tamaño de partícula proveniente del central azucarero
Pretratamiento	Sin Pretratamiento

Tabla # 21: Condiciones óptimas de operación del proceso de hidrólisis enzimática de bagazo de caña.

4.9 CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DEL REACTOR EN EL CUAL SE REALIZARÁ EL PROCESO A ESCALA INDUSTRIAL:

Para realizar el diseño del reactor es necesario definir las características más importantes del mismo las cuales serán las siguientes:

- Tipo.
- Forma.
- Agitación.
- Control de Temperatura.
- Material.

A continuación, se muestran las bases que se tomaron para el diseño de éste equipo utilizando las condiciones de operación óptimas discutidas en la sección 4.8 de los análisis de resultados:

4.9.1 Tipo de Reactor:

Dada la naturaleza de la reacción y al modo de realizar las pruebas a nivel de laboratorio, se decide utilizar un reactor por cargas debido a la sencillez del proceso, ya que el manejo de sólidos en una operación continua es una tarea bastante compleja, además de que si se utiliza un tren de reactores se podría tener un proceso con una producción “continua” de azúcares reductores.

4.9.2 Selección de la Forma del Reactor:

Debido a que se tiene una mezcla de reacción heterogénea, donde el catalizador se encuentra diluido en una solución de buffer, mientras que el sustrato de la reacción es un sólido, se debe diseñar un reactor con una forma tal que permita un contacto

adecuado entre las fases de reacción. Para ello, es necesario revisar el comportamiento de estas fases.

El bagazo de caña utilizado, debido a que no se le aplicará un proceso de molienda adicional, tendrá un rango bastante amplio de tamaños de partícula, que van desde valores de $100\% < a 1 \text{ Mesh}$ hasta valores $100\% > a 40 \text{ Mesh}$.

Este rango de partículas de diferentes tamaños ocasionará que una cantidad considerable de bagazo tienda a depositarse en el fondo del reactor, mientras que la otra parte tienda a flotar en la superficie. Es por esta razón que se elige un reactor de forma cilíndrica de orientación vertical, con una agitación tal que provoque un flujo axial de la mezcla de reacción.

En lo que se refiere a las dimensiones del reactor, la bibliografía recomienda una relación entre la longitud y el diámetro del mismo igual a 3. Sin embargo, estos valores se determinarán una vez que se decida la capacidad que tendrá la planta. (20)

4.9.3 Selección del Tipo de Agitación:

La agitación es el procedimiento mediante el cual se puede lograr la mezcla de las fases involucradas en la reacción, además de mejorar el proceso de transferencia de masa y de transferencia de calor.

Para determinar el diseño del sistema de agitación, se debe realizar un estudio de las características más importantes del medio. El mismo, es una mezcla heterogénea de una solución enzimática líquida de buffer citrato con bagazo de caña el cual actúa como sustrato sólido.

Adicionalmente, se tiene que tomar en cuenta que las enzimas pueden sufrir un proceso de degradación en el caso de que la agitación sea muy violenta y con

formación de espuma. Es por ello que se descarta la agitación por medio de la inyección de gases y se decide utilizar un agitador mecánico.

Para optimizar el sistema de agitación se considerará el uso de varios internos, cuyas características se listan a continuación:

- **Deflectores (Baffles):**

Estos dispositivos se utilizan con el fin de prevenir la aparición de vórtices y la rotación de la suspensión como una masa compacta alrededor del tanque. Las especificaciones que se listan a continuación son resultados de numerosos estudios previos los cuales están documentados en la bibliografía ⁽²⁰⁾:

- El ancho del deflector será de un doceavo del diámetro del tanque:

$$W_b = (1/12)D_r$$

Donde:

W_b = Ancho del Deflector.

D_r = Diámetro del Reactor.

- En este caso, por ser una solución sólido – líquido, los deflectores se colocan a una distancia con respecto a la pared del tanque de 1/6 del ancho del deflector.
- Se colocarán 4 deflectores radiales con igual espaciamiento entre sí.
- La longitud del deflector será determinada por la distancia existente entre el espacio que ocupa la mitad del diámetro del impulsor a partir del fondo del tanque hasta el nivel del líquido en el tanque a operación normal.

Este valor se calcula por la siguiente expresión:

$$L_d = H_l - 1/2D_i$$

Donde:

L_d = Longitud del deflector.

H_l = Altura del líquido en el tanque.

D_i = Diámetro del impulsor.

- **Impulsores:**

El impulsor es un dispositivo rotatorio diseñado con el fin de empujar a un fluido dentro de un tanque. Para elegir el mejor tipo de impulsor, es necesario establecer sus características principales:

- Tipo de Impulsor: Se utilizará un impulsor tipo turbina con 4 paletas inclinadas haciendo un ángulo de 45° con respecto al eje del impulsor, ya que éstas proporcionan un flujo tanto axial como radial, además de que son especialmente efectivos cuando se trata de un reactor con intercambio de calor.

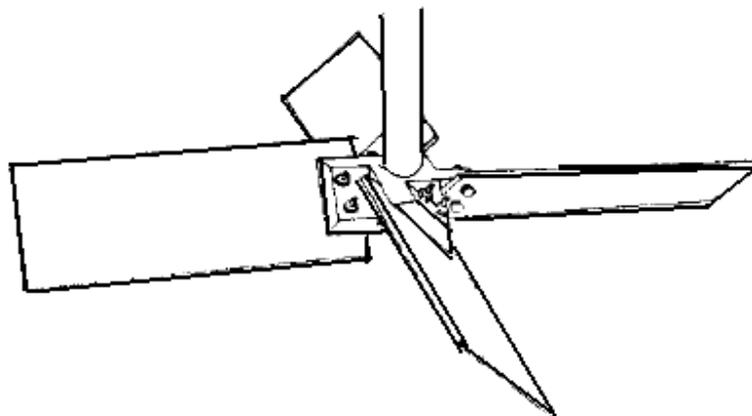


Figura # 17: Impulsor tipo turbina.

-
- Tamaño del Impulsor: Luego de varios estudios, se logró obtener la siguiente relación para el tamaño del impulsor:

$$D_i/D_r = 0.6$$

Donde:

D_i = Diámetro del Impulsor.

D_r = Diámetro del Reactor.

- Velocidad del Impulsor: Debido a que se necesita una agitación suave, se decide utilizar una velocidad de rotación de 50 rpm.
- Cantidad de Impulsores: Se colocarán tantos impulsores como sea posible a lo largo del eje, espaciados entre sí por una distancia de 1/3 de la altura del líquido en el tanque.
- Localización del Impulsor: El primer impulsor estará ubicado en el eje central del reactor y separado del fondo del mismo por una distancia de un tercio del diámetro del impulsor:

$$h_{i1} = 1/3d_i$$

El segundo y tercer impulsor estarán ubicados a una distancia que se expresa mediante las siguientes ecuaciones:

$$h_{i2} = h_{i1} + (H/3) \quad \text{y} \quad h_{i3} = h_{i2} + (H/3)$$

Donde:

h_{i1} = Distancia que separa al impulsor 1 del fondo del tanque.

h_{i2} = Distancia que separa al impulsor 2 del fondo del tanque.

h_{i3} = Distancia que separa al impulsor 3 del fondo del tanque.

