

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA



HIDRÓLISIS DE CELOBIOSA Y
CARBOXIMETILCELULOSA
CON CELLUCLAST

TESIS DOCTORAL,

ANTONIA REYES REQUENA
Granada, 1997

~~T = 21/91~~

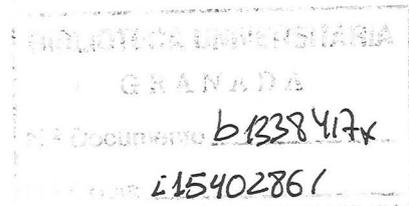
UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

T 3 - 13



Departamento de Ingeniería Química

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CARBOXIMETILCELULOSA Y CELOBIOSA
CON CELLUCLAST



TESIS DOCTORAL

ANTONIA REYES REQUENA
Granada, Octubre de 1997

HIDRÓLISIS DE CARBOXIMETILCELULOSA Y CELOBIOSA CON CELLUCLAST.

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor en Ciencias, Sección Químicas, dentro del Programa de Doctorado del Departamento de Ingeniería Química "Tecnología Bioquímica y Agro-alimentaria", Bienio 1987-1989.

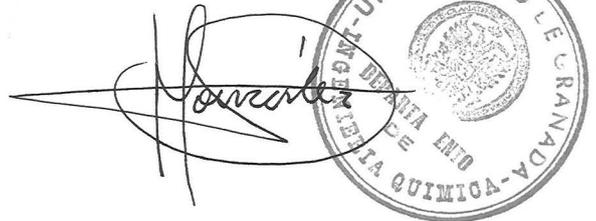
Granada, 23 de Octubre de 1997



Fdo.: Antonia Reyes Requena

PEDRO GONZÁLEZ TELLO, Catedrático de Ingeniería Química y Director del Departamento del mismo nombre

CERTIFICA: Que el presente Trabajo ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento, bajo la dirección de los Drs. D. Vicente Bravo Rodríguez y D^a. M^a. Purificación Páez Dueñas, por la Licenciada D^a. Antonia Reyes Requena.



LOS DIRECTORES DE LA TESIS



Dr. D. Vicente Bravo Rodríguez
Catedrático de Ingeniería Química



Dra. D^a. M^a. Purificación Páez Dueñas
Profesora Titular de Ingeniería Química

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a cuantos han participado, de diferentes formas, en la elaboración de este trabajo; mencionando especialmente:

A los Drs. D. Vicente Bravo Rodríguez y D^a. M. Purificación Páez Dueñas, por su acertada dirección y colaboración inestimable en la realización de este trabajo.

Al Dr. D. Fernando Camacho Rubio, tutor y amigo.

Al Dr. D. German Luzón González, por su generosa aportación informática.

A mi familia y amigos que tanto me han apoyado.

Y a Manolo Gil , por dar color a esta Tesis.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 9 |
| 2.1 Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos | 12 |
| 2.1.1 Pretratamientos | 16 |
| 2.1.2 Hidrólisis de residuos celulósicos | 19 |
| 2.1.2.1 Hidrólisis ácida | 19 |
| 2.1.2.2 Hidrólisis enzimática | 20 |
| 2.2 Cinética enzimática | 20 |
| 2.2.1 Ecuación de velocidad | 22 |
| 2.2.2 Determinación de los parámetros cinéticos | 28 |
| 2.2.2.1 Método diferencial | 28 |
| 2.2.2.2 Método integral | 30 |
| 2.2.2.3 Integración de la ecuación de velocidad | 31 |
| 2.2.2.4 Desnaturalización de la enzima | 33 |
| 2.2.2.5 Inhibición de sustrato y de producto | 40 |
| 2.3 Hidrólisis enzimática de celulosa | 46 |
| 2.3.1 Producción de celulasas | 51 |
| 2.3.2 Hidrólisis enzimática homogénea de derivados de celulosa | 52 |
| 2.3.3 Hidrólisis enzimática de celobiosa | 54 |
| 2.4 Objeto de la investigación | 62 |

II

| | |
|---|-----------|
| 3. TÉCNICA EXPERIMENTAL | 65 |
| 3.1 Productos utilizados | 67 |
| 3.1.1 Productos químicos | 67 |
| 3.1.2 Características de la enzima | 68 |
| 3.2 Métodos analíticos y ensayos previos | 69 |
| 3.2.1 Análisis de glucosa | 69 |
| 3.2.2 Análisis de azúcares reductores | 72 |
| 3.2.2.1 Determinación de celobiosa | 72 |
| 3.2.2.2 Determinación de glucosa | 73 |
| 3.2.3 Determinación de celobiosa y glucosa por HPLC | 74 |
| 3.2.4 Análisis previos | 77 |
| 3.2.5 Parada de reacción | 77 |
| 3.2.6 Variación del pH durante la reacción | 78 |
| 3.3 Procedimiento experimental | 78 |
| 3.3.1 Hidrólisis enzimática de celobiosa | 79 |
| 3.3.2 Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa | 79 |
| 3.4 Desactivación de la enzima | 79 |
| 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES | 85 |
| 4.1 Hidrólisis enzimática de celobiosa | 87 |
| 4.2 Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa | 101 |

| | |
|---|-----|
| 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS. | 117 |
| 5.1 Hidrólisis enzimática de celobiosa | 119 |
| 5.1.1 Método de las velocidades iniciales | 124 |
| 5.1.2 Método integral | 132 |
| 5.2 Hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa | 150 |
| 5.2.1 Hidrólisis total | 150 |
| 5.2.2 Influencia de la intensidad de tratamiento | 153 |
| 5.2.3 Modelo cinético | 156 |
| 5.2.4 Productividad en glucosa | 160 |
| 5.2.5 Productividad global | 172 |
| 5.5 Influencia del pH y la temperatura | 187 |
| 6. CONCLUSIONES | 197 |
| 7. NOMENCLATURA | 205 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 209 |

RESUMEN

1. RESUMEN

El trabajo que se describe en esta memoria, forma parte de dos de las líneas de investigación que se vienen desarrollando por el Grupo de investigación de Biorreactores del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada, una de carácter aplicado sobre el aprovechamiento de residuos agrícolas y forestales de nuestra región con vistas a la obtención de alimentos, productos químicos orgánicos o combustibles líquidos y gaseosos y otra de carácter básico orientada a la modelización de reacciones enzimáticas.

