Producción de glucosa a partir de celulosa mediante hidrólisis ácida y enzimática"

Christian Campos C., Roberto Melo S.

Laboratorio de Productos Forestales, Departamento de Ingeniería Química,
Facultad de Ingeniería, Universidad de Concepción
Casilla 160 C Correo 3, Concepción

RESUMEN

En este estudio se analizaron las variables más influyentes en el proceso de degradación de celulosa, mediante una hidrólisis ácida, seguida de una hidrólisis enzimática, para la producción de glucosa.

Como materia prima se utilizó celulosa deslignificada de kappa 9.5, la que presenta un alto grado de pureza. Se utilizó esta materia prima, debido a que, al no interferir otros componentes de la madera, permite estudiar realmente los principales efectos que producen las variables involucradas en el proceso de hidrólisis sobre la celulosa.

La hidrólisis ácida fue realizada con ácido sulfúrico concentrado (72 % w/v), y los efectos de la temperatura (25-40 °C), razón ácido/sustrato (2-5 ml H_2SO_4 por g^{-1} de celulosa) y tiempo (0-240 min), en el rendimiento de solubilización de celulosa y en la producción de glucosa fueron analizados.

La hidrólisis enzimática se efectuó, con el sustrato proveniente de la hidrólisis ácida anterior, utilizando un complejo enzimático compuesto por enzimas provenientes de los hongos T. Viride y A.Níger. Las condiciones de operación fueron tiempo de reacción 48 h, consistencia 2 % (g sustrato/ml solución) y actividad enzimática 0.3 FPU/ml. Las respuestas analizadas fueron rendimiento de solubilización de celulosa, la producción de glucosa y el rendimiento global en función de las variables involucradas en el proceso.

Los mejores resultados en la producción de glucosa, fueron obtenidos por más de una condición de las variables en el rango estudiado, por lo que el proceso presenta más de una condición óptima. El tratamiento ácido hizo aumentar al doble el rendimiento en la producción de glucosa de la hidrólisis enzimática, lo que demuestra los beneficios de la aplicación de las hidrólisis consecutivas. La solubilización de la celulosa alcanzó un 83 % de rendimiento, lo que demuestra, que no existe una degradación completa de la celulosa. Además los resultados obtenidos experimentalmente en la solubilización de celulosa, muestran que la producción de azúcares reductores hasta la fase de estabilización, pueden ser aproximados a una cinética de orden cero.

De lo expuesto anteriormente se concluye que es factible la realización de una hidrólisis ácida previa a una hidrólisis enzimática, para la obtención de altos rendimientos en la transformación de glucosa a partir de celulosa.

1 INTRODUCCION

La celulosa, el principal componente de la pared celular de las plantas, es él más abundante polisacárido en la naturaleza y ya que es renovable, es por lo tanto un recurso inagotable de biomasa. Por lo tanto, la habilidad de manipular este químico orgánico tiene implicaciones sumamente importantes. Durante los últimos años se ha realizado una gran cantidad de investigación dedicado a la transformación de celulosa en glucosa, esto debido a que hoy en día, las sociedades industriales dependen, casi enteramente, de productos petroquímicos derivados de hidrocarburos fósiles, líquidos y gaseosos, como materias primas para la producción de fibras, plásticos, cauchos, adhesivos, etc. A medida que el petróleo y el gas natural van escaseando y siendo más caros, es evidente que otras fuentes de carbono, tales como el carbón de leña o la madera, pueden empezar a utilizarse como materias primas alternativas. Si bien la transformación de la madera en productos químicos es teórica y tecnológicamente factible, ello no implica que la madera se vaya a utilizar inevitablemente para estos fines.

La transformación de la celulosa en glucosa es el primer paso en la utilización química en gran escala de la celulosa. La fermentación de la glucosa para obtener etanol mediante técnicas industriales acreditadas de alto rendimiento ofrece grandes perspectivas. La obtención de glucosa a partir de materiales lignocelulósicos, se basa en la hidrólisis de estos, en las últimas décadas los métodos para convertir celulosa a glucosa a captado la atención de muchos investigadores. Generalmente los estudios estuvieron enfocados a estudiar hidrólisis química versus enzimática o vise-versa, solo hace pocos años se ha estudiado la unión de estos dos métodos.

La hidrólisis enzimática se lleva a cabo con la ayuda de enzimas obtenidos de microorganismos, dependiendo las condiciones óptimas del proceso de la naturaleza del organismo productor de enzimas, y sus rendimientos del pretratamiento efectuado y del sustrato empleado. La especie más estudiada en la producción de celulasa es *Trichoderma viride*, debido a la alta actividad y eficiencia de sus enzimas en la degradación de celulosa cristalina, y en la producción de celobiasa el más utilizado es *Aspergillus niger*.

La hidrólisis química de la celulosa se efectúa preferentemente con los ácidos clorhídrico y sulfúrico (hidrólisis ácida) o con una base fuerte (hidrólisis alcalina). Los tratamientos con ácidos diluidos (generalmente HCl y H_2SO_4), a bajas temperaturas alteran la estructura cristalina de la celulosa, haciendo el sustrato más "esponjoso" (hinchamiento), lo que facilita la penetración de moléculas de agua en los cristales de celulosa, además incrementa superficie especifica. Sin embargo un aumento en la concentración del ácido, provoca una individualización de la molécula de celulosa, seguido de un rompimiento de esas moléculas, entregando sustratos con un bajo grado de polimerización [25]. Estas razones, acompañadas del decaimiento de la cristalinidad, tamaño de partícula y el incremento del área superficial disponible, hacen que la celulosa a se presente mucho más accesible a un ataque enzimático.

Por esto un tratamiento con ácido puede tener una doble intención, como preparación para una posterior hidrólisis enzimática, o como un tratamiento para la producción de azúcar fermentable.

La utilización de ácidos concentrados tiene como ventaja, ser mucho mas barato que las enzimas, la reacción puede proceder a moderadas presiones y temperaturas, lo que no es posible al utilizar ácidos diluidos y altas temperaturas, condiciones que aumentan el costo de los equipos, incrementan la corrosión y lleva que el proceso no sea altamente selectivo. La hidrólisis ácida con ácido diluido a elevadas temperaturas produce la descomposición de parte de la glucosa formada, que se convierte en hidroximetilfurfurol (Harris, 1975), lo que limita al 50% aproximadamente el rendimiento neto de azúcar. [16].

Aunque en este caso la reacción es mucho más rápida que en la hidrólisis enzimática, puede provocar la formación de productos laterales, degradación de los azúcares producidos y la posibilidad de problemas de corrosión.

La utilización por separado de estos métodos para producir la hidrólisis de la celulosa, no tiene un alto rendimiento en la degradación de esta última, ya que ninguno de los dos métodos puede producir el rompimiento completo de la súper estructura que conforma la celulosa. Por esto se busca la complementación de los métodos de hidrólisis con la finalidad de aumentar la eficiencia del proceso.

La lignina y las hemicelulosas contenidos en los materiales lignocelulosicos, representan una barrera física al ataque enzimático, ya que dificultan el acceso de las enzimas a la celulosa y disminuyen el área de contacto enzima-sustrato. Por esto tratamientos para remover la lignina y degradar las hemicelulosas son necesarios para incrementar el rendimiento y aumentar la velocidad de reacción.

Este estudio al ser de carácter preliminar utiliza como sustrato celulosa deslignificada, por lo que se trataría de celulosa casi pura, con la finalidad de obtener información acerca de los efectos que producen las principales variables involucradas, sobre el rendimiento de glucosa, al someter celulosa a una hidrólisis ácida, con ácido sulfúrico concentrado y a baja temperatura, como tratamiento para entregar un sustrato altamente accesible a una posterior hidrólisis enzimática. Este estudio trata también los efectos que se producen sobre la estructura amorfa y cristalina de la celulosa al someterla a los procesos de hidrólisis. Estas etapas presentan considerables posibilidades en su realización, por lo que son analizadas en forma preliminar en el presente trabajo.