- **Tubo Interno:**

Este tubo es un cilindro dentro del cual se coloca el impulsor con el fin de provocar un flujo axial de la mezcla de reacción. La longitud del mismo será un poco mayor a la longitud del impulsor.

Para éste caso en particular, se decide utilizar dos cilindros concéntricos sellados en los extremos, dentro del cual (entre la pared interna y la pared externa) pueda fluir agua caliente con el fin de mantener la temperatura de la reacción en el valor adecuado.

- **Cuchilla Rotatoria:**

Este dispositivo se utiliza con el fin de evitar el asentamiento de las partículas de bagazo de caña. El mismo, consiste en una cuchilla con un movimiento radial alrededor de la base del tanque, el cual arrastra las partículas de bagazo que se depositaron en el mismo para ayudar a que sean succionadas por los impulsores.

4.9.4 Selección del Control de Temperatura:

La hidrólisis enzimática, por estarse tratando de un proceso de ruptura de enlaces, necesita de energía para que la reacción se pueda llevar a cabo, es decir, es una reacción ligeramente endotérmica.

Cabe destacar que la temperatura de la reacción debe ser controlada de manera adecuada porque que la misma se lleva a cabo de manera óptima a 37 °C, ya que a temperaturas mayores ocurrirá la desnaturalización de las enzimas y a temperaturas

menores no se logrará la energía de activación necesaria para que se dé inicio a la reacción catalítica.

Es por ello que se decide utilizar un dispositivo de doble cilindro concéntrico interno con el fin de mantener la temperatura de reacción en el valor óptimo por medio de la variación del flujo de agua caliente.

A pesar de que se realiza un proceso a bajar temperaturas, para impedir las pérdidas de calor hacia el ambiente, se colocará un aislante de espuma de polietileno, ya que la misma se caracteriza por ser económica y fácil de colocar.

4.9.5 Selección del Material de Construcción:

Debido al carácter ácido de la solución ($\text{pH} = 5$), el reactor debe ser construido en acero inoxidable con el fin de evitar la corrosión del mismo con su posterior debilitamiento.

A continuación se presenta una tabla resumen de las características principales que tendrá el reactor que realizará el proceso de hidrólisis enzimática a escala industrial con una figura explicativa de todos sus componentes:

Característica	Valor
Tipo de Reactor	Reactor por Cargas
Forma del Reactor	Cilíndrico
Orientación	Vertical

Tabla # 22: Resumen de las características del reactor.

Característica	Valor
Relación D/L	3
Tipo de Agitación	Mecánica
# de Deflectores	4
Ancho de los Deflectores	$W_b = 1/12D_r$
Longitud del Deflector	$L_d = H_l - 1/2D_i$
Impulsor	Tipo Turbina con 4 paletas inclinadas haciendo un ángulo de 45° con el eje del impulsor.
Diámetro del impulsor	$D_i/D_r = 0,6$
Velocidad del Impulsor	50 rpm
Localización del Impulsor 1 (h_{i1})	Distancia de $1/3d_i$ del fondo del tanque orientado en el eje central del reactor
Localización del Impulsor 2 (h_{i2})	$h_{i2} = h_{i1} + H_l/3$
Localización del Impulsor 3 (h_{i3})	$h_{i3} = h_{i2} + H_l/3$
Control de Temperatura	2 Cilindros concéntricos sellados con flujo de agua caliente intermedio.
Aislamiento	Espuma de Polietileno
Material de Construcción	Acero Inoxidable

Tabla # 22: Resumen de las características del reactor (Continuación)

Adicionalmente se presentan unas figuras explicativas de las dimensiones del reactor:

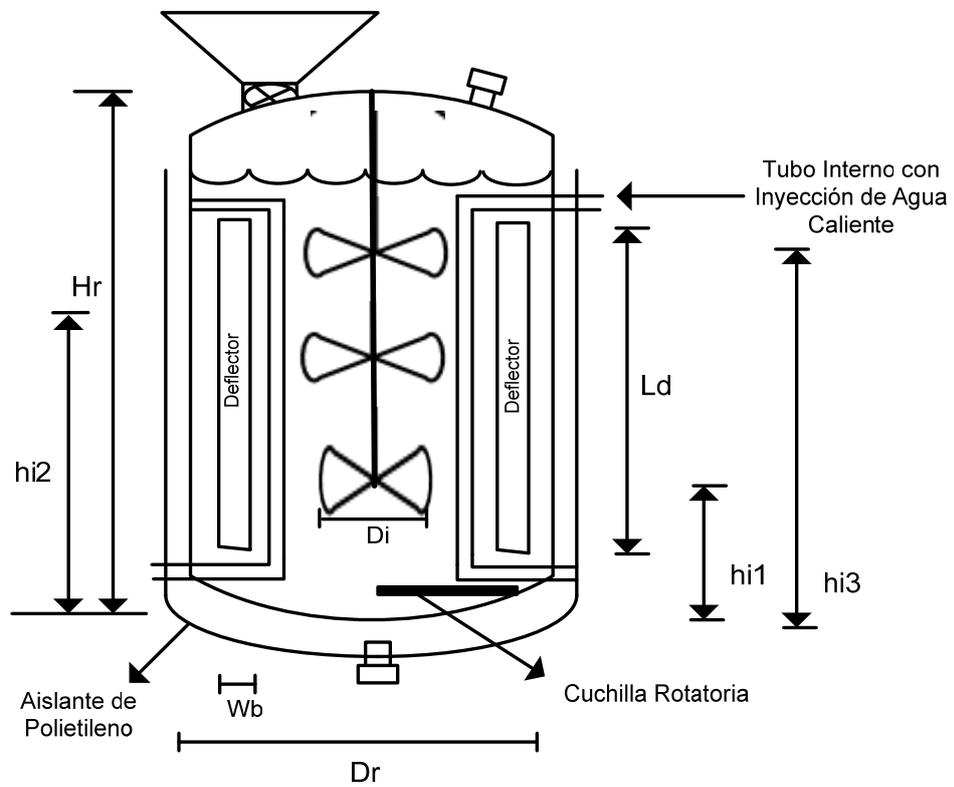


Figura # 18: Reactor para la realización de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña.

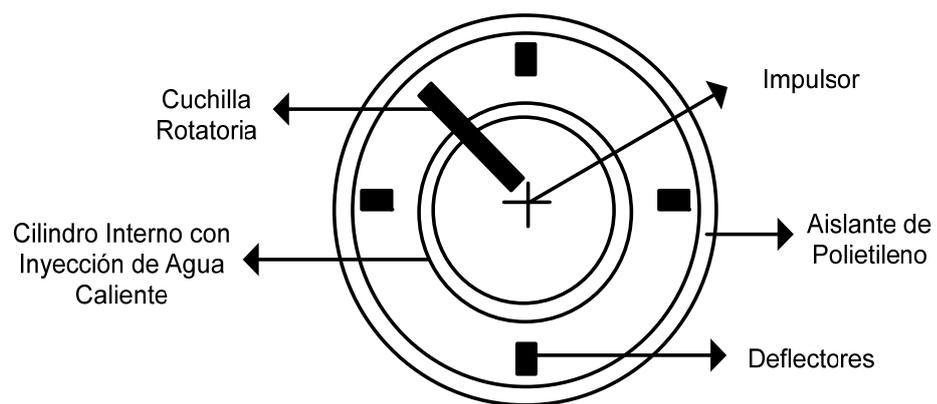


Figura # 19: Vista superior del reactor para la realización de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña.