En los procesos de aprovechamiento de la biomasa residual de carácter lignocelulósico una etapa fundamental es la de hidrólisis enzimática mediante celulasas de los residuos pretratados y uno de los problemas principales que afectan a los rendimientos de la hidrólisis es el de inhibición de las glucanasas por la celobiosa, problema que se acentúa en el caso de celulasas procedentes de *T. viride*, que son las más ampliamente utilizadas por su rendimiento hidrolítico global relativamente elevado, pero que presentan el inconveniente de una reducida actividad β -1,4-glucosidasa.

En la introducción teórica de la memoria se desarrolla un método de determinación de expresiones de velocidad en el caso de la cinética enzimática simple, irreversible de un sustrato, así como, la aplicación de los métodos diferencial e integral para la determinación de los parámetros cinéticos de las mismas. Sin embargo la hidrólisis enzimática de la celulosa mediante celulasas es un proceso heterogeneo, dada su estructura insoluble, en el que las endo y exoglucanasas se adsorben sobre la superficie de la celulosa y reaccionan liberando glucosa, celobiosa y cadenas más cortas de celulosa, que serán solubles o no dependiendo de su grado de polimerización, mientras que las β -1,4-glucosidasas hidrolizan en fase homogénea la celobiosa a glucosa. Para profundizar en el mecanismo de este proceso se puede utilizar celobiosa y carboximetilcelulosa (CMC) como sustratos, por ser ambos de naturaleza conocida y para evitar las complejidades de los sistemas heterogéneos.

La hidrólisis enzimática de celobiosa con Celluclast, preparado líquido comercial de celulasas inmovilizadas procedentes de *T. reesei*, se ha estudiado, tras comprobar que en las condiciones de operación utilizadas no se producía desactivación apreciable de la enzima, mediante series experimentales programadas para analizar la influencia de la concentración inicial de celobiosa, entre 100 y 1 mM, del pH, entre 3.9 y 5.9, y de la temperatura, entre 40 y 60°C.

Aplicando el método de las velocidades iniciales e incluyendo los resultados correspondientes a tiempo de reacción nulo se ha determinado que existe un tiempo de parada de reacción (t_p) no despreciable, a pesar de que se ensayaron diferentes métodos para detener la reacción enzimática, dicho tiempo sólo depende de la temperatura y determina conversiones significativas a tiempos de reacción nulos. Considerando este efecto se ha determinado que los resultados experimentales se ajustan aceptablemente mediante la ecuación de Michaelis-Menten.

El mismo resultado se alcanza aplicando el método integral, que se ha desarrollado de una forma sistemática para tener en cuenta las distintas posibilidades de inhibición de sustrato y/o producto. Los valores obtenidos por ambos métodos permiten deducir las siguientes expresiones para la constante de velocidad y de Michaelis:

$$k_a = 3.15 \cdot 10^4 \exp\left(-\frac{40700}{RT}\right), \text{ mM min}^{-1} (\text{g/L})^{-1}$$

$$K_M = 8.68 \cdot 10^3 \exp\left(-\frac{24100}{RT}\right), \text{ mM}$$

que indican un valor de 40.7 kJ/mol para la energía de activación de la constante k_a y de 24.1 kJ/mol para la variación de K_M con la temperatura.

Con respecto a la influencia del pH se ha determinado un valor medio de k_a de 0.00935 mM min⁻¹ (g/L)⁻¹ para los pH 3.9 y 4.9 disminuyendo a 0.00505 a pH igual a 5.9 y un valor medio de K_M de 1.27 mM para los pH 4.9 y 5.9 aumentando hasta

3.54 mM a pH igual a 3.9. Con todo ello se deduce que el pH cinéticamente más adecuado, mayor valor de k_a y menor de K_M , para la hidrólisis de celobiosa con Celluclast es de 4.9, confirmando el máximo de actividad a pH de aproximadamente 5 señalado en la bibliografía.

El estudio experimental de la hidrólisis de CMC con Celluclast se ha llevado a cabo mediante la determinación de las concentraciones de glucosa (G) y de azúcares reductores, esta última permite obtener la de celobiosa, (C), ya que mediante HPLC se ha comprobado que los azúcares presentes son glucosa y celobiosa. Mediante dos series iniciales de experimentos se ha establecido la hidrólisis total y la influencia de la intensidad de tratamiento. Los resultados obtenidos en la hidrólisis total, G_f y C_f , han permitido expresar la concentración inicial de sustrato como glucosa equivalente mediante:

$$\frac{2C_f + G_f}{S_0} = \frac{P_f}{S_0} = 1.593, \text{ mmol glucosa equivalente/g CMC}$$

y por lo tanto definir dos productividades: una en glucosa

$$x_c = \frac{G}{P_f}$$

con un valor máximo de G_f/P_f y otra global

$$x_p = \frac{2C + G}{P_f}$$

cuyo valor máximo es la unidad.

El estudio sobre la influencia de la intensidad de tratamiento ha puesto de manifiesto que el posible efecto sinérgico entre las endo y las exoglucanasas resulta prácticamente despreciable y que para establecer la intensidad de tratamiento se puede utilizar el producto $e_0(t + t_p)$.

De los resultados obtenidos para la productividad en glucosa se deduce que la producción a partir de las endoglucanasas es muy significativa y superior a la

correspondiente a la hidrólisis de celobiosa por las β -1,4-glucosidasas, obteniéndose que las velocidades se pueden ajustar a una ecuación de Michaelis-Menten con las siguientes expresiones para los parámetros cinéticos:

$$k_{a, \text{en}} = 2.17 \cdot 10^3 \exp\left(-\frac{27700}{RT}\right), \text{mM min}^{-1} (\text{g/L})^{-1}$$

$$K_{M, \text{en}} = 2.09 \cdot 10^6 \exp\left(-\frac{40500}{RT}\right), \text{mM}$$

que indican un valor de 27.7 kJ/mol para la energía de activación de la constante $k_{a, \text{en}}$ y de 40.5 kJ/mol para la variación con la temperatura de $K_{M, \text{en}}$. Con respecto a la influencia del pH se ha determinado un valor medio de $k_{a, \text{en}}$ de 0.0624 para los pH 4.9 y 5.9 disminuyendo a 0.0504 a pH igual a 3.9 y un valor medio de $K_{M, \text{en}}$ de 0.35 para los pH 3.9 y 4.9 para aumentar a 1.48 a pH igual a 5.9, por lo que también es 4.9 el pH cinéticamente más favorable para la actuación de las endoglucanasas sobre CMC.