2 MATERIALES Y METODOS.

2.1 MATERIA PRIMA.

Se utilizara pulpa de eucalipto globulus, producida por cocción y deslignificada con oxigeno de la planta Santa Fe. Esta pulpa fue lavada, eliminando los reactivos utilizados en los tratamientos de cocción y deslignificación, como también las impurezas que pudiera haber contenido. Luego esta celulosa fue acondicionada a humedad ambiente durante 5 días y almacenada refrigerada en bolsas de nylon. Este sustrato presenta bajo contenido de lignina y hemicelulosas, por lo que se considera celulosa casi pura. Lo anterior es de gran importancia, ya que los resultados obtenidos no son interferidos por la presencia de otros compuestos. Se eligió esta especie debido a que este tipo de madera tiene alta sensibilidad a los agentes de hinchamientos y menor tamaño de fibra, lo que potencialmente mejoraría un ataque ácido y enzimático al aumentar el área especifica.

La hidrólisis ácida fue realizada con ácido sulfúrico concentrado (72 % w/v), y los efectos de la temperatura (25-40 °C), razón ácido/sustrato (2-5 ml H_2SO_4 por g^{-1} de celulosa) y tiempo (0-240 min), en el rendimiento de solubilización de celulosa y en la producción de glucosa fueron analizados.

La hidrólisis enzimática se efectuó, con el sustrato proveniente de la hidrólisis ácida anterior, utilizando un complejo enzimático compuesto por enzimas provenientes de los hongos *T. Viride y A.Níger.* Las condiciones de operación fueron tiempo de reacción 48 h, consistencia 2 % (g sustrato/ml solución), pH 4,8 y actividad enzimática 0.3 FPU/ml. Las respuestas analizadas fueron rendimiento de solubilización de celulosa, la producción de glucosa y el rendimiento global en función de las variables involucradas en el proceso.

2.2 TRABAJO EXPERIMENTAL.

Obtenida la celulosa, esta fue lavada, con el objetivo de limpiar la pulpa de los reactivos utilizados en la etapa de cocción y deslignificacion con oxigeno. Luego se procedió a "peletizar" la pulpa, procedimiento que persigue obtener pequeñas agrupaciones de fibras con tamaños no superiores a los 5 mm de diámetro. Una vez obtenidos los "pellets" se clasificaron por tamaño y el rechazo, superior a 5 mm, se volvió a "peletizar". Se homogeneizaron y se tomaron muestras para la medición de propiedades. Finalmente, se envasa la pulpa en bolsas de 300gr, en base seca, las que se mantuvieron refrigerados a 5°C.

Para caracterizar la celulosa, antes de ser tratada, durante el tratamiento y posterior a este, se realizaron una serie de análisis, los análisis realizados fueron el Indice Kappa, Viscosidad, Humedad, α, β, y γ celulosa.

El ácido utilizado es ácido sulfúrico (H_2SO_4) en una concentración de 72 % (w/v), (15.7N). Debido al agua presente en la celulosa y a las distintas razones ácido madera (RAM) a las que se trabajo, hubo que diluir ácido sulfúrico (H_2SO_4) 98 %(v/v), (36N), hasta la concentración determinada para la experimentación.

Fue necesario calibrar las enzimas, para encontrar la actividad enzimática del complejo multienzimático utilizado. Las enzimas son generalmente caracterizadas por la cantidad de reacción que pueden catalizar en un lapso de tiempo, el cual es denominado una unidad de actividad. Una unidad de la actividad enzimática es definida como la reacción de una cantidad de sustrato por unidad de tiempo o la producción de una cantidad especifica de un producto por unidad de tiempo bajo condiciones definidas de reacción. Por ejemplo, una *unidad de papel filtro* (FPU), es definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 2.0 mg de azucares reductores expresados como glucosa desde 50 mg de papel filtro (4% de conversión) en 60 minutos de reacción.

La determinación se realizo midiendo los azúcares reductores utilizando el método *DNS de Miller.*.[34], liberados desde un gramo de papel filtro puesto en contacto con la solución enzimática durante 1 hora, bajo las condiciones de temperatura y pH correspondientes.

El trabajo experimental para todas las experiencias, tuvo la siguiente secuencia, para realizar la hidrólisis ácida, se midió la humedad de la celulosa, para así calcular 3 gr de celulosa (bps), para luego agregarlo a un matraz Erlenmeyer, de 50 ml y luego llevardo a un baño termostático. La temperatura de la reacción fue variada en el rango de 25 °C hasta 40 °C, específicamente las temperaturas estudiadas fueron 25, 28, 33, 37 y 40 °C. Luego se agrega la solución de ácido sulfúrico, Considerando la razón ácido madera para cada experimento la cual se varió entre 2 y 5 ml H_2SO_4 por g^{-1} de celulosa, previo alcance de la temperatura de trabajo, las razones de ácido celulosa utilizadas fueron 2, 2.6,3.5, 4.4 y 5 ml H_2SO_4 por g^{-1} de celulosa. La solución fue agitada dentro del baño termostático, hasta alcanzar el tiempo de reacción para cada experimento, los tiempos de reacción utilizados en este estudio fueron, 20, 40, 70, 100,150 y 240 min. Las reacciones fueron detenidas por neutralización del ácido, con una solución de hidróxido de sodio (Na0H) en un baño termostático a 0°C, hasta alcanzar pH 7, con el fin de evitar la degradación de los azucares. La suspensión resultante, se lavo con agua destilada y se separó por filtración al vacío, usando para ello un filtro de vidrio poroso, se midió el volumen final del filtrado y se agitó por 15 minutos. De la solución filtrada se toma una alícuota de 15 ml, para luego medir la concentración de glucosa y azucares reductores, usando el método de *oxidación de glucosa de Werner* y *DNS método de miller*".[34], respectivamente.

El sustrato resultante de la filtración es dejado al ambiente por 3 días y luego se mide humedad, peso, viscosidad y α, β, y γ celulosa, para luego servir de materia prima en la hidrólisis enzimática.

Para realizar la hidrólisis enzimática, se utilizó el sustrato no filtrado, proveniente de la etapa ácida, conocido el peso y la humedad, se desmenuza con el fin de aumentar el área de contacto con las enzimas, se agrega a un matraz erlenmeyer, de 250 ml. Luego se prepara una solución tampón de citrato de sodio 50 mM (PH 4,8), hasta alcanzar 2% de consistencia para cada ensayo incluida el agua contenida en la celulosa, con la concentración de la solución enzimática requerida para obtener los niveles de actividad decidida. Luego la solución preparada previamente es agregada al matraz erlenmeyer donde se incuba la mezcla a 50 C, con una agitación de 200 rpm, durante 48 horas.

Al finalizar la hidrólisis se filtro la solución producto, en un equipo a vacío. A continuación, se medió el volumen final de la solución filtrada, la humedad, el peso y la concentración de glucosa en la muestra, mediante los métodos de Werner y miller. [34].

3 RESULTADOS Y DISCUSIONES.

3.1 Caracterización de las materias primas.

La tabla 5.1 muestra los resultados obtenidos de las propiedades medidas a la celulosa antes de someterla a hidrólisis. Con las propiedades medidas e indicadas en la tabla 5.3, se puede caracterizar en forma indirecta, otras propiedades de la celulosa utilizada como materia prima. La celulosa presenta como característica, 1.4 % de lignina, grado de polimerización de 4200, celulosa de alto peso molecular, no degradada 87.68 % y porcentaje de hemicelulosas 5.54 %.