4.10 DESARROLLO DE UN SOFTWARE PARA EL CÁLCULO DE LAS DIMENSIONES DE UN REACTOR INDUSTRIAL PARA LA REALIZACIÓN DE UNA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BAGAZO DE CAÑA:

A partir de los datos obtenidos de manera experimental, se desarrollará un software con el fin de calcular el volumen del reactor a utilizar, teniendo como datos de entrada a la cantidad de azúcares reductores que se desea producir (kg/h), el tiempo de reacción y un valor aproximado del diámetro del reactor. Gracias a ésta herramienta, y a la tabla # 65 se podrá determinar las dimensiones del reactor. El nombre de dicho software será Ereactor V 1.0.

Este software fue desarrollado en el programa “Microsoft Excel 2007” y a continuación se muestra la interface del mismo. En los anexos # 5 se podrán encontrar los cálculos tipos para un ejemplo de capacidad de la planta.

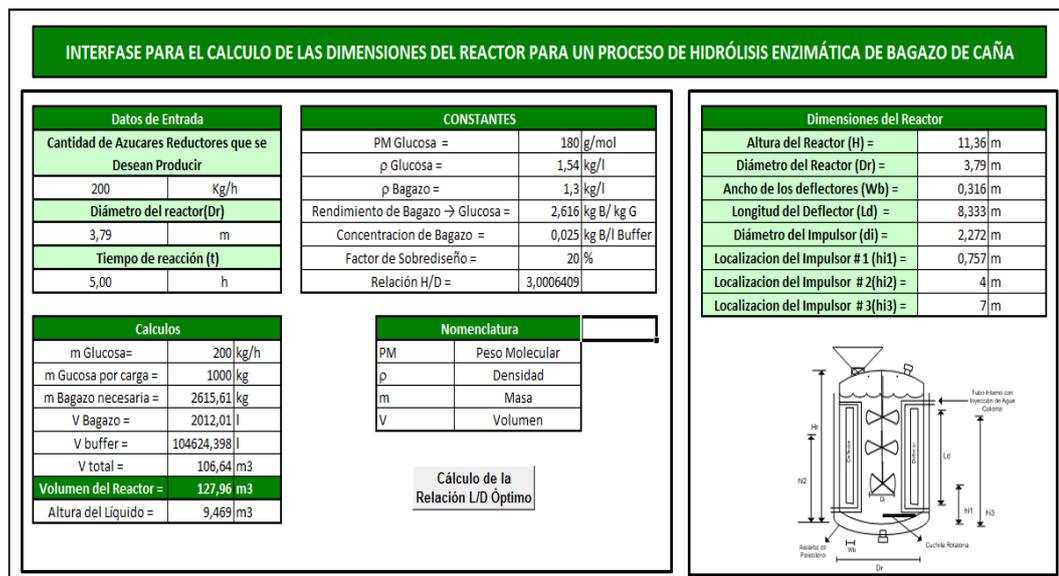


Figura # 20: Interfase para el cálculo de las dimensiones del reactor.

Cabe destacar que al volumen del reactor calculado, se le aplicará un factor de sobrediseño de 20% por medidas de seguridad.

4.11 OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE REACCIÓN PARA EL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BAGAZO DE CAÑA:

Gracias a la herramienta electrónica que se mencionó en la sección 4.10, se logró optimizar el tiempo de reacción para el proceso industrial. La siguiente tabla muestra los resultados más importantes en rendimientos y dimensiones de reactor:

Variable	Opción # 1	Opción # 2	Opción # 3
Tiempo de Reacción (h)	2	4	5
Tiempo de Operación (h)	2,4	4,8	6
Número de Cargas por Día	10	5	4
Diámetro del Reactor (m)	2,89	3,53	3,79
Altura del Reactor (m)	8,67	10,59	11,36
Volumen del Reactor (m ³)	56,97	103,72	127,96
Cantidad de Azúcares Reductores Producidos por Carga (kg)	400	800	1000
Cantidad de Azúcares Reductores Producidos por Día (kg)	4000	4000	4000

Tabla # 23: Resultados de las características del reactor industrial para diferentes tiempos de reacción.

La tabla anterior muestra que para una misma producción de azúcares reductores al día, a medida que se disminuye el tiempo de reacción, los volúmenes del reactor disminuyen de manera considerable, lo cual se evidencia ya que al disminuir a la mitad el tiempo de reacción, el volumen del reactor disminuye aproximadamente a la mitad de su valor, lo cual ocasionaría una reducción de costos bastante importante.

A partir de éste análisis se decide llevar a cabo el proceso a nivel industrial en un tiempo de reacción de 2 horas, a lo cual, si sumamos el tiempo que implica el acondicionamiento del proceso (carga, descarga, limpieza, etc.), se tiene que el tiempo de operación del reactor será de 2,4 horas.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

A continuación se presentan las conclusiones a las que se llegaron con la realización de éste proyecto de tesis:

- La enzima celulasa es capaz de hidrolizar a la celulosa del bagazo de caña para producir azúcares fermentables.
- La cinética de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña se ajusta al modelo de Michaelis – Menten.
- La hidrólisis enzimática es la mejor alternativa para la producción de azúcares fermentables, ya que además de ser un proceso amigable con el medio ambiente, la misma se realiza a condiciones poco severas y provee de mayores rendimientos comparados con la hidrólisis química.
- A medida que se aumenta la concentración de enzima en la solución, aumentan los rendimientos en azúcares fermentables.
- Los rendimientos en azúcares fermentables para una solución con una concentración muy alta de bagazo de caña (alta viscosidad) serán mucho menores en comparación con una solución menos concentrada de sustrato.
- El proceso de molienda del bagazo de caña en el central azucarero provee de tamaños de partícula lo suficientemente pequeños como para obtener buenos rendimientos. Una molienda adicional es innecesaria.

-
- El pretratamiento con agua caliente a altas temperaturas, a menos de que se realice a condiciones realmente muy severas, no causará un gran impacto en el rendimiento en azúcares fermentables.
 - Los sustratos con concentraciones pequeñas de lignina y hemicelulosa tendrán una producción de azúcares fermentables mayor en comparación con sustratos altamente lignificados.
 - La concentración óptima de enzima para la realización del proceso de hidrólisis es de 12 g/l.
 - La concentración óptima de bagazo de caña es de 25 g por litro de solución.
 - Para evitar la desnaturalización de las enzimas se debe utilizar un sistema de agitación mecánica.
 - Con el fin de tener un contacto óptimo entre el sustrato y la solución enzimática, el reactor debe poseer una agitación que provoque un flujo axial.
 - El tiempo óptimo de reacción para lograr los máximos rendimientos con un tamaño de reactor pequeño es de 2 horas.