De los resultados obtenidos para la productividad global se deduce que prácticamente toda la producción de celobiosa a partir de CMC es atribuible a las exoglucanasas y que las velocidades obtenidas no se pueden ajustar a una ecuación simple de Michaelis-Menten, siendo necesario considerar la existencia de inhibición competitiva de producto y resultando las siguientes expresiones para los parámetros cinéticos:

$$k_{a, \text{ex}} = 7.38 \cdot 10^{11} \exp\left(-\frac{61300}{RT}\right), \text{mM min}^{-1} (\text{g/L})^{-1}$$

$$K_{M,ex} = 2.23 \cdot 10^6 \exp\left(-\frac{32100}{RT}\right), \text{mM}$$

$$K_{IPC,ex} = 1.32 \cdot 10^6 \exp\left(-\frac{19400}{RT}\right)$$

que indican un valor de 61.3 kJ/mol para la energía de activación de la constante $k_{a,ex}$ y de 32.1 y 19.4 kJ/mol para las variaciones de $K_{M,ex}$ y $K_{IPC,ex}$ con la temperatura. Con respecto al pH existen valores prácticamente coincidentes de los tres parámetros cinéticos para 4.9 y 5.9, para aumentar a 3.9, habiéndose deducido mediante simulación de las velocidades de producción de celobiosa que el pH 4.9 sólo es ligeramente más favorable que el 3.9, aunque teniendo en cuenta los resultados correspondientes a las endoglucanasas y a las β -1,4-glucosidasas, se concluye que 4.9 es el pH más favorable para la hidrólisis de CMC con Celluclast.

2 INTRODUCCIÓN.

En la actualidad parece evidente que la biomasa primaria y la residual serán en un futuro inmediato las principales fuentes de recursos con que contará la Humanidad para la obtención de alimentos, productos químicos orgánicos e incluso combustibles líquidos y gaseosos, dado el agotamiento y creciente encarecimiento de la biomasa fósil (petróleo, carbón y gas natural), Joglekar y col. (1983), Sarkanen y col. (1979), Barnett y col. (1976), Fernández González (1980).

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

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

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

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

-Aumenta la productividad y el aprovechamiento de la materia prima, como se deduce de comparar los tiempos de duplicación de los microorganismos con los de las plantas y animales superiores y la selectividad de una reacción enzimática con la de una reacción química no biológica.

La aplicación de los desarrollos tecnológicos de la Ingeniería Química y de los recientes avances de la Ingeniería Genética a los procesos microbiológicos dieron lugar a que la Biotecnología se convirtiera en una de

las áreas de conocimiento más dinámica e innovadora de los años ochenta; en este sentido se estimaba, Joglekar y col. (1983), que el mercado para los procesos biotecnológicos sería de billones de dólares para finales de siglo.

2.1 APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS.

Los residuos lignocelulósicos están formados fundamentalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. En la tabla 2.1 se da la composición de algunos tipos de estos residuos, estos contenidos varían mucho de unos residuos a otros e incluso dependen del lugar, condiciones de cultivo, variedades, etc.

Tabla 2.1

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

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

* Después de eliminar plásticos y metales

En la tabla 2.2 se indican las velocidades medias de generación de los residuos agrícolas y forestales más abundantes en Andalucía, según datos del Centro de Estudios de la Energía (1980). También hay que considerar que la generación media de residuos sólidos urbanos se estima en 1 kg por habitante y día, lo que permite evaluar la producción de residuos sólidos urbanos, de carácter orgánico, en 2 Tm/año. En consecuencia, la Comunidad Autónoma

INTRODUCCIÓN

Andaluzá dispone de unos 8 MM Tm/año de residuos lignocelulósicos que pueden constituir una buena fuente de etanol, SCP o metano.

Tabla 2.2

Residuos agrícolas y forestales estimados para Andalucía, Tm/año

| Origen | Tm/año.10 ³ |
|---|------------------------|
| Paja de trigo | 1196 |
| Paja de cebada | 584 |
| Paja de avena | 90 |
| Paja de arroz | 217 |
| Caña de maíz | 696 |
| Poda de naranjo | 20 |
| Poda de almendro | 93 |
| Poda de olivar | 787 |
| Poda de viñedo | 46 |
| Residuos de cultivo industriales: | |
| Girasol | 315 |
| Algodón | 247 |
| Caña de azúcar | 157 |
| Residuos forestales (podrían llegar a 2 MM de Tm/año) | 650 |

Fuente: Centro de Estudios de la Energía (1980)

Los métodos de aprovechamiento de estos residuos pueden ser mediante procesos físicoquímicos o biotecnológicos, como se indica en la figura 2.1.

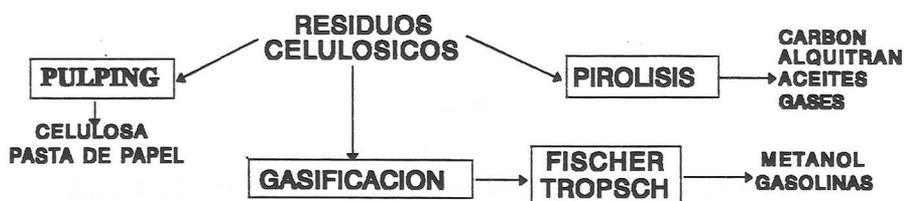
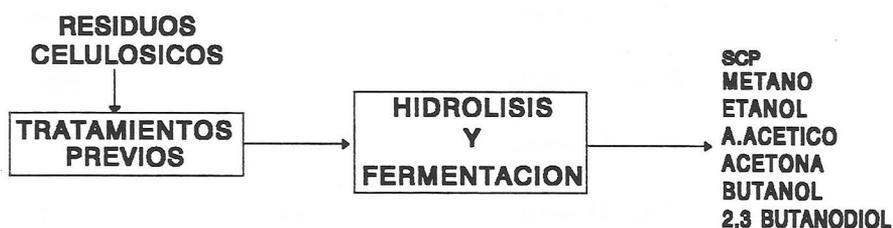
PROCESOS FISICO-QUIMICOS**PROCESOS BIOQUIMICOS**

Figura 2.1 Principales vías para el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos.