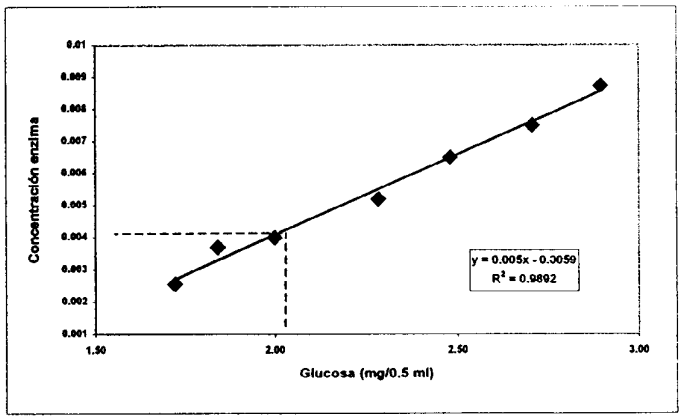
Propiedad	Valor
Índice Kappa	9.5
Viscosidad	1108 (dm^3/kg)
Humedad	8.2 %
α celulosa	87.68 %
β Celulosa	6.78 %
γ celulosa	5.54 %

Tabla 3.1 Caracterización de la celulosa.

3.2 Calibración de la Enzima.

3.2.1 Actividad Enzimática.

La medida de actividad enzimática utilizada, esta dada en términos de "unidades de papel filtro" (FPU), recomendado por la comisión de biotecnología (IUPAC), en la utilización de celulasas. La determinación de la concentración de enzima con la cual son liberados exactamente 2.0 mg de glucosa desde 50 mg de papel filtro es mostrada en la figura 3.1.



De la figura 3.1 se puede observar que la concentración de enzima necesaria para liberar 2.0 mg de glucosa es de 0.004 (ml enzima/ml solución). El valor de la actividad enzimática obtenida para las enzimas fue de 93 FPU/ml, muy cercana a los 100 FPU/ml medidas en las mismas condiciones por otros laboratorios para el mismo tipo de enzima.

Figura 3.1.Concentración de enzima vs. Concentración de glucosa

3.2.2 Condiciones de operación de la enzima

Con el fin de determinar las mejores condiciones de operación de la enzima, se realizaron con una misma solución enzimática replicas de la medición de glucosa liberada al ponerla en contacto con una muestra equivalente de papel filtro variando la temperatura y el pH de la solución tampón utilizado. En la figura 3.2, Se observa que en cada nivel de pH, los resultados más altos de glucosa liberada, se obtienen

a la temperatura de 50 °C, por lo que se espera que el valor óptimo de acción de las celulasas este muy cercano a esta temperatura. El comportamiento del potencial catalítico frente a una variación del pH se observa algo similar, las máximas actividades fueron medidas para todos los niveles de temperatura a pH 4,8. El ensayo realizado a pH 4,8 y 50 °C la cantidad de glucosa liberada fue 10.98 (mg/ml). Estos niveles fueron los elegidos para efectuar los experimentos.

Utilizando los niveles elegidos, se realizaron ensayos para determinar la actividad enzimática óptima de las enzimas a utilizar. El sustrato utilizado para estos experimentos fue 3 gramos (bps) de celulosa lavada y peletizada. Los resultados de los ensayos se muestran en la figura 3.3.

De la figura 3.3 se puede observar la influencia de la actividad enzimática en el rendimiento de producción de azúcares reductores, donde el rendimiento máximo alcanzado se obtiene para actividad 0.3 FPU/ml. Se observa también que a actividades enzimática mayores a 0.25 FPU/ml, los rendimientos alcanzados son similares dentro del rango estudiado.

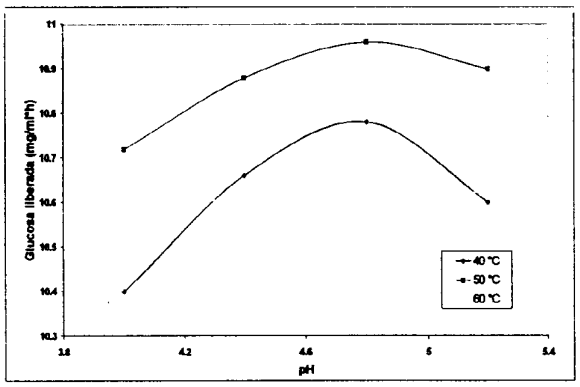


Figura 3.2. Efecto del pH en la liberación de glucosa.

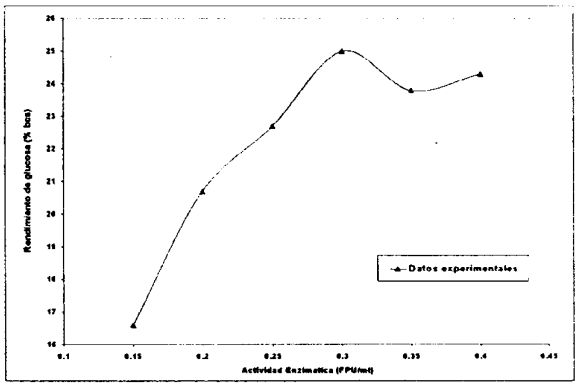


Fig 3.3. Influencia de la actividad enzimática en el rendimiento de la hidrólisis (T=°50C, pH=4.8, consistencia 2%, tiempo = 48 hr).

Para observar si el complejo enzimático utilizado era inhibido por el sustrato o por el producto final, fueron hechos dos ensayos con las condiciones de operación de las enzimas en sus niveles óptimos. Estos ensayos consistieron en seguir el transcurso de la reacción hasta observar un periodo constante, para luego agregar sustrato fresco a la solución. Los resultados se muestran en la figura 3.4.

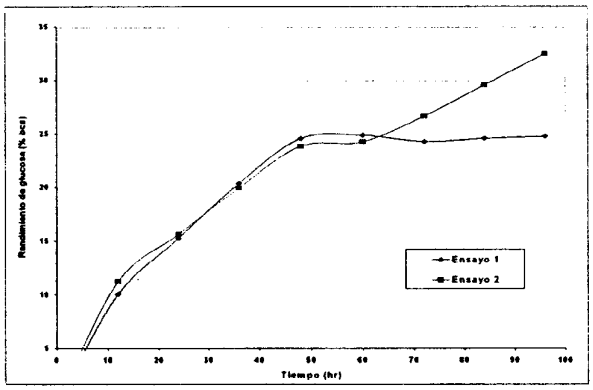


Figura 3.4. Variación del rendimiento de glucosa en el transcurso del tiempo. (T 50C, pH 4.8, consistencia 2%, FPU 0.3).

De la fig. (3.4). Se puede intuir que se presenta inhibición por sustrato o por producto final, debido a que al agregar celulosa al sistema cuando ya no existía producción de glucosa, se observó un aumento en la producción de esta última. Lo anterior demuestra que todavía existían enzimas activas en la solución.

3.3 Solubilización de celulosa.

3.3.1 Hidrólisis ácida.

En las figuras 3.5, 3.6, 3.7, presentan el rendimiento de azucares reductores solubles a distintos tiempos de hidrólisis. En la mayoría de estas curvas, se identifican dos periodos claramente diferenciados: el primero (fase de disolución), en el cual la razón de producción de azucares reductores es constante y aparentemente no dependen de la cantidad de sustrato no disuelto; una segunda fase (fase estabilización), en la cual la velocidad decrece abruptamente, llegando a cero e incluso en algunos casos es negativa, debido a la posible reacción de degradación de los azucares solubilizados.

Se observa en las figuras 3.5, 3.6, que a medida que aumenta la temperatura, la velocidad de la reacción de producción de azucares reductores aumenta, alcanzando un valor máximo de 54,2 % de rendimiento. Se observa también que para todos los casos los máximos rendimientos estuvieron muy cercanos a este valor, por lo que la temperatura no influye en el rendimiento sino que en el tiempo que se necesita para alcanzarlo. De estas figuras se puede ver un comportamiento similar en la producción de azúcares reductores a distintas razones ácido/ madera, al variar el tiempo de reacción.