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

A continuación se presentan una serie de sugerencias que podrían servir de guía para futuras investigaciones:

- Realizar estudios profundos en el campo de la producción de enzimas para así optimizar dicho proceso y reducir costos.
- Profundizar en el estudio de procesos para la reutilización de las enzimas (por ejemplo las enzimas inmovilizadas) lo cual ayudaría a reducir costos ya que se preserva al catalizador.
- Se recomienda estudiar el uso de pretratamientos alternativos que podrían ayudar a aumentar los rendimientos.
- Se sugiere hacer un análisis detallado de los tipos de azúcares fermentables que se obtienen de éste proceso de hidrólisis para así poder determinar qué productos finales podrían obtenerse a partir de los mismos.
- Analizar el comportamiento de la enzima celulasa para la conversión de otros residuos lignocelulósicos como los desechos del maíz, yuca, sorgo, etc.
- Si se desea ajustar el proceso de hidrólisis para otro sustrato, se debe verificar las condiciones del mismo y se debe asegurar que este no contenga cualquier sustancia que pueda inhibir la acción enzimática.
- Se sugiere realizar un estudio para intentar encontrar un uso rentable de la lignina y la hemicelulosa.

-
- Se recomienda estudiar el proceso de sacarificación y fermentación simultánea de residuos lignocelulósicos para su conversión directa a combustibles como el etanol.
 - Se sugiere realizar un estudio para la realización de la hidrólisis enzimática por medio de la utilización directa del hongo productor de la enzima, con lo cual se presume que se podría incurrir en un ahorro de capital.
 - Para obtener más información sobre la cinética de la reacción enzimática, se recomienda realizar un estudio profundo para el cálculo de las constantes cinéticas (constantes de Michaelis-Menten).
 - Se sugiere analizar el comportamiento de la gráfica de la derivada de la concentración de azúcares reductores con respecto al tiempo (dC/dt) vs. tiempo con el fin de determinar de una manera más exacta el momento en que se llega al equilibrio.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFIA

1. Wilke, C. Mitra, G (1974). Continuous Cellulase Production. Wiley, Interscience. Vol 17, Issue 1, (1 - 13).
2. Folke, Tjerneld (2004). Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. I. partition of cellulases from *Trichoderma reesei*. Wiley, Interscience. Vol 27, Issue 7, (1036 - 1043).
3. Okazaki, M. Moon-Young, M (2005). Kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose: analytical description of a mechanistic model. Wiley, Interscience. Vol 20, Issue 5, (637 - 663).
4. Rodríguez Lourdes (1991). Hidrólisis de la celobiosa con b-glucosidasa inmovilizada. Trabajo de grado de maestría. Universidad Complutense de Madrid. Disponible: <http://www.ucm.es> [Consulta: 2007, Enero 19].
5. Álvarez María (1991). Degradación enzimática de la biomasa de *Onopordum nervosum* Bois. Trabajo de grado de maestría. Universidad Complutense de Madrid. Disponible: <http://www.ucm.es> [Consulta: 2007, Enero 25].
6. Pérez iris (2006). Las β -galactosidasas y la dinámica de la pared celular. Revista de ciencia y tecnología de América Interciencia. [Revista en línea]. Disponible: <http://redalyc.uaemex.mx> [Consulta: 2007, Enero 9]

-
7. Castillo Teresa. Proteínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología. Revista del departamento de biotecnología y bioingeniería del cinvestav. [Revista en línea]. Disponible: <http://www.cinvestav.mx> [Consulta: 2007, Febrero 12]
 8. Goldstein Irving S. Productos químicos derivados de la madera. (1998, octubre). Ponencia presentada en el octavo congreso mundial de montes celebrado en Yakarta. Disponible: <http://www.fao.org/docrep/n5525s/n5525s01.htm> [Consulta: 2007, Febrero 23]
 9. Rojas Natalia (2004). Hongos alcalino-tolerantes como potencial fuente de enzimas de interés biotecnológico. Trabajo especial de grado. Universidad nacional de Quilmes. Disponible: <http://www.cindefi.com.ar> [Consulta: 2007, Enero 19]
 10. Suarez, Rafael (2005). Caña de azúcar y sostenibilidad: Enfoques y experiencias cubanas. Artículo del DESAL. Disponible: <http://www.laneta.apc.org>. [Consulta: 2007, Febrero 12]
 11. Ponce Noyola Teresa (2002). Celulasas y xilanasas en la industria Revista del departamento de biotecnología y bioingeniería del cinvestav. [Revista en línea]. Disponible: <http://www.cinvestav.mx>. [Consulta: 2007, Febrero 25]
 12. Ovando SL (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. Red de revistas ALyC. [Revista en línea]. Disponible: <http://redalyc.uaemex.mx>. [Consulta: 2007, Febrero 25]
 13. Números de la Enzyme Comission. Disponible: http://www.genome.jp/dbget-bin/get_htext?ECTable. [Consulta: 2007, Marzo 20]
-

-
14. Carrillo, F (2002). Caracterización estructural de fibras de lyocell y su comportamiento frente a procesos de degradación. Universidad politécnica de Cataluña. Disponible: http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UPC/AVAILABLE/TDX-0905102-142432//01PORTADA.pdf. [Consulta: 2007, Marzo 20]
 15. Mosier Nathan (2004). Features of promising Technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Revista Science Direct. [Revista en línea]. Disponible: <http://cobweb.ecn.purdue.edu/~lorre/16/publications/bioenergy/doc/v96p673-686y2005.pdf>. [Consulta: 2007, Febrero 27]
 16. Sánchez, Óscar Julián (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. Revista Interciencia. [Revista en línea]. Disponible: <http://www2.scielo.org.ve>. [Consulta: 2007, Marzo 3]
 17. Bailey, M. Método analítico de la celulosa. Enzyme development corporation. Disponible: <http://enzymedevelopment.com/es/pdf/Assays/xCELLULASESp.pdf> [Consulta: 2007, Junio 15].
 18. Tena Manuel, Jorrín Novo (2000). Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería. Departamento de bioquímica y biología molecular. Campus universitario de Rabanales, Córdoba. Disponible: <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/31%20INVERTASA%20ENSAYO.pdf>. [Consulta: 2007, Junio 16].
 19. Ferrer, J. Cinética de la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de azúcar. (2002). Facultad de Agronomía, Instituto de investigaciones agronómicas. Disponible: http://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/enero_marzo2002/ra1021.pdf. [Consulta: 2007, Junio 20].
 20. Wallas, Stanley (1990). Chemical process equipment selection and design. 1ra ed. USA: Butterworth-Heinemann. 755 P.
-

CAPITULO VIII

ANEXOS

ANEXO # 1. TABLAS DE RESULTADOS

A continuación se presentan las tablas con los resultados de todas las pruebas realizadas en el laboratorio:

- *Tablas de resultados de las pruebas cambiando la concentración de enzima:*

Los datos de esta tabla resultaron de realizar las pruebas experimentales con bagazo de caña molido hasta un tamaño de partícula de 40 Mesh, pretratado por medio del proceso de agua caliente a alta temperatura, y con una relación líquido/sólido de 80 ml/g.