Aunque son numerosos los estudios que tratan de obtener productos químicos y combustibles de alto poder calorífico y pequeña densidad a partir de residuos lignocelulósicos por procesos de pirólisis y gasificación, Bueno Cordero y col. (1985), Corella Tudanca y col. (1985), Bilbao Duñabeitia y col. (1985), Font Montesinos y col. (1985), Arias Ergueta y col. (1985), las vías más prometedoras parecen ser las basadas en procesos bioquímicos y fundamentalmente aquellas que conducen a la obtención de etanol y a la producción de biomasa, SCP.

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

Por otra parte, los residuos celulósicos se caracterizan por su escaso contenido en proteínas y su baja digestibilidad, por lo que su utilización como

piensos, en su estado original, es poco aconsejable; en cambio, cuando se someten a tratamientos tan sencillos, como, por ejemplo, macerarlos con disoluciones de NaOH, su digestibilidad puede aumentar considerablemente. Si además se emplean como sustrato para el crecimiento de microorganismos celulolíticos se consigue aumentar su contenido en proteínas

En la figura 2.2 se esquematizan las etapas necesarias para la producción de etanol y SCP, que consisten en realizar unos pretratamientos físicos y/o químicos que faciliten la hidrólisis posterior de los mismos ya que reducen la cristalinidad de la celulosa, deslignifican el residuo celulósico y aumentan el área superficial. Posteriormente se puede proceder a una hidrólisis enzimática y fermentación aerobia simultanea mediante microorganismos celulolíticos como el *Chaetomiun cellulolyticum* para la obtención de SCP, Moo-Young y col. (1979); o a una hidrólisis enzimática y fermentación simultaneas mediante celulasas y levaduras, o mediante un sólo microorganismo como es el caso del *Clostridium thermocellum*, o una hidrólisis enzimática mediante celulasas y posteriormente fermentación aerobia o anaerobia mediante levaduras.

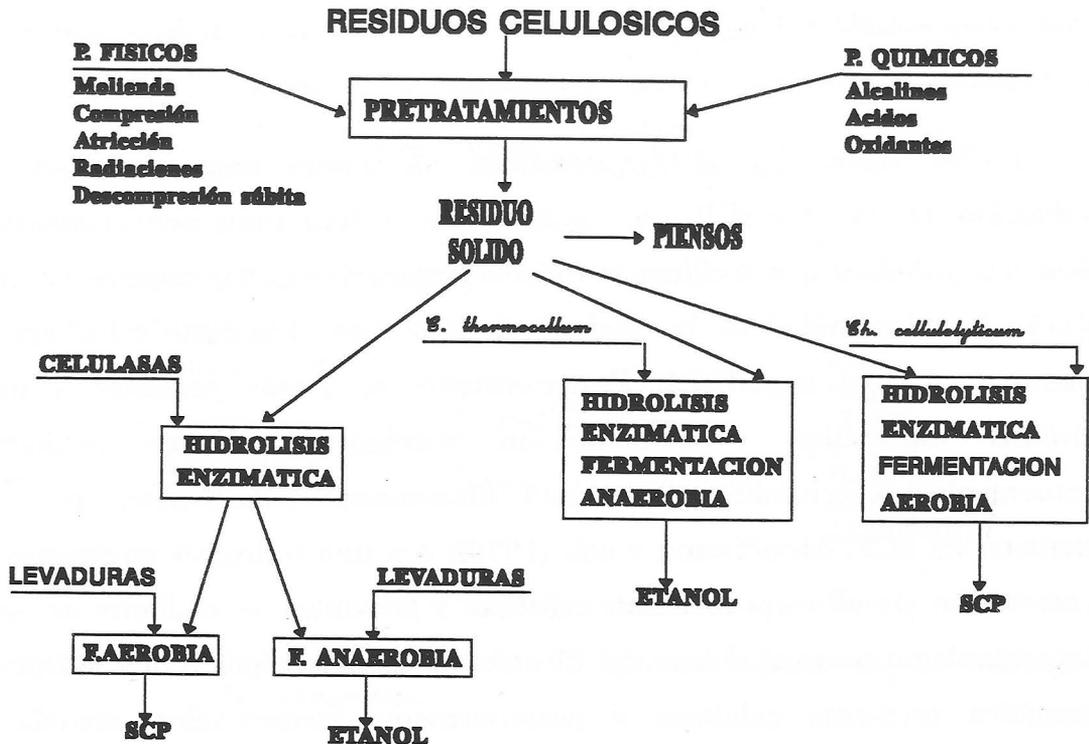


Figura 2.2 Etapas en la obtención de etanol y SCP.

2.1.1 PRETRATAMIENTOS.

La mayor dificultad para el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos, en la obtención de etanol o SCP, estriba en que es necesario romper los enlaces β -1,4-glucosídicos, para así liberar las moléculas de glucosa y celobiosa que posteriormente serán fermentadas a etanol o SCP, Wilke y col. (1983).

La reacción de hidrólisis propiamente dicha no parece ser limitante en la velocidad del proceso, ya que las mayores dificultades residen en la facilidad que presente el sustrato para que el agente catalítico, un ácido o una enzima, alcance los lugares de reacción. Como la celulosa nativa está protegida por una

barrera física, formada fundamentalmente por la lignina y su propia estructura cristalina, que dificulta el acceso a los enlaces β -1,4-glucosídicos, se comprende que cualquier aprovechamiento racional, en el sentido de producir etanol o SCP, implica realizar pretratamientos capaces de eliminar la barrera de lignina y reducir la cristalinidad de la celulosa.

Las operaciones a que se somete la materia prima tienen, por tanto, la finalidad de reducir la cristalinidad, deslignificar en parte y aumentar el área superficial; el pretratamiento ideal, que puede ser distinto para una u otra materia prima, debe ser económico; es decir, requerir poca inversión en equipo, consumir una cantidad razonable de energía, utilizar reactivos baratos y fácilmente recuperables, ser aplicable a varias materias primas, etc.