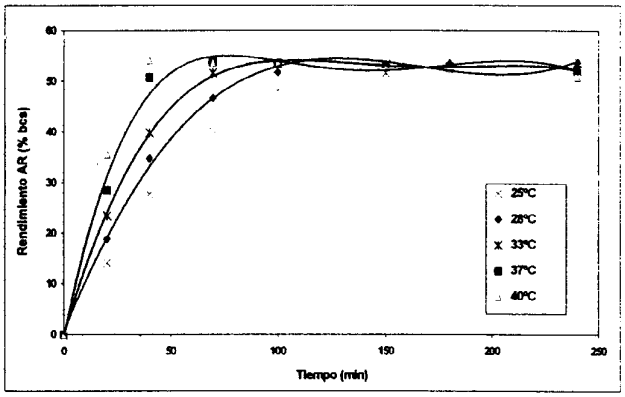


Fig 3.5. Influencia de la temperatura en la disolución de celulosa (RAM =4.4 ml/gr celulosa).

La escasa solubilización obtenida para la razón ácido madera 2 ml/gr (fig 3.7), aparentemente se puede deber a que no se formo una solución homogénea entre el ácido y la celulosa, por lo que se logro una escasa agitación. En la figura 3.7, se observa también, que el rendimiento en la producción de azucares reductores permanece casi sin variación en las razones de ácido/celulosa mas altas, pero sufre un drástico decaimiento en las razones mas bajas, encontrándose un óptimo a razón ácido/celulosa 4.4 y 40 °C.

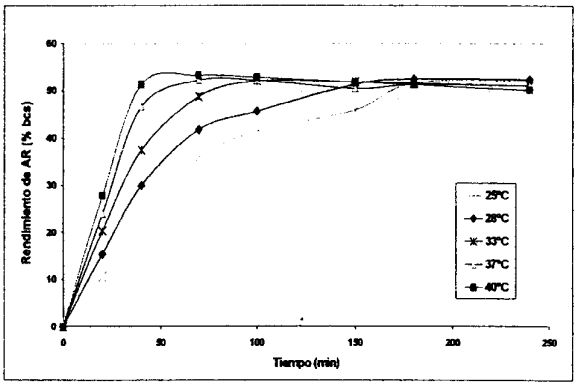


Fig 3.6. Influencia de la temperatura en la disolución de celulosa (RAM =3,5 ml/gr celulosa)

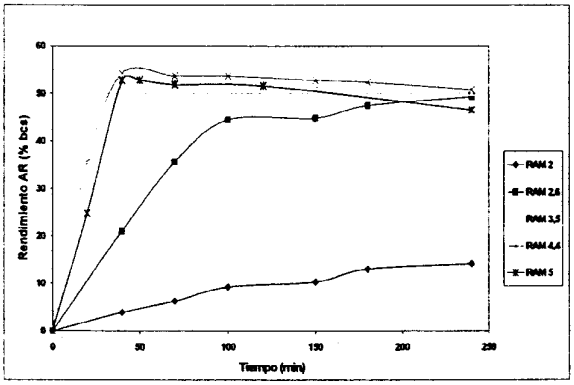


Fig 3.7. Influencia de la relación ácido/sustrato en la disolución de celulosa (T= 40 °C).

3.3.2 Hidrólisis enzimática.

La hidrólisis enzimática fue realizada bajo un tiempo de reacción de 48 horas y actividad enzimática de 0.3 FPU/ml y una consistencia de 2 %. En las figuras 3.8 y 3.9, presentan el rendimiento de azucares reductores solubles a distintos tiempos y temperaturas, variando las razones de acido/celulosa, para las hidrólisis ácida y enzimática. En la mayoría de estas curvas, se observa que el rango de resultados es muy estrecho en el rendimiento de la hidrólisis enzimática, esta alcanza un valor casi constante y no se ve influenciada por las condiciones de la hidrólisis ácida anterior.

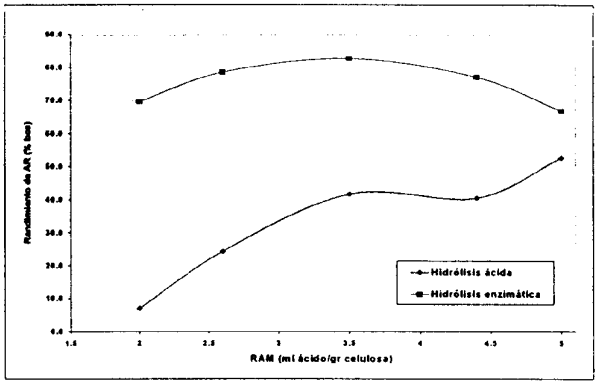


Fig. 3.8. Influencia de la RAM en las hidrólisis ácida y enzimática. (T=28°C y t = 70 min).

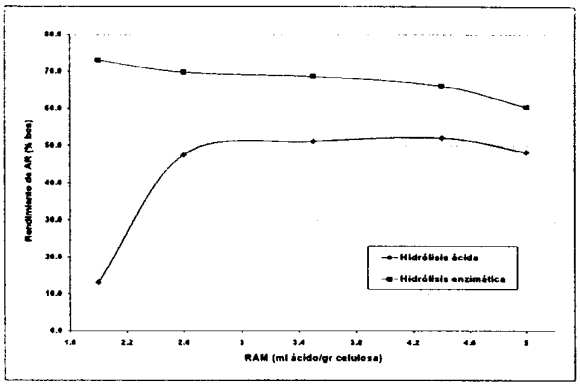


Fig. 3.9. Influencia de la RAM en las hidrólisis ácida y enzimática. (T=33 °C y t = 240 min).

En las figuras 3.10 y 3.11, se presentan el rendimiento de azúcares reductores solubles a distintas razones de ácido celulosa, variando tiempo y temperatura, para la hidrólisis ácida y enzimática. En la mayoría de estas curvas, como en el caso anterior, se observa que el rango de resultados es muy estrecho en el rendimiento de la hidrólisis enzimática, esta alcanza un valor casi constante y no se ve influenciada por las condiciones de la hidrólisis ácida anterior. El rango de resultados de la conversión de polisacáridos no es muy amplio, se obtuvieron valores entre 0.59 – 0.84 gr hidrolizazdo/gr de celulosa cargada al proceso. La máxima conversión se alcanza cuando las condiciones de operación fueron RAM = 4.4, T = 28 °C, tiempo =70 min. Pero los resultados muestran valores similares en otras condiciones de operación, esto significa que las variables de la hidrólisis ácida tienen un limitado efecto sobre la respuesta.

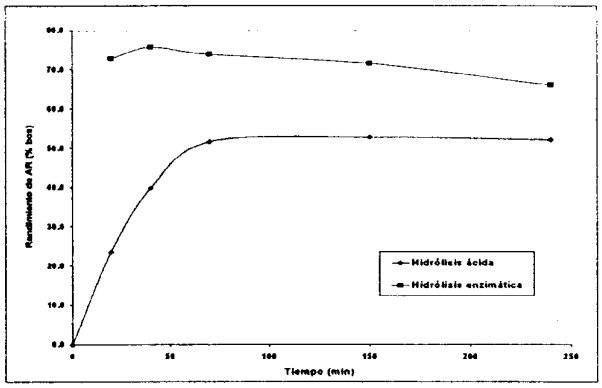


Fig. 3.10. Influencia del tiempo en las hidrólisis ácida y enzimática. (T=33 °C y RAM = 4.4 ml ác/gr celulosa).