- Concentración de enzima de 1,5 g/l:

Tabla # 23: Resultados de la prueba # 1 de laboratorio para una concentración de enzima de 1,5 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,338	2,931	-0,908	-24%
90	0,386	4,586	0,000	0%
150	0,388	4,655	0,000	0%
180	0,470	7,483	0,920	14%
240	0,404	5,207	-0,885	-15%
300	0,492	8,241	0,092	1%
1590	0,499	8,483	0,000	0%

Tabla # 24: Resultados de la prueba # 2 de laboratorio para una concentración de enzima de 1,5 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,384	4,517	0,678	18%
120	0,418	5,690	-0,069	-1%
180	0,436	6,310	-0,253	-4%
240	0,445	6,621	0,529	9%
300	0,466	7,345	-0,805	-10%
1500	0,505	8,690	0,345	4%
1680	0,453	6,897	-0,155	-2%

Tabla # 25: Resultados de la prueba # 3 de laboratorio para una concentración de enzima de 1,5 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,371	4,069	0,230	6%
120	0,422	5,828	0,069	1%
180	0,424	5,897	-0,667	-10%
240	0,440	6,448	0,356	6%
300	0,510	8,862	0,713	9%
1500	0,485	8,000	-0,345	-4%
1680	0,462	7,207	0,155	2%

Tabla # 26: Resultados promedios de las pruebas para una concentración de enzima de 1,5 g/l

Tiempo (min)	Media	Desviación Estándar
0	0,000	0,000
60	3,839	3,569
90	4,586	6,000
150	4,655	6,235
180	6,563	7,118
240	6,092	6,588
300	8,149	8,941
1500	8,345	7,676
1590	8,483	7,529
1680	7,052	6,941

- Concentración de enzima de 3 g/l:

Tabla # 27: Resultados de la prueba # 1 de laboratorio para una concentración de enzima de 3 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,938	23,621	-1,017	-4%
90	0,952	24,103	0,598	3%
180	1,075	28,345	1,207	4%
240	1,030	26,793	-0,121	0%
300	1,080	28,517	-1,078	-4%
1410	1,265	34,897	0,000	0%
1590	1,305	36,276	3,793	12%

Tabla # 28: Resultados de la prueba # 2 de laboratorio para una concentración de enzima de 3 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	1,026	26,655	2,017	8%
120	1,125	30,069	2,931	11%
150	1,044	27,276	0,362	1%
180	1,165	31,448	1,853	6%

Tabla # 29: Resultados de la prueba # 3 de laboratorio para una concentración de enzima de 3 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,998	25,690	1,052	4%
90	0,986	25,276	1,770	8%
120	0,992	25,483	-1,655	-6%
150	1,038	27,069	0,155	1%
180	1,135	30,414	0,819	3%
300	1,135	30,414	0,603	2%
1410	1,280	35,414	2,586	8%
1500	1,300	36,103	3,621	11%

Tabla # 30: Resultados de la prueba # 4 de laboratorio para una concentración de enzima de 3 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,908	22,586	-2,052	-8%
90	0,866	21,138	-2,368	-10%
120	0,968	24,655	-2,483	-9%
180	1,065	28,000	-1,595	-5%
300	1,100	29,207	-0,603	-2%
1500	0,980	25,069	-7,414	-23%

Tabla # 31: Resultados promedios de las pruebas para una concentración de enzima de 3 g/l

Tiempo (min)	Media	Desviación Estándar
0	0,000	0,000
60	24,638	1,864
90	23,506	2,133
120	27,138	2,513
180	29,595	1,614
240	34,897	0,890
300	29,810	0,853
1500	32,483	6,421

- Concentración de enzima de 6 g/l:

Tabla # 32: Resultados de la prueba # 1 de laboratorio para una concentración de enzima de 6 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,563	18,596	0,120	1%
90	0,583	19,264	-0,082	0%
180	0,743	24,796	0,104	0%
240	0,783	26,189	0,185	1%
300	0,859	28,789	0,544	2%
1590	0,882	29,593	0,577	2%

Tabla # 33: Resultados de la prueba # 2 de laboratorio para una concentración de enzima de 6 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,563	18,557	0,101	1%
90	0,589	19,496	0,150	1%
120	0,684	22,765	0,644	3%
180	0,743	24,791	0,102	0%
240	0,787	26,294	0,209	1%
300	0,846	28,356	0,111	0%
1590	0,873	29,287	0,271	1%

Tabla # 34: Resultados de la prueba # 3 de laboratorio para una concentración de enzima de 6 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,548	18,067	-0,409	2%
90	0,583	19,278	-0,068	0%
120	0,665	22,087	0,034	0%
180	0,731	24,386	0,303	1%
240	0,778	25,987	0,017	0%
300	0,824	27,590	0,655	2%
1590	0,871	29,198	0,182	1%

Tabla # 35: Resultados de la prueba # 4 de laboratorio para una concentración de enzima de 6 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,569	18,785	0,309	2%
120	0,669	22,248	0,127	1%
180	0,723	24,098	-0,591	2%
240	0,803	26,876	0,872	3%
1590	0,879	29,492	0,476	2%

Tabla # 36: Resultados de la prueba # 5 de laboratorio para una concentración de enzima de 6 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,556	18,355	0,121	1%
120	0,644	21,384	0,737	3%
180	0,760	25,377	0,688	3%
240	0,740	24,674	1,330	5%
1590	0,822	27,510	1,506	5%

Tabla # 37: Resultados promedios de las pruebas para una concentración de enzima de 6 g/l

Tiempo (min)	Media	Desviación Estándar
0	0,000	0,000
60	18,476	0,275
90	19,346	0,130
120	22,121	0,570
180	24,689	0,484
240	26,004	0,814
300	27,986	0,607
1500	28,245	0
1590	29,016	0,856

- Concentración de enzima de 12 g/l:

Tabla # 38: Resultados de la prueba # 1 de laboratorio para una concentración de enzima de 12 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	1,440	0,673	22,389	5%
180	1,720	0,822	27,518	1%
240	1,630	0,821	27,492	2%
300	1,800	0,894	30,002	1%

Tabla # 39: Resultados de la prueba # 2 de laboratorio para una concentración de enzima de 12 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,648	21,522	0,131	1%
90	0,720	23,989	0,648	3%
180	0,808	27,034	0,104	0%
240	0,795	26,587	0,327	1%
300	0,866	29,037	0,558	2%
1560	0,995	33,478	0,377	1%
1620	0,971	32,649	0,410	1%

Tabla # 40: Resultados de la prueba # 3 de laboratorio para una concentración de enzima de 12 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,626	20,765	0,626	3%
90	0,713	23,769	0,868	4%
180	0,796	26,633	0,505	2%
240	0,774	25,866	1,048	4%
300	0,854	28,635	0,96	3%
1560	0,958	32,198	-0,903	3%
1620	0,977	32,879	0,64	2%

Tabla # 41: Resultados de la prueba # 4 de laboratorio para una concentración de enzima de 12 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,660	21,936	0,545	3%
180	0,777	25,967	-1,171	4%
240	0,731	24,389	-2,525	9%
300	0,890	29,873	0,278	1%
1620	1,010	33,989	1,750	5%

Tabla # 42: Resultados de la prueba # 5 de laboratorio para una concentración de enzima de 12 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,614	20,343	-1,048	5%
120	0,706	23,506	0,000	0%
180	0,852	28,538	1,400	5%
240	0,901	30,236	3,322	12%
300	0,906	30,428	0,833	3%
1500	0,999	33,627	0,526	2%
1620	0,878	29,439	-2,800	9%

Tabla # 43: Resultados promedios de las pruebas para una concentración de enzima de 12 g/l

Tiempo (min)	Media	Desviación Estándar
0	0,000	0,000
60	21,391	0,837
90	24,637	0,156
120	23,506	0,000
180	27,138	0,967
240	26,914	2,177
300	29,595	0,737
1560	33,101	0,786
1620	32,239	1,956

- *Tablas de resultados de las pruebas cambiando el tamaño de partícula:*

Los datos de esta tabla resultaron de realizar las pruebas experimentales con bagazo de caña pretratado por medio del proceso de agua caliente a alta temperatura, con una relación líquido/sólido de 80 y con una concentración de enzima de 12 g/l.