Los pretratamientos se clasifican en físicos y químicos, aunque es evidente que esta distinción no es siempre sencilla; en cada caso la bondad de esta operación viene dada por la facilidad de la hidrólisis posterior y en base a esto se determinan experimentalmente los valores más adecuados de las variables de operación: Temperatura, pH, concentración de reactivos, tiempo de pretratamiento, etc.

Los pretratamientos de carácter físico se suelen dividir en mecánicos y no mecánicos. En los primeros de ellos se utilizan fuerzas de impacto y de cizalladura que conducen a materiales de baja cristalinidad, mayor superficie específica y densidad aparente más alta; como consecuencia se facilita la hidrólisis posterior, se disminuye el volumen del reactor y se abarata su posible transporte. Entre estos pretratamientos cabe mencionar diferentes tipos de molienda, generalmente con molinos de bolas y rodillos, compresión y atricción, Neilson y col. (1982), Ryu y col. (1982), Tassinari y col. (1982).

Los pretratamientos de carácter físico, no mecánicos, someten al residuo lignocelulósico a la acción de agentes externos que provocan la descomposición y solubilización de una fracción de la lignina. Entre éstos se encuentran los tratamientos con radiaciones, Kamakura y col. (1982), Han y col. (1981), y la utilización de vapor a altas presiones, del orden de

4 bar, y tiempos de residencia pequeños, seguido de una descompresión súbita que rompe la estructura del material, Saddler y col. (1982); encontrándose que este procedimiento incrementa la hidrólisis enzimática de la madera de álamo 10 veces. De este último pretratamiento existen procesos comerciales, Iotech y Masonite Co, que inicialmente se desarrollaron para aumentar la digestibilidad de los residuos lignocelulósicos.

Los pretratamientos de carácter químico persiguen la deslignificación del material y la modificación de su estructura; por ello, los procesos clásicos de pulping, procesos Kraft y sulfito, al estar diseñados para la deslignificación, pero respetando al máximo la estructura de la celulosa, no están indicados en este caso. Los pretratamientos químicos más usuales son aquéllos que utilizan disoluciones diluidas de NaOH o NH_4OH , Detroy y col. (1981), Ben-Ghedalia y col. (1981), Detroy y col. (1982), Mishra y col. (1984), Mandels y col. (1974); mediante ellos se consigue aumentar el área superficial debido al esponjamiento de las fibras de la celulosa, swelling, que provoca la disolución alcalina. Los pretratamientos ácidos, Ben-Ghedalia y col. (1981), Detroy y col. (1982), se realizan, generalmente, con ácido sulfúrico diluido y eliminan la mayor parte de la hemicelulosa presente. Además de los tratamientos alcalinos y ácidos, existen otros que se fundamentan en la oxidación de la lignina y su posterior solubilización; los agentes oxidantes más utilizados son oxígeno o aire, Mc Ginnis y col. (1983), Ryu y col. (1982), Mc Ginnis y col. (1983), ozono, Ben-Ghedalia y col. (1981), Neely (1984), Gould (1984) y H_2O_2 en medios alcalinos, Fan y col. (1981).

En general los pretratamientos químicos son más efectivos que los físicos Fan y col. (1981), Horton y col. (1980); y así, Fan y col. (1981), ponen de manifiesto para la paja de trigo que, de los pretratamientos físicos, el más efectivo es la trituración en molinos de bolas y entre los químicos la acción del NaOH a altas temperaturas; además éste último presenta la ventaja de aumentar considerablemente la digestibilidad de los residuos celulósicos, Millett y col. (1976), Tsao y col. (1978).

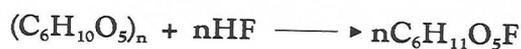
2.1.2 HIDRÓLISIS DE RESIDUOS CELULÓSICOS.

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

2.1.2.1 HIDRÓLISIS ÁCIDA.

La hidrólisis ácida mediante ácidos fuertes, concentrados y en caliente, Church y col. (1981), Bhandari y col. (1984), no necesita de los pretratamientos, pero debido a las altas temperaturas utilizadas, del orden de los 200°C, los problemas de corrosión en el reactor son importantes y además se obtienen productos de degradación que en principio no son deseables. En consecuencia, este procedimiento parece ser poco viable por las razones ya expuestas y por la carestía que supone recuperar el disolvente.

No obstante, aunque conocido de antiguo, se está comenzando a reutilizar HF, líquido o gas, para la hidrólisis de residuos celulósicos, Hardt y col. (1982), Selke y col. (1982). Las reacciones que se producen en este caso son:



Las ventajas que parece presentar este procedimiento son su alto rendimiento en glucosa, del orden del 90 por 100, tiempos de reacción pequeños, 30 minutos, y bajas temperaturas para la hidrólisis, 0-25°C. En cambio, sus mayores inconvenientes pueden residir en el coste del HF y en su posible toxicidad, por lo que es necesaria su recuperación. No obstante, parece

que económicamente puede ser viable, Selke y col. (1982), incluso cuando se compara con procedimientos enzimáticos.

2.1.2.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.

La hidrólisis enzimática de residuos celulósicos parece ser el camino más prometedor. Este proceso se lleva a cabo mediante un complejo enzimático formado principalmente por:

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

Generalmente se admite que las endoglucanasas, E_1 , forman complejos intermedios con las cadenas de celulosa y las hidrolizan al azar, dando lugar a cadenas más cortas, celobiosa y glucosa; que las exoglucanasas, E_2 , se unen a los extremos no reductores de la celulosa separando moléculas de celobiosa, y que las β -glucosidasas, E_3 , hidrolizan en fase homogénea la celobiosa a glucosa.

Dada la naturaleza insoluble del sustrato, la hidrólisis es una reacción heterogénea en la que las glucanasas habrán de desplazarse desde el seno de la fase acuosa hasta la superficie del sustrato, en donde se adsorben y reaccionan, produciendo cadenas más cortas de celulosa y celobiosa; esta última pasará a la disolución y aquí será hidrolizada por la β -1,4-glucosidasa.

2.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA.