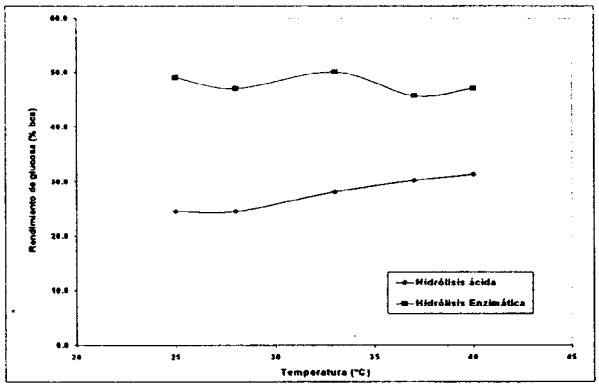


Fig. 3.11. Influencia de la temperatura en hidrólisis ácida y enzimática. (tiempo 70 min y RAM 3.5 ml ác/gr celulosa)

3.4 Producción de glucosa.

3.4.1 Hidrólisis ácida.

En las figuras 3.12, 3.13, 3.14, presentan el rendimiento de glucosa a distintos tiempos de hidrólisis. En estas curvas, se identifican también dos periodos claramente diferenciados, como en el caso de la producción de azucares reductores: el primero en el cual la razón de producción de glucosa es casi constante y aparentemente no depende de la cantidad de sustrato no disuelto; una segunda fase (fase estabilización), en la cual la velocidad de producción de glucosa decrece abruptamente, llegando a cero, para luego tornarse negativa, debido a la reacción de degradación de la glucosa formada. Esta reacción se ve acelerada con el transcurso del tiempo y con el aumento en la concentración de ácido. La degradación de productos no es obvia a bajas temperaturas (25°C) o a razones de ácido celulosa menores a 3,5 (ml ácido/gr celulosa).

Se observa en las figuras 3.12, 3.13, que a medida que aumenta la temperatura, la velocidad de la reacción de producción de glucosa aumenta, como también aumenta la reacción de degradación de glucosa. El valor máximo alcanzado en la producción de glucosa fue de 32 % de rendimiento sobre la base de la celulosa cargada al proceso. Este rendimiento se obtuvo bajo las condiciones de RAM =4.4 (ml ácido/gr celulosa), T= 40 °C y tiempo = 40 min. Se observa también que para gran parte de los casos, los máximos rendimientos estuvieron muy cercanos a este valor, por lo que la temperatura no influye en el rendimiento sino que en el tiempo que se necesita para alcanzarlo.

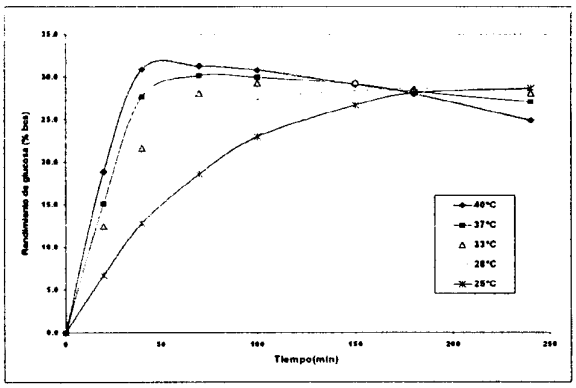


Fig 3.12.Influencia de la temperatura en el rendimiento de glucosa (RAM=4.4 ml/gr cel).

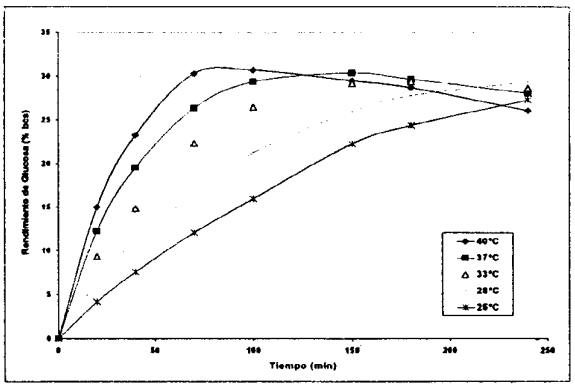


Fig 3.13. Influencia de la temperatura en el rendimiento de glucosa (RAM =3,5 ml/gr cel).

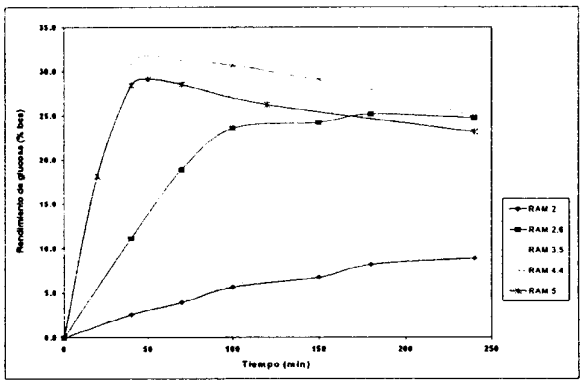


Fig 3.14. Influencia de la relación ácido/sustrato en el rendimiento de glucosa (T= 40 °C).

De la figura 3.14 se puede ver un comportamiento similar en la producción de glucosa, a distintas razones ácido/ madera, al variar el tiempo de reacción, exceptuando a razones ácido/madera menores a 2,6 (ml ácido/gr celulosa), donde los rendimientos en la producción de glucosa fueron muy inferiores comparados con el resto de los ensayos. El escaso rendimiento obtenido bajo estas condiciones, aparentemente puede deberse a que no se formo una solución homogénea entre el ácido y la celulosa, por lo que se logro una escasa agitación.

Es importante enfatizar que bajo las condiciones usadas en este trabajo (bajas temperaturas y alta concentración de ácido), el rendimiento glucosa se asemeja mucho a los obtenidos por otros trabajos usando usando altas temperaturas (sobre 200°C) y baja concentración de ácido (aproximadamente 1%).[26], [36]. Los rendimientos de estos procesos están en el rango de 35%, mientras que en el presente trabajo el rendimiento de producción de glucosa alcanzado es de aproximadamente 32 %.

3.4.2 Hidrólisis enzimática.

Las figuras 3.15 y 3.16, presentan el rendimiento en la producción de glucosa a distintos tiempos y temperaturas, variando las razones de acido/celulosa, para las hidrólisis ácida y enzimática. En la mayoría de estas curvas, se observa que el rango de resultados obtenidos es muy estrecho en el rendimiento de la hidrólisis enzimática, esta alcanza un valor casi constante y no se ve influenciada por las condiciones de la hidrólisis ácida anterior.

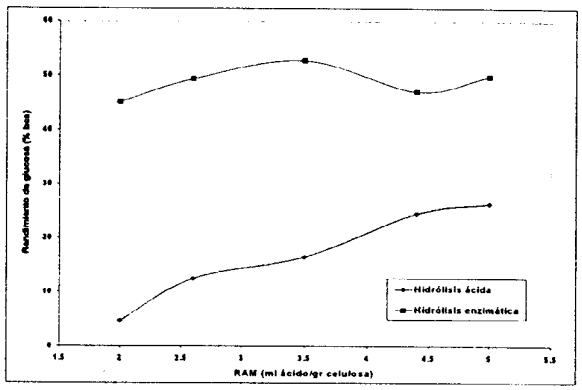


Fig. 3.15. Influencia de la RAM en las hidrólisis ácida y enzimática. (T=28 °C y t = 70 min).

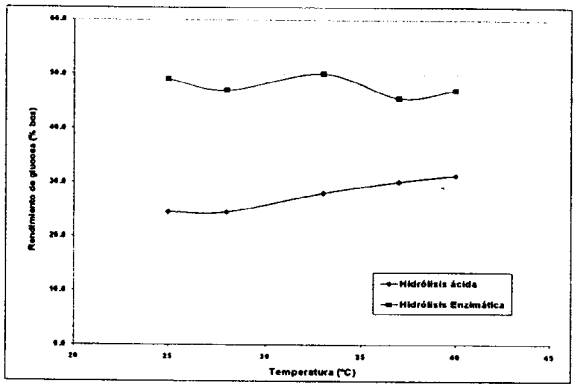


Fig. 3.16. Influencia de la RAM en las hidrólisis ácida y enzimática. (T=40 °C y t = 150 min).