- Tamaño de partícula de 20 Mesh:

Tabla # 44: Resultados de la prueba # 1 de laboratorio para un tamaño de partícula de 20 Mesh

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,679	22,588	0,260	1%
120	0,713	23,768	0,294	1%
180	0,749	24,991	0,412	2%
240	0,839	28,095	0,207	1%
300	0,900	30,201	0,477	2%
1500	0,913	30,650	0,372	1%
1680	0,952	31,992	0,371	1%

Tabla # 45: Resultados de la prueba # 2 de laboratorio para un tamaño de partícula de 20 Mesh

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,665	22,098	-0,230	1%
120	0,697	23,199	-0,275	1%
180	0,731	24,377	-0,202	1%
240	0,812	27,174	0,714	3%
300	0,874	29,307	0,447	2%
1500	0,893	29,971	0,307	1%
1680	0,929	31,218	0,403	1%

Tabla # 46: Resultados de la prueba # 3 de laboratorio para un tamaño de partícula de 20 Mesh

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,661	21,967	-0,361	2%
120	0,693	23,056	-0,418	2%
180	0,736	24,567	-0,012	0%
240	0,815	27,286	0,602	2%
1500	0,899	30,189	-0,089	0%
1620	0,939	31,548	0,073	0%

Tabla # 47: Resultados de la prueba # 4 de laboratorio para un tamaño de partícula de 20 Mesh

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,681	22,657	0,330	1%
120	0,716	23,874	0,399	2%
180	0,731	24,381	-0,198	1%
240	0,865	28,997	1,109	4%
1500	0,903	30,302	0,024	0%
1620	0,944	31,725	0,104	0%

Tabla # 48: Resultados promedios de las pruebas para un tamaño de partícula de 20 Mesh

Tiempo (min)	Media	Desviación Estándar
0	0,000	0,000
60	22,328	0,346
120	23,474	0,407
180	24,579	0,289
240	27,888	0,845
300	29,754	0,632
1620	30,278	0,284
1680	31,621	0,325

- Bagazo de caña sin moler:

Tabla # 49: Resultados de la prueba # 1 de laboratorio para bagazo sin moler

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,655	21,767	0,176	1%
120	0,668	22,218	0,380	2%
180	0,693	23,056	0,618	3%
240	0,772	25,789	0,169	1%
300	0,833	27,885	0,000	0%
1620	0,836	28,009	0,330	1%
1680	0,881	29,549	0,000	0%

Tabla # 50: Resultados de la prueba # 2 de laboratorio para bagazo sin moler

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,671	22,321	0,378	2%
120	0,685	22,785	0,187	1%
180	0,717	23,897	0,223	1%
240	0,781	26,099	0,141	1%
300	0,833	27,885	0,000	1%
1620	0,836	28,009	0,330	1%
1680	0,840	28,621	0,282	1%

Tabla # 51: Resultados de la prueba # 3 de laboratorio para bagazo sin moler

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,659	21,892	0,051	0%
120	0,675	22,459	0,139	1%
180	0,720	23,988	0,314	1%
240	0,774	25,870	0,088	0%
1500	0,836	28,009	0,330	1%
1620	0,839	28,089	0,250	1%

Tabla # 52: Resultados de la prueba # 4 de laboratorio para bagazo sin moler

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,656	21,792	0,151	1%
120	0,689	22,930	0,332	1%
180	0,713	23,755	0,081	0%
240	0,780	26,074	0,116	0%
1500	0,836	28,009	0,330	1%
1620	0,854	28,637	0,298	1%

Tabla # 53: Resultados promedios de las pruebas para bagazo de caña sin moler

Tiempo (min)	Media	Desviación Estándar
0	0,000	0,000
60	21,943	0,258
120	22,598	0,321
180	23,674	0,423
240	25,958	0,152
300	27,885	0,000
1620	28,334	0,337
1680	29,549	0,000

- *Tablas de Resultados de las pruebas cambiando la relación sólido / líquido:*

Los datos de esta tabla resultaron de realizar las pruebas experimentales con bagazo de caña molido hasta un tamaño de partícula de 40 Mesh, pretratado por medio del proceso LHWP y con una concentración de enzima de 12 g/l.

- Relación sólido/ líquido de 25 g/l:

Tabla # 54: Resultados de la prueba # 1 de laboratorio para una relación sol/liq de 25 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentracion (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0	0,000	0,000	0%
60	1,6	46,448	1,954	4%
120	1,66	48,517	0,805	2%
180	1,68	49,207	-0,805	-2%
240	1,74	51,276	-1,149	-2%
300	1,78	52,655	-0,460	-1%
1500	1,92	57,483	0,460	1%

Tabla # 55: Resultados de la prueba # 2 de laboratorio para una relación sol/liq de 25 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentracion (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0	0,000	0,000	0%
60	1,48	42,310	-2,184	-5%
120	1,68	49,207	1,494	3%
180	1,68	49,207	-0,805	-2%
240	1,74	51,276	-1,149	-2%
300	1,82	54,034	0,920	2%
1500	1,9	56,793	-0,230	0%

Tabla # 56: Resultados de la prueba # 3 de laboratorio para una relación sol/liq de 25 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentracion (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0	0,000	0,000	0%
60	1,55	44,724	0,230	1%
120	1,57	45,414	-2,299	-5%
180	1,75	51,621	1,609	3%
240	1,84	54,724	2,299	4%
300	1,78	52,655	-0,460	-1%
1500	1,9	56,793	-0,230	0%

Tabla # 57: Resultados promedios de las pruebas para una relación sol/liq de 25 g/l

Tiempo (min)	Media	Desviación Estándar
0	0,000	0,000
60	44,494	2,079
120	47,713	2,021
180	50,011	1,394
240	52,425	1,991
300	53,115	0,796
1500	57,023	0,398

- Relación sólido / líquido de 50 g/l:

Tabla # 58: Resultados de la prueba de laboratorio para una relación sol/liq de 50 g/l

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentracion (mMol)	Varianza
0	0	0,000	0,000
60	1,59	46,103	46,103
120	1,72	50,586	50,586
180	1,86	55,414	55,414
240	1,99	59,897	59,897
300	1,93	57,828	57,828
1560	1,94	58,172	58,172

- *Tablas de resultados de las pruebas utilizando bagazo de caña sin pretratamientos:*

Los datos de esta tabla resultaron de realizar las pruebas experimentales con bagazo de caña sin moler y sin pretratar, con una concentración de enzima de 12 g/l y una relación sólido / líquido de 12,5 g/l.