El tratamiento de los datos de cinética enzimática se basa frecuentemente en la aplicación de la ecuación de Michaelis- Menten:

$$r = \frac{k e_T s}{K_M + s} \quad [2.1]$$

donde, e_T , es la concentración total de enzima activa, s , la concentración de sustrato y k y K_M parámetros cinéticos. La ecuación [2.1] no es sólo aplicable a la cinética irreversible de un sustrato, sino que también ha resultado muy útil para el ajuste de los datos experimentales de reacciones de dos o más sustratos, cuando se mantienen constantes las concentraciones de todos ellos menos una, s ; para reacciones en presencia de sustancias que actúan como activadores o inhibidores, si su concentración permanece constante, e incluso para reacciones reversibles ya que generalmente se manejan datos de velocidad inicial de reacción, Roberts (1977).

Evidentemente, para reacciones de varios sustratos o en presencia de modificadores, los parámetros cinéticos dependerán, además de la temperatura y del pH, de las concentraciones de todos ellos, menos de s . Para el ajuste de los resultados experimentales a la ecuación [2.1] se han propuesto distintas formas linealizadas de la misma que permiten su comprobación gráfica y la utilización de la regresión lineal para la determinación de los parámetros cinéticos, siendo la más popular la forma linealizada de Lineweaver-Burk.

Sin embargo, la influencia de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción no siempre responde a la dependencia hiperbólica que indica la ecuación [2.1], sino que en ocasiones se encuentran formas sigmoidales y/o con máximo, Laidler y Col. (1973), Ferdinand (1966), han demostrado que estos tipos de dependencias de la velocidad de reacción con la concentración de sustrato pueden explicarse con ecuaciones del tipo:

$$r = \frac{c_1 s + c_3 s^2}{1 + c_2 s + c_4 s^2} e_T \quad [2.2]$$

En efecto, si $c_1 c_4 > c_3 c_2$, la velocidad de reacción pasa por un máximo al aumentar la concentración de sustrato y si $c_3 > c_2 c_1$, la curva r frente a s pasa por un punto de inflexión antes del máximo.

Por otra parte, la determinación de los parámetros cinéticos mediante formas linealizadas de la ecuación [2.1] está influida de manera importante por la distorsión de los errores experimentales que la linealización provoca, particularmente la forma recíproca de Lineweaver-Burk. El procedimiento de ajuste más adecuado es la regresión no lineal, Wentworth (1965), que elimina este problema pero requiere partir de unos valores iniciales de los parámetros cinéticos suficientemente próximos a los verdaderos para que el método pueda converger.

Las ecuaciones cinéticas de las reacciones enzimáticas de los tipos [2.1], [2.2] o más complejas, se deducen a partir del mecanismo propuesto por aplicación de la aproximación de estado estacionario a cada uno de los complejos intermedios en los que interviene la enzima. La aplicación de la teoría de la perturbación singular, Lin (1974), y los métodos numéricos han puesto de manifiesto que esta aproximación es prácticamente correcta cuando las concentraciones de sustratos y modificadores son apreciablemente superiores a la concentración total de enzima, e_T , como generalmente ocurre, Lim (1973).

2.2.1 ECUACIÓN DE VELOCIDAD.

Cualquier mecanismo propuesto para una reacción enzimática homogénea supondrá un cierto número de complejos en los que interviene la enzima, sea n este número, incluyendo la enzima libre, Camacho y col. (1988).

Para obtener la ecuación de velocidad correspondiente al mecanismo considerado será necesario resolver el sistema de n ecuaciones formado por: el balance total de enzima y las $n - 1$ ecuaciones obtenidas por la aplicación de la

hipótesis de estado estacionario a cada uno de los $n-1$ complejos considerados. Este sistema de ecuaciones puede expresarse en la forma:

$$\vec{a}_{ij} \vec{e}_i = \begin{pmatrix} e_T \\ 0 \\ 0 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ 0 \end{pmatrix} \quad [2.3]$$

donde, e_T , representa la concentración total de enzima activa en la disolución; e_i , un vector columna cuyo primer elemento, e_1 , es la concentración de estado estacionario de la enzima libre y los restantes las concentraciones de estado estacionario de los $n-1$ complejos y a_{ij} , una matriz cuadrada de orden n que representa al mecanismo considerado.

La primera fila de la matriz del mecanismo, que contiene los coeficientes del balance total de enzima, es toda de unos:

$$a_{1j} = 1 \quad (j = 1, 2, \dots, n) \quad [2.4]$$

Los elementos de la diagonal de la matriz, excepto el primero,

$$a_{ii}, \text{ para } i > 1 \quad [2.5]$$

representan la suma de las etapas elementales por las que desaparece el complejo i , con signo negativo.

Los restantes elementos,

$$a_{ij}, \text{ para } i > 1 \text{ e } i \neq j \quad [2.6]$$

representan la suma de las etapas por las que el complejo j conduce al complejo i .

Los términos correspondientes a cada etapa elemental del mecanismo están expresados de acuerdo con la ley de acción de masas, excluida la concentración del complejo intermedio que interviene en la misma.

De la ecuación [2.3] se deduce:

$$e_i = (a_{ij})^{-1} \begin{pmatrix} e_T \\ 0 \\ 0 \\ \cdot \\ \cdot \\ 0 \end{pmatrix} = \frac{1}{|A|} \begin{pmatrix} A_{11} & A_{21} & \dots & A_{n1} \\ A_{12} & A_{22} & \dots & A_{n2} \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ A_{1n} & A_{2n} & \dots & A_{nn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} e_T \\ 0 \\ 0 \\ \cdot \\ \cdot \\ 0 \end{pmatrix} \quad [2.7]$$

es decir,

$$e_i = \frac{e_T}{|A|} \begin{pmatrix} A_{11} \\ A_{12} \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ A_{1n} \end{pmatrix} \quad [2.8]$$

siendo, $|A|$, el determinante de la matriz del mecanismo y, A_{ij} , el cofactor del elemento a_{ij} en ese determinante.

La velocidad de formación de un producto se obtendrá multiplicando el vector enzima, e_i , por un vector formado por los términos cinéticos correspondientes a las etapas elementales del mecanismo que conducen a la aparición de ese producto o en las que interviene, b_i .