En las figuras 3.17 y 3.18, se presentan el rendimiento de producción de glucosa a distintas razones de ácido/celulosa, variando tiempo y temperatura, para la hidrólisis ácida y enzimática. En la mayoría de estas curvas, como en el caso anterior, y como sucedió en el rendimiento observado para los azúcares reductores, el rango de resultados es muy estrecho en el rendimiento de la hidrólisis enzimática, esta alcanza un valor casi constante y no se ve influenciada por las condiciones de la hidrólisis ácida anterior. El rango de resultados de la conversión de glucosa varió entre 0.32 – 0.528 gr hidrólizado/gr de celulosa cargada al proceso, aunque la mayoría de los valores se concentró entre 0.44-0.50 gr hidrólizado/gr de celulosa cargada al proceso. La máxima conversión se alcanza cuando las condiciones de operación fueron RAM = 3.5, T = 28 °C, tiempo =70 min.

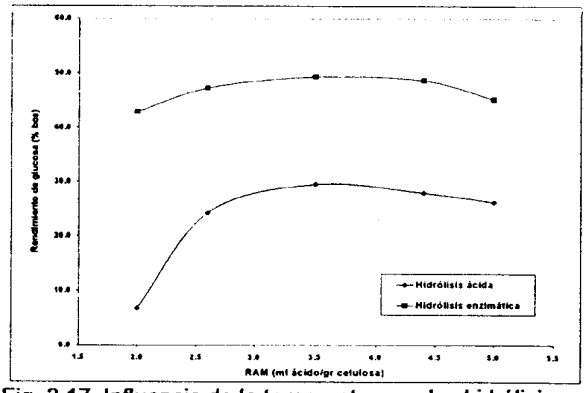


Fig. 3.17. Influencia de la temperatura en las hidrólisis ácida y enzimática. (t 70 min y RAM 4.4 ml ác/gr cel).

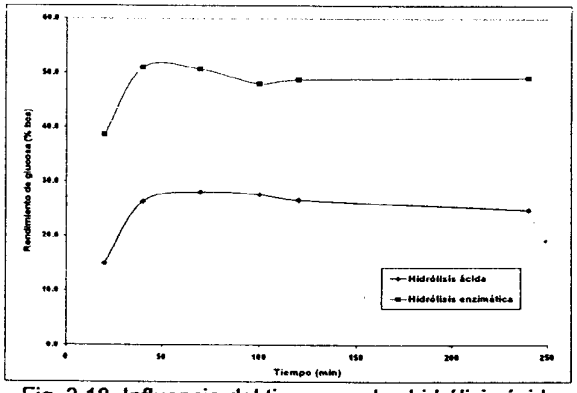


Fig. 3.18. Influencia del tiempo en las hidrólisis ácida y enzimática. (T 37 °C y RAM 5 ml ácido/gr celulosa)

Los resultados muestran valores similares en otras condiciones de operación, esto significa que las variables de la hidrólisis ácida tienen un limitado efecto sobre la respuesta, aunque como se mostró anteriormente la producción de glucosa sólo con enzimas no sobrepaso el 24% de rendimiento.

En este sentido los resultados discrepan de lo esperado tanto para la solubilización de la celulosa como para la producción de glucosa, debido a que las bases teóricas hacen pensar que el tratamiento ácido, seria muy influyente sobre la conversión lograda, ya que la eliminación de las hemicelulosas mediante una prehidrólisis ácida favorece la accesibilidad de los enzimas a la celulosa puesto que se está retirando una barrera física. Si además, mediante otros procesos, se elimina lignina la accesibilidad es mayor y la velocidad y rendimiento de la hidrólisis enzimática aumenta. La hidrólisis ácida también puede disminuir el grado de polimerización de la celulosa y su cristalinidad, lo cuál puede favorecer también la reacción enzimática.

Lo anterior se podría atribuir a que la hidrólisis procede primero en las zonas amorfas de la celulosa, para luego alcanzar las zonas con bajo grado de cristalinidad, por lo que se puede suponer que el sustrato que no reaccionó corresponde a las zonas con un grado de cristalinidad muy alto. Lo anterior tiene significado ya que no importando las condiciones del tratamiento ácido, el grado de polimerización vario en un rango muy estrecho, por lo que se lograría un sustrato de similares condiciones para el ataque enzimático. Otra variable que puede contribuir a este comportamiento es la forma en que las enzimas atacan la celulosa, donde los extremos de la cadena son modificados, por lo que se necesitaría un nuevo tipo de enzimas especializadas.

Lamentablemente, no se encontró información en la literatura respecto a la conversión de polisacáridos bajo condiciones similares a las ejecutadas en este trabajo.

3.5 Rendimiento de la hidrólisis.

El rendimiento de la hidrólisis como proceso global, se expresa como porcentaje de masa hidrolizada por unidad de masa cargada al proceso, esto es, el rendimiento expresado como la suma de las dos hidrólisis efectuadas. Esta variable es de gran importancia porque permite optimizar técnicamente el proceso.

3.5.1 Efecto del tiempo y la temperatura.

En la siguiente figura se puede observar el rendimiento global de la hidrólisis al mantener constante la razón ácido/celulosa, variando la temperatura y el tiempo de reacción en la hidrólisis ácida.

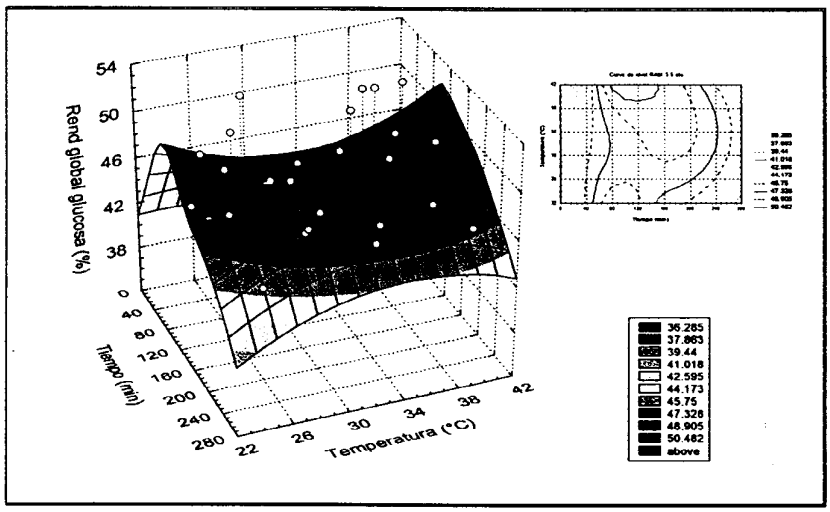


Fig. 3.19. Efecto de la temperatura y tiempo sobre rendimiento global de glucosa. (RAM = 3.5 ml ácido/gr celulosa).

De la figura 3.19, se observa que los rendimientos en la producción de glucosa tienen un comportamiento similar al variar la temperatura y el tiempo de reacción sobre las distintas razones ácido/celulosa. Se puede ver que al aumentar la razón ácido/celulosa el rango de resultados se mantiene muy cercano al valor máximo alcanzado. El tiempo es la variable que tiene un mayor efecto sobre el rendimiento de glucosa, en cambio la temperatura a medida que aumenta la razón ácido/celulosa va perdiendo influencia. Los resultados obtenidos varían en el rango de 36-50 % de rendimiento. Los valores máximos se obtienen cuando el tiempo es cercano a 50 min, para la mayoría de las razones ácido/celulosa utilizadas.

3.5.2 Efecto del tiempo y la razón ácido/celulosa.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para el rendimiento global de la hidrólisis al mantener constante la temperatura, variando razón ácido/celulosa y el tiempo de reacción en la hidrólisis ácida.