Tabla # 59: Resultados de la prueba # 1 para una muestra de bagazo de caña sin pretratar

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,682	22,679	0,212	1%
120	0,716	23,871	0,273	1%
180	0,743	24,786	0,519	2%
240	0,785	26,227	0,262	1%
300	0,853	28,588	0,249	1%
1500	0,877	29,422	0,326	1%
1620	0,894	29,997	0,299	1%
1680	0,908	30,474	0,082	0%

Tabla # 60: Resultados de la prueba # 2 para una muestra de bagazo de caña sin pretratar

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,667	22,178	-0,289	1%
120	0,696	23,188	0,410	2%
180	0,720	23,998	0,269	1%
240	0,782	26,155	0,334	1%
300	0,836	28,007	0,332	1%
1500	0,862	28,895	0,201	1%
1620	0,667	29,245	0,453	2%
1680	0,696	29,960	0,432	1%

Tabla # 61: Resultados de la prueba # 3 para una muestra de bagazo de caña sin pretratar

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,678	22,544	0,077	0%
120	0,712	23,735	0,137	1%
180	0,720	24,017	0,250	1%
240	0,809	27,085	0,596	2%
300	0,848	28,422	0,083	0%
1500	0,850	28,471	0,125	0%
1620	0,890	29,852	0,154	1%
1680	0,678	30,742	0,350	1%

Tabla # 62: Resultados de la prueba para una muestra de bagazo de caña sin pretratar

Tiempo (min)	Media	Desviación Estándar
0	0,000	0,000
60	22,467	0,259
120	23,598	0,362
180	24,267	0,450
240	26,489	0,517
300	28,339	0,299
1620	29,096	0,285
1680	30,392	0,397

- **Tablas de resultados de las pruebas utilizando papel reciclado:**

Los datos de estas tablas resultaron de realizar las pruebas experimentales con papel reciclado con una concentración de enzima de 12 g/l y una relación líquido/sólido de 80.

Tabla # 63: Resultados de la prueba # 1 de laboratorio para una muestra de papel reciclado

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	1,540	44,379	0,805	2%
120	1,610	46,793	0,230	0%
180	1,680	49,207	0,690	1%
240	1,720	50,586	0,920	2%
300	1,740	51,276	0,690	1%
1500	1,760	51,966	1,494	3%
1620	1,700	49,897	-0,920	-2%
1680	1,700	49,897	0,230	0%

Tabla # 64: Resultados de la prueba # 2 de laboratorio para una muestra de papel reciclado

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	1,500	43,000	-0,575	-1%
120	1,650	48,172	1,609	3%
180	1,660	48,517	0,000	0%
240	1,680	49,207	-0,460	-1%
300	1,700	49,897	-0,690	-1%
1500	1,650	48,172	-2,299	-5%
1620	1,700	49,897	-0,920	-2%
1680	1,680	49,207	-0,460	-1%

Tabla # 65: Resultados de la prueba # 3 de laboratorio para una muestra de papel reciclado

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	1,510	43,345	-0,230	-1%
120	1,550	44,724	-1,839	-4%
180	1,640	47,828	-0,690	-1%
240	1,680	49,207	-0,460	-1%
300	1,720	50,586	0,000	0%
1500	1,740	51,276	0,805	2%
1620	1,780	52,655	1,839	4%
1680	1,700	49,897	0,230	0%

Tabla # 66: Resultados de la prueba para una muestra de papel reciclado

Tiempo (min)	Media	Desviación Estándar
0	0,000	0,000
60	43,575	0,718
120	46,563	1,736
180	48,517	0,690
240	49,667	0,796
300	50,586	0,690
1500	50,471	2,021
1620	50,816	1,593
1680	49,667	0,398

- *Tabla de resultados de las pruebas de hidrólisis química del sustrato.*

Los datos de estas tablas resultaron de realizar las pruebas experimentales con bagazo de caña con una relación líquido/sólido de 80 y con una solución de ácido sulfúrico al 4%.

Tabla # 67: Resultados de la prueba # 1 de laboratorio para una hidrólisis química

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,776	18,034	0,713	4%
120	0,918	22,931	0,713	3%
180	1,039	27,103	0,920	4%
240	1,145	30,759	0,690	2%
300	1,520	31,000	0,713	2%

Tabla # 68: Resultados de la prueba # 2 de laboratorio para una hidrólisis química

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,748	17,069	-0,253	-1%
120	0,904	22,448	0,230	1%
180	1,014	26,241	0,057	0%
240	1,125	30,069	0,000	0%
300	1,130	30,241	-0,046	0%

Tabla # 69: Resultados de la prueba # 1 de laboratorio para una hidrólisis química

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mMol)	Varianza	% de Desviación
0	0,000	0,000	0,000	0%
60	0,742	16,862	-0,460	-3%
120	0,870	21,276	-0,943	-4%
180	0,984	25,207	-0,977	-4%
240	1,105	29,379	-0,690	-2%
300	1,112	29,621	-0,667	-2%

Tabla # 70: Resultados de la prueba para una hidrólisis química

Tiempo (min)	Media	Desviación Estándar
0	0,000	0,000
60	17,322	0,626
120	22,218	0,851
180	26,184	0,950
240	30,069	0,690
300	30,287	0,691

ANEXO # 2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

A continuación se describen los pasos a seguir para la preparación de las soluciones utilizadas para llevar a cabo las pruebas experimentales:

- **Acido Dinitrosalicílico:**

Para la preparación del ácido Dinitrosalicílico se necesitan los siguientes reactivos:

- Ácido 3,5 nitrosalicílico.
- Tartrato sódico potásico.
- Solución de hidróxido de sodio 2 M.
- Agua destilada

Disolver 0,1 g de ácido 3,5 nitrosalicílico y 30 g de tartrato sódico potásico en 20 ml de la solución de hidróxido de sodio. Diluir la solución hasta 100 ml con agua destilada y disolver los reactivos a temperatura moderada en una plancha con agitación magnética.

La solución se debe mantener refrigerada y se debe tener la precaución de guardarla en un frasco color ámbar o en un envase cubierto con papel de aluminio para protegerla de la luz.

- **Buffer Acetato:**

La solución amortiguadora acetato se prepara a partir de una solución de ácido cítrico y de una solución de citrato de sodio. Para ello se necesitan los siguientes reactivos:

-
- Ácido cítrico.
 - Citrato de Sodio
 - Agua destilada.

Para la preparación de la solución de ácido cítrico se disuelve 5,26 g de ácido cítrico en 500 ml de agua destilada. Para la solución de citrato, se disuelve 7,36 g de citrato de sodio en 500 ml de agua destilada.

Una vez que se tienen las dos soluciones, se añade tanta cantidad de ácido cítrico a la solución de citrato de sodio hasta lograr un pH de 5.

- ***Solución de Glucosa de 40 mMol:***

Debido a que la curva de calibración se realizará con soluciones de glucosa de concentración conocida en buffer acetato, se disuelve 0,792 g de glucosa en 100 ml de solución de buffer.

A partir de ésta solución de 40 mMol es que se prepararán las soluciones de concentración conocida de glucosa.

ANEXO # 3. CULTIVO DE HONGOS

A continuación se dan las bases para la realización de las pruebas utilizando hongos celulolíticos:

- ***Cultivo de Crecimiento Czapek:***

Este es un medio líquido casi neutral en la reacción, preparado de material de composición química conocida y con el fin de cultivar hongos y bacterias capaces de utilizar nitrógeno inorgánico.