Para reacciones irreversibles, el primer elemento de b_i será cero, ya que a partir de la enzima libre no pueden aparecer los productos de la reacción,

también serán nulos los términos correspondientes a los complejos que no se descomponen dando el producto considerado. En las reacciones reversibles, serán negativos los términos que representan las etapas elementales en que desaparece el producto.

Por tanto:

$$r_p = (b_1, b_2, \dots, b_n) \frac{e_T}{|A|} \begin{pmatrix} A_{11} \\ A_{12} \\ \cdot \\ \cdot \\ A_{1n} \end{pmatrix} = \frac{e_T}{|A|} (b_1 A_{11} + \dots + b_n A_{1n}) \quad [2.9]$$

Si a continuación se desarrolla el determinante $|A|$ por los cofactores de su primera fila, cuyos elementos son unos, se obtiene:

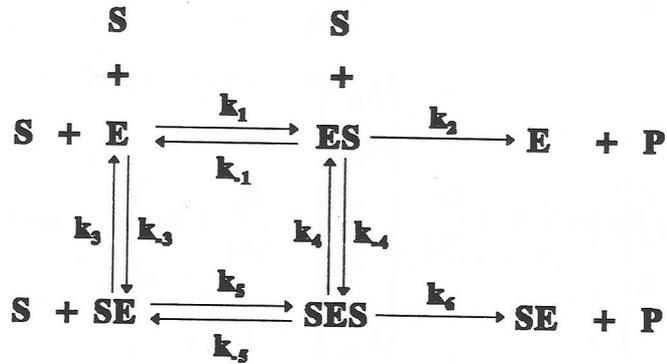
$$r_p = \frac{b_1 A_{11} + b_2 A_{12} + \dots + b_n A_{1n}}{A_{11} + A_{12} + \dots + A_{1n}} e_T \quad [2.10]$$

expresión que permite deducir la ecuación de velocidad correspondiente al mecanismo propuesto a partir del cálculo de los cofactores A_{11} , A_{12} , ..., A_{1n} del determinante de la matriz del mecanismo.

Este procedimiento, aunque equivalente en sus fundamentos al propuesto por King y col. (1956), puede resultar más sistemático y sencillo.

Puede observarse que el orden de los cofactores: A_{11} , A_{12} , ..., A_{1n} es igual al número de complejos que implica el mecanismo propuesto, $n-1$, por lo que, los cálculos van haciéndose más laboriosos a medida que aumenta este número.

A título de ejemplo, se aplicará el procedimiento descrito a un mecanismo relativamente general para explicar las diversas formas de influencia de la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción irreversible de un sustrato.



[2.11]

donde, en el complejo, SE, la molécula de sustrato no está adecuadamente orientada para la catálisis.

La matriz del mecanismo es:

| COMPLEJOS | E | ES | SE | SES |
|-----------|---------|---------------------------|---------------------|----------------------------|
| E | 1 | 1 | 1 | 1 |
| ES | $k_1 s$ | $-(k_{-1} + k_2 + k_4 s)$ | 0 | k_{-4} |
| SE | $k_3 s$ | 0 | $-(k_{-3} + k_5 s)$ | $k_{-5} + k_6$ |
| SES | 0 | k_4 | $k_5 s$ | $-(k_{-4} + k_{-5} + k_6)$ |

[2.12]

y el vector b_i :

$$b_i = (0, k_2, 0, k_6) \quad [2.13]$$

Si se calculan los coeficientes de la primera fila del determinante de [2.12]:

$$A_{11} = - (k_{-3} (k_{-1} + k_2) (k_{-4} + k_{-5} + k_6) - (k_{-3} k_4 (k_{-5} + k_6) + k_5 k_{-4} (k_{-1} + k_2)) s \quad [2.14]$$

$$A_{12} = - (k_1 k_{-3} (k_{-4} + k_{-5} + k_6)) s - (k_{-4} k_5 (k_1 + k_3)) s^2 \quad [2.15]$$

$$A_{13} = - (k_3 (k_{-1} + k_2) (k_{-4} + k_{-5} + k_6)) s - (k_4 (k_1 + k_3) (k_{-5} + k_6)) s^2 \quad [2.16]$$

$$A_{14} = - (k_1 k_4 k_{-3} + k_3 k_5 (k_{-1} + k_2)) s^2 - (k_4 k_5 (k_1 + k_3)) s^3 \quad [2.17]$$

Evidentemente, todas las constantes cinéticas no son independientes ya que el ciclo existente en el mecanismo exige que:

$$k_{-1} k_{-4} k_3 k_5 = k_1 k_4 k_{-3} k_{-5} \quad [2.18]$$

sin embargo, esta ecuación no permite simplificar de manera apreciable las expresiones anteriores.

Por consiguiente, la ecuación de velocidad resultante es:

$$r_p = \frac{c_1 s + c_3 s^2 + c_5 s^3}{1 + c_2 s + c_4 s^2 + c_6 s^3} e_T \quad [2.19]$$

siendo, $c_1, c_2 \dots c_6$, funciones de las constantes cinéticas elementales que deben ser todas positivas y cuyas expresiones pueden deducirse a partir de las ecuaciones anteriores.

2.2.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS.

Para obtener los parámetros cinéticos correspondientes a la expresión de velocidad que se haya deducido para el mecanismo propuesto, se pueden seguir dos procedimientos generales:

1) Método diferencial, consistente en determinar la velocidad de reacción, r , a diferentes valores de las variables independientes, s , p y e_T , y efectuar el ajuste a la expresión cinética considerada. La dificultad de evaluar puntualmente la velocidad de reacción hace que el método más empleado sea el de las velocidades iniciales, basado en extrapolar los valores de la velocidad determinados a tiempos reducidos al instante inicial, en el que la composición de la mezcla reaccionante es conocida con exactitud.

2) Método integral, en el que es necesario proceder a la integración de la expresión cinética propuesta, y realizar un ajuste adecuado, mediante la expresión integrada, que permita obtener los parámetros de la misma y posteriormente, de éstos, deducir los parámetros cinéticos.