De la figura 5.20, se observa que los rendimientos en la producción de glucosa a condiciones medias de tiempo y razón ácido/celulosa tienen efectos similares, pero se puede apreciar que a medida que aumenta la temperatura se hace más amplio el rango en el cual las variables de la hidrólisis obtienen rendimientos muy cercano al valor máximo encontrado, el cual es de 48 %.

Este valor a 28 °C se obtiene con RAM entre 3,5 y 4.5 ml ácido/gr celulosa, mientras que a 33°C, el valor se obtiene en un rango de RAM desde 2.6 a 4,5 (ml ácido/gr celulosa). El tiempo tiene un efecto significativo al comienzo de la hidrólisis, esto es, hasta los 50-60 minutos, para luego influenciar en menor medida el rendimiento de la hidrólisis enzimática posterior.

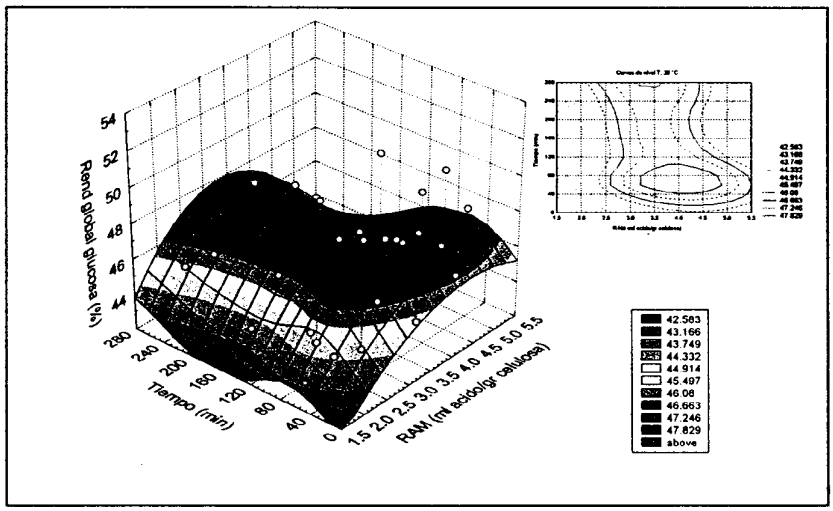


Fig. 3.21. Efecto del tiempo y la RAM sobre rendimiento global de glucosa. (T: 28 °C)

3.5.3. Efecto de la temperatura y la razón ácido/celulosa.

En la siguiente superficie de respuesta se presentan los resultados obtenidos para el rendimiento global de la hidrólisis al mantener constante el tiempo de reacción, variando razón ácido/celulosa y la temperatura en la hidrólisis ácida. Un efecto similar a los anteriores se puede observar de la figura (3.22), donde los máximos rendimientos en la producción de glucosa se obtienen a condiciones medias de razón ácido/celulosa. Con respecto al tiempo de reacción, se puede ver que los máximos rendimientos son alcanzados antes de la primera hora de reacción, esto sucede para todos los casos en estudio, aunque este comportamiento es más severo al aumentar la temperatura o la razón ácido/celulosa.

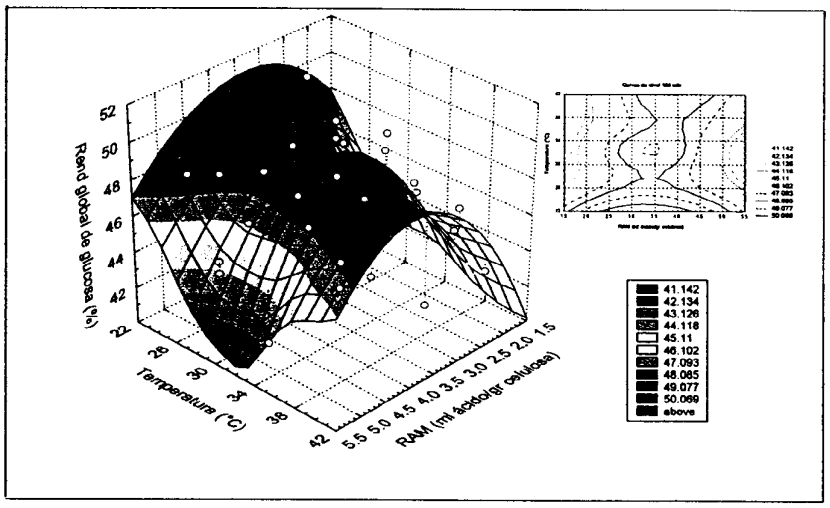


Fig (3.22). Efecto de la temperatura y la RAM sobre rendimiento global de glucosa. (t = 150 min)

De los análisis anteriores se puede concluir que todas las variables deben ser consideradas cuando se requiere un alto rendimiento en la producción de glucosa y, como en las superficies de respuesta, que son muy similares, se observa una estabilización de la respuesta, el punto óptimo es alcanzado en el rango de estudiado. Se observa que los máximos rendimientos, son obtenidos en las condiciones más suaves o en las condiciones más severas de la hidrólisis ácida, esto se explica debido a que condiciones suaves de hidrólisis ácida, entregan un sustrato con baja solubilización de celulosa y altamente accesible al ataque enzimático, por lo que el alto rendimiento global obtenido se debe principalmente a la hidrólisis enzimática. En cambio en condiciones severas de hidrólisis ácida el alto rendimiento alcanzado se debe principalmente a esta última hidrólisis, ya que el sustrato entregado a la hidrólisis enzimática, se encuentra muy solubilizado y en similares condiciones de accesibilidad que el sustrato entregado después de una hidrólisis ácida realizada en condiciones suaves. Por esto que en el rango estudiado se encuentra en condiciones muy disímiles, mas de un valor óptimo en el rendimiento global de glucosa.

3.6 Efecto de la hidrólisis ácida en el grado de polimerización (DP).

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos sobre el grado de polimerización de la celulosa, al someterla a las diferentes condiciones de la hidrólisis ácida.

RAM (ml ác/gr celulosa)	T (°C)	Tiempo (min)	DP
2	33	40	1638
2	37	100	1389
2.6	28	70	1432
2.6	37	40	1587
3.5	40	40	1489
3.5	40	70	1229
4.4	28	40	1304
4.4	37	100	1297
5	28	70	1582
5	33	120	1214

Tabla 3.2 Grado de polimerización de la celulosa después de hidrólisis

Se puede observar que el rango en que varia el grado de polimerización, dependiendo de las condiciones de la hidrólisis ácida es muy estrecho, considerando que el grado de polimerización de la celulosa original es de 4200. Por lo que las distintas condiciones de la hidrólisis, en la mayoría de los casos disminuyeron cerca de un 50 % el grado de polimerización de la celulosa original.

3.7 Cinética de la solubilización de celulosa.

Los resultados obtenidos experimentalmente en la solubilización de celulosa, muestran que la producción de azúcares reductores hasta la fase de estabilización, pueden ser aproximados a una cinética de orden cero, mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{dAR}{dt} = k \qquad 0 \leq t \leq t_e \qquad (3.1)$$

Donde AR esta expresado en mg de azúcares reductores por gramo de celulosa inicia l y t_e es el tiempo en horas hasta alcanzar la fase de estabilización de la producción de azúcares reductores . Integrando la ecuación (1) se obtiene:

$$AR = k \cdot t \qquad 0 \leq t \leq t_e \qquad (3.2)$$

La tabla 3.3 muestra los valores obtenidos para la constante de velocidad de reacción, k, bajo las diferentes condiciones experimentales. Este parámetro fue correlacionado con la temperatura (T) y la relación ácido/sustrato (RAM), utilizando la expresión:

$$k = 1.33 \cdot 10^{8} \cdot (RAM) \cdot \exp\left(\frac{-36.128}{R \cdot T}\right) \qquad (3.3)$$

Donde RAM esta expresado en ml por g^{-1}, la energía de activación en Kj por mol^{-1} y k en mg de azúcares reductores por gramo de celulosa cargada al proceso. En todos los casos, la desviación entre los valores de k obtenidos experimentalmente y los obtenidos mediante la ecuación (3), fue menor que ± 10 %.