En el medio de cultivo Czapek se tiene la fuente de nitrógeno y de carbono que necesitan los hongos para su crecimiento. Este es una modificación de la fórmula de Czapek de Dox preparada de acuerdo a la fórmula dada por Tom y Raper.

Los medios preparados con fuentes de nitrógeno solo orgánicas y de composiciones químicas definidas como fuentes de nitrógeno son útiles para una variedad de procedimientos microbiológicos.

Ellos son de principal importancia en la microbiología para el enriquecimiento, cultivo e identificación de bacterias y hongos, o para pruebas de resistencia de moho, también para otras pruebas debido a que se desean medios simples y químicamente definidos.

El medio de cultivo Czapek da el soporte a un crecimiento moderado de casi todas las cepas de *Aspergillus*.

Las sustancias químicas para la preparación del medio son las siguientes:

-
- Sacarosa 30 g.
 - Nitrato de Sodio 3g.
 - Fosfato Dipotásico 1 g.
 - Sulfato de Magnesio 0,5 g
 - Cloruro de Potasio 0,5 g.
 - Sulfato Ferroso 0,01 g.

Para la preparación de éste medio se disuelven todos los reactivos mencionados en 1 l de agua destilada. En el caso de que se quiera estudiar la hidrólisis de residuos lignocelulósicos, se añade a la solución el sustrato deseado y se evita la adición de la sacarosa con el fin de que el hongo hidrolice al sustrato para la producción de azúcares.

Luego, la solución resultante se distribuye en erlenmeyers y se esterilizan en un autoclave durante 15 minutos a 15 lb de presión (121 °C).

- ***Preparación de la solución con el Hongo:***

Una vez que se realizó la esterilización del medio de cultivo, se lleva a cabo el proceso de preparación del hongo en el medio. Para ello, el hongo inoculado es lavado con una solución de tween, para luego añadir dicha solución en el medio Czapek anteriormente preparado y esterilizado. Este procedimiento se realiza dentro de una campa de flujo laminar con el fin de evitar la contaminación de la solución.

- ***Proceso de Hidrólisis Con la Utilización de Hongos:***

Si se decidió utilizar un sustrato lignocelulósico en lugar de la sacarosa con el fin de realizar el proceso de hidrólisis, se coloca la solución de hongo con el sustrato en

un shaker con regulador de temperatura con el fin de mantener las condiciones de agitación y de temperatura en los valores óptimos.

Cada cierto tiempo, se toma una cantidad de la muestra de estudio y se le aplica el método del ácido dinitrosalicílico con el fin de realizar el seguimiento de la reacción de hidrólisis por medio de la medición de la cantidad de azúcares reductores que se producen con el tiempo.

Para la toma de las muestras, se lleva la solución de estudio a la campana de flujo laminar con un mechero encendido para evitar la contaminación de la solución. Una vez dentro de la campana se toma una pequeña cantidad de la solución por medio de una jeringa esterilizada y se filtra la misma con un milipore.

ANEXO # 4. CÁLCULOS TIPO DEL RENDIMIENTO DEL PROCESO

El rendimiento para una solución con una concentración de 57,023 mMol/l de azúcares fermentables que se obtuvieron a partir de una muestra de 0,5 g de bagazo de caña, se calcula a partir del siguiente procedimiento:

Suponiendo que el bagazo de caña tiene un 50 % de celulosa, se tiene que para una muestra de 0,5 g de bagazo se tiene 0,25 g de celulosa.

Si se convirtiera el 100% de la celulosa contenida en esta muestra, se obtiene 0,25 g de glucosa.

Se procede a convertir la concentración molar obtenida de manera experimental por medio de la siguiente ecuación:

$$m = (\text{mMol} \times \text{PM} \times 0,02) / 1000 =$$

$$m = (57,023 \text{ mMol/l} \times 180 \text{ g/mol} \times 0,02 \text{ l}) / 1000 \text{ mMol/Mol} = 0,205 \text{ g}$$

Si 0,25 g es la máxima cantidad de glucosa que se puede producir entonces:

$$\text{Rendimiento} = (0,205 \times 100) / 0,25 = 82 \%$$

ANEXO # 5. CÁLCULOS TIPO DE LAS DIMENSIONES DEL REACTOR

Las constantes de éste proceso son las siguientes:

Tabla # 71: Constantes del software.

CONSTANTES		
PM Glucosa =	180	g/mol
ρ Glucosa =	1,54	kg/l
ρ Bagazo =	1,3	kg/l
Rendimiento de Bagazo \rightarrow Glucosa =	2,616	kg B/ kg G
Concentracion de Bagazo =	0,025	kg B/l Buffer
Factor de Sobrediseño =	20	%
Relación H/D =	2,9999883	

A partir de los datos ingresados por el usuario, se obtienen las siguientes dimensiones del reactor:

Tabla # 72: Datos ingresados por el usuario.

Datos de Entrada	
Cantidad de Azucares Reductores que se Desean Producir	
200	Kg/h
Diámetro del reactor(Dr)	
3,79	m
Tiempo de reacción (t)	
2,00	h

Masa de glucosa por carga = cantidad de glucosa que se desea producir x tiempo =
= 200 kg/h x 2h = 400 kg

Masa de bagazo necesaria = masa de glucosa por carga x rendimiento =
= 400 kg glucosa x 2,616 kg bagazo/kg glucosa = 1046,24 kg

Volumen del bagazo = $m/\rho = 1046,24 \text{ kg} / 1,3 \text{ kg/l} = 804,8 \text{ l}$

Volumen Buffer = masa de bagazo / concentración de bagazo =
= $1046,24 \text{ kg} / 0,025 = 41840 \text{ l}$

Volumen total = masa de bagazo + masa de buffer =
= $(804,8 \text{ l} + 41840 \text{ l})/1000 = 42,65 \text{ m}^3$

Volumen del reactor con un 20% de sobrediseño = $V_{\text{total}} * 1,2$
= $42,65 \text{ m}^3 * 1,2 = 51,19 \text{ m}^3$

Altura del líquido = $H_l = (4xV)/(\pi x D^2) = (4x42,65 \text{ m}^3)/(\pi x 2,79^2) = 6,97 \text{ m}$

Altura del reactor = $H_r = (4xV)/(\pi x D^2) = (4x51,19 \text{ m}^3)/(\pi x 2,79^2) = 8,37 \text{ m}$

Ancho de los deflectores = $W_b = 1/12 D_r = 2,79 \text{ m} / 12 = 0,233 \text{ m}$

Diámetro del impulsor = $d_i = D_r x 0,6 = 2,79 \text{ m} x 0,6 = 1,674 \text{ m}$

Longitud del deflector = $L_d = (4xV)/(\pi x D^2) - (d_i/2)$
= $(4x42,65 \text{ m}^3)/(\pi x 2,79^2) - (1,674/2) = 6,139 \text{ m}$

Localización del impulsor # 1 = $h_1 = 1/3 d_i = 1,674 \text{ m} / 3 = 0,558 \text{ m}$

Localización del impulsor # 2 = $h_2 = h_1 + h_l/3 = 0,558 + 6,79 \text{ m} / 3 = 3 \text{ m}$

Localización del impulsor # 3 = $h_3 = h_2 + h_l/3 = 0,3 + 6,79 \text{ m} / 3 = 5 \text{ m}$