2.2.2.1 MÉTODO DIFERENCIAL.

Supuesto que se dispone de una serie de resultados experimentales en los que para valores dados de las variables independientes, s_0 y e_T , se han determinado las velocidades iniciales de reacción, r_0 , como es usual, el mejor procedimiento de ajuste de los mismos a ecuaciones del tipo [2.19] es la regresión no lineal, que como ya se ha indicado evita la distorsión de los errores experimentales que puede provocar cualquier transformación de la citada ecuación.

Con objeto de obtener los valores iniciales de los parámetros cinéticos: c_1, c_2, \dots, c_6 , necesarios para aplicar la regresión no lineal, la ecuación [2.19] puede escribirse en la forma:

$$r_p = c_1 e_T s + c_3 e_T s^2 + c_5 e_T s^3 - c_2 r_p s - c_4 r_p s^2 - c_6 r_p s^3 \quad [2.20]$$

que permite un ajuste por regresión múltiple considerando las variables independientes ficticias.

$$e_T s, e_T s^2, e_T s^3, r_p s, r_p s^2, r_p s^3 \quad [2.21]$$

Los valores iniciales así obtenidos pueden mejorarse por regresión no lineal, con respecto a la función:

$$F(r_p, s, e_T) = r_p - \frac{c_1 s + c_3 s^2 + c_5 s^3}{1 + c_2 s + c_4 s^2 + c_6 s^3} e_T \quad [2.22]$$

suponiendo que el máximo error experimental está en la velocidad de reacción, como generalmente ocurre, y continuando los tanteos hasta hacer mínima la varianza externa:

$$\sigma_{\text{ext}}^2 = \frac{1}{n_1 - n_2} \sum_{i=1}^{n_1} (F(r_{p_i}, s_i, e_{T_i}))^2 \quad [2.23]$$

siendo n_1 el número de experimentos y n_2 el número de parámetros cinéticos.

De acuerdo con el fundamento teórico de la ecuación [2.19] los parámetros cinéticos, c_1 a c_6 , no pueden ser negativos, pero pueden ser nulos si alguna o algunas de las constantes cinéticas del mecanismo [2.11] lo son. En este sentido deben ensayarse también simplificaciones de la ecuación [2.19], en las que alguno o algunos de los parámetros cinéticos sean nulos, hasta encontrar la ecuación que se ajusta mejor a los resultados experimentales.

2.2.2.2 MÉTODO INTEGRAL.

En el estudio experimental de la cinética de las reacciones enzimáticas se utilizan generalmente los datos de velocidades iniciales de reacción, Laidler y col. (1973), para evitar la interferencia de los siguientes fenómenos:

- a) Inhibición de producto.
- b) Desnaturalización de la enzima.
- c) Cambio de las condiciones del medio con el transcurso de la reacción, fundamentalmente pH y fuerza iónica.
- d) Reversibilidad de la reacción. Pues la extrapolación de los datos cinéticos a tiempo cero para determinar las velocidades iniciales de reacción no es siempre fácil, Booman y Niemann (1956).

Sin embargo teniendo presente la posibilidad de que los fenómenos anteriores influyan en los resultados obtenidos, la aplicación del método integral puede permitir una correcta planificación e interpretación de los experimentos cinéticos y deducir una ecuación cinética más directamente aplicable para el diseño del reactor enzimático sobre todo si es esta última la finalidad principal del estudio cinético, en vez de profundizar en el mecanismo de reacción que ha sido el objetivo fundamental de la mayor parte de los trabajos de cinética enzimática realizado hasta hace pocos años.

Contribuye a facilitar la aplicación del método integral la circunstancia de que la forma de las ecuaciones cinéticas, de acuerdo con el conocimiento actual sobre los mecanismos por los que estas reacciones transcurren, Dixon y Webb (1979) y Roberts (1977), es semejante en todos los casos. Estas ecuaciones que han resultado muy útiles para el ajuste de los datos de velocidades iniciales de reacción son de la forma:

$$r = \frac{f_1(x)}{f_2(x)} e_T \quad [2.24]$$

donde $f_1(x)$ y $f_2(x)$ son polinomios de la conversión de sustrato cuyos coeficientes dependen de las constantes cinéticas, de la estequiometría de la reacción y de la composición inicial de la mezcla reaccionante; y e_T representa la concentración total, libre o combinada, de enzima activa.

2.2.2.3 INTEGRACIÓN DE LA ECUACIÓN DE VELOCIDAD.

Es evidente, que aunque la velocidad de una reacción enzimática puede depender de las concentraciones de sustratos, productos y de otras sustancias presentes que actúan como activadores o inhibidores, sólo aquellas cuyas concentraciones cambian con el transcurso de la reacción, sustratos y productos, influyen en la aplicación del método integral a un experimento dado. Por otra parte, si sólo se produce una reacción enzimática, las concentraciones de sustratos y productos en cada instante podrán expresarse en función de la composición inicial y de una sola variable que indique la extensión en que la reacción se ha producido hasta ese momento, como expresa la ecuación [2.24] con respecto a la conversión.

No obstante, si en las condiciones de reacción se produce desnaturalización de la enzima, circunstancia bastante frecuente en la utilización "in vitro" de estos catalizadores biológicos, la concentración total de enzima activa cambiará con el tiempo e influirá también en la aplicación del método integral.

Si se considera una reacción enzimática irreversible de un sustrato, Camacho y col. (1988):



y se refiere la conversión al producto total equivalente

$$P_T = P_0 + \alpha S_0 = P + \alpha S \quad [2.26]$$

las concentraciones de sustrato y producto en cada instante vendrán dadas por:

$$P = x P_T \quad [2.27]$$

$$S = \frac{P_T}{\alpha} (1 - x) \quad [2.28]$$

de acuerdo con los mecanismos usualmente propuestos para las reacciones enzimáticas, la velocidad de desaparición de sustrato puede expresarse en la forma:

$$r = - \frac{dS}{dt} = \frac{P_T}{\alpha} \frac{dx}{dt} = e_T f(x, P_T) \quad [2.29]$$

con lo que separando las variables e integrando:

$$\int_0^t e_T dt = \frac{P_T}{\alpha} \int_{x_0}^x \frac{dx}{f(x, P_T)} \quad [2.30]$$

para la aplicación del método integral será necesaria la resolución de las dos integrales de esta ecuación, la primera depende de la cinética de la desnaturalización de la enzima y la segunda de