El tiempo necesario para lograr la máxima conversión de azúcares reductores, esto es en la fase de disolución, fue correlacionado con las variables experimentales mediante la ecuación numero (4), los resultados se muestran en la tabla 3.3.

$$t_e = 1.23 \cdot 10^{-16} \cdot (1 - 0.125 \cdot (RAM)) \cdot \exp\left(\frac{90.98}{RT}\right) \qquad (3.4)$$

Esta expresión entrega el mínimo tiempo requerido para alcanzar la máxima conversión de azucares reductores, por lo que puede ser utilizada para planificar las condiciones experimentales que minimicen la degradación de azúcares reductores por acción del ácido.

T (K)	RAM (ml/g)	K (mg/g h)	T_e (h)
298.15	2.6	161.47	4.15
298.15	2.6	186.71	2.83
98.15	3.5	217.37	2.23
301.15	3.5	251.34	1.54
306.15	4.4	399.94	0.65
310.15	4.4	480.28	0.40
301.15	5	359.06	1.02
313.15	5	624.17	0.24

Tabla 3.3 influencia de las condiciones de operación en la constante de velocidad y el tiempo de disolución.

4 CONCLUSIONES

- En la solubización de celulosa se identifican dos periodos claramente diferenciados: el primero, fase de disolución, el segundo fase de estabilización.
- El rendimiento máximo alcanzado por la hidrólisis ácida en la producción de glucosa fue 32 %, base celulosa seca.
- Un aumento en la temperatura produce un aumento en la velocidad de la reacción, pero no un aumento en el rendimiento de producción de glucosa.
- Las variables de la hidrólisis ácida tienen una significativa influencia sobre el rendimiento del proceso, y dentro de estas la razón ácido/celulosa es la que provoca un mayor efecto.
- Una hidrólisis ácida extendida provoca degradación de glucosa formada por el ácido presente en la solución.
- La hidrólisis ácida provoca una disminución cercana al 50% en el grado de polimerización de la celulosa, en la mayoría de las condiciones estudiadas.
- Dentro del rango estudiado, la reacción de solubilización de celulosa se comporta de acuerdo a una cinética de orden cero.
- El rendimiento máximo en la producción de glucosa alcanzado por la hidrólisis enzimática, sin tratamiento ácido fue 24 %, base celulosa seca.
- Se encontró una expresión matemática, que estima el tiempo mínimo necesario para alcanzar la máxima conversión de azúcares reductores.
- El rango de resultados es muy estrecho en el rendimiento de la hidrólisis enzimática, esta alcanza un valor casi constante y no se ve influenciada por las condiciones de la hidrólisis ácida anterior.
- El complejo enzimático utilizado, presenta inhibición por sustrato o por producto final.
- La combinación de hidrólisis ácida/enzimática, no es capaz de degradar la totalidad de la celulosa.
- El rendimiento global máximo en la producción de glucosa alcanzado por la combinación de hidrólisis fue 54,2 %, base celulosa seca.
- Existe mas de una condición de tratamiento ácido, en el cual el rendimiento global en la producción de glucosa es máximo.

5 BIBLIOGRAFIA.

[1] Chandía E.,1983. Prehidrólisis de la madera de *eucaliptus globulus* en tratamiento con ácido sulfúrico diluido. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. (Memoria de título).

[5] Rhydoholm, S.A. "Pulping Process",, 1a. Ed.,Jonh Wiley of sons Ltd., N.Y. (1967).

[6] Browing, B.L. "The chemistry of wood", Interscience, 68F, New York (1963).

[7] Tsao G. Process Biochem., 12, October (1978).

[8] Hernández, Rubén, PhD. Material didáctico. http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/enzimas/index.html Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Universidad de Los Andes, Venezuela.

[13] Sjöström, E., 1993. Wood chemistry. Fundamentals and Applications. Academy Press. California, USA.

[15] Brunaud Sánchez, E; "Degradación enzimatica de madera de eucalyptus maidenii previa deslignificacion parcial y tratamiento alcalino", Memoria de Título de Ingeniero Civil Químico, Enero 2002.

[17] Immergut, B., and B. G. Ranby, Ind. Eng.Chem., 48, 1983 (1956).

[18] Saeman, J.F., " Kinetics of wood Saccharification. Hydrolysis of cellulose and descomposition of sugars in dilute acid at high temperature", Ind. Eng. Chem. 37, 43-52 (1945).

[19] Zin-Eddine Dadach and Serge Kaliaguine, "Acid hydrolysis of cellulose. Part I. Experimental Kinetic Analysis", The Canadian Journal of Chemical Engineering, volume 71, december, 1993.

[20] Feller, R. L. S. B., Lee and J. Bogaard, " The kinetic of cellulose deteroriation", advances in chemistry, ACS series 212, 329-347 (1986).

[21] Jonáthan Woodward, Marybeth Lima and Norman E. Lee., "The role of cellulase concentration in determining The degree of synergism in the hydrolysis of microcrystalline cellulose", Biochem. J. (1988), 255, 895-899.

[22] Reese, E.T., Siu, R.G.H., Levinson, H.S. "The biological Degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mecanism of cellolose hydrolysis." J. Of bacteriology, vol 59, 1950, pp 485-497.

[23] Sild, V., Nutt, A., Pettersson, G. (1998). Monte carlo simulation of enzimatic cellulose deegradation, in Proceedings of TRICEL' 97 . Royal Society of chemystri, London, England, in the press.

[24] Fan, L.T., Lee, Y. H. And Gharpuray, M.M., The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzimic hydrolysis. Adv. Biochem.Eng., 23 (1982) 57-87.

[25] Millet, M. A., Baker, A. J. And Satter, L.D., pretreatments to enhance chemical, enzymic and microbial attack of cellulosic materials. Biotechnol. Bioeng. Symp., 6 (1976), 125-9.

[26] Bhandari, N., McDonald, D.G. and Bakhshi, N.N., Kynetic studies of corn stover saccharification using sulphuric acid. Biotechnol.Bioeng., 26 (1984) 320-7.

[28] Bailey, J. 1984. Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw Hill, Nueva York, EEUU. 162-173p.

[29] Thomson, D. R. And Grethelein, H. E., pretreatment to enhance chemical, enzymic and microbiological attack of cellulosic materials. Ind.eng.chem.prod.res.dev.,18.(1979) 224-8.

[30] Mansfield S., Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. Biotechnology Progress, 1999,15,804-816.

[31] J.C. Parajo, J.L.Alonso and V.Santos.,"Delignification and swelling of eucalyptus wood ahead of enzimatic hydrolysis of the cellulosic fraction.", Process biochemistry, vol.30, No 6, pp 537-545, 1995.

[32] Ana B Moldes, Jose L Alonso and Juan C Parajo.,"Strategies to improve the bioconversion of processed wood into lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation." J. Chem. Technol. Biotechnol 76, 279-284 (2001).

[33] Klyosov A.1995. Industrial Enzyme Engineering treatise. V1-2. http://people.ne.mediaone.net/aklyosov/Volume1.htm.

[35] Werner, W., Rwy, G.& Wielinger, H., Properties of a new chromogen for the determination of glucose in blood according to the GOD/POD method. Z Analyt. Chem., 252 (1970) 224-8.

[36] Ranganathan, S., Macdonald, D. G. & Bakhshi, N. N., Kinetic studies of wheat straw hydrolysis using sulphuric acid. Can. J. Chem. Eng., 63 (1985) 840-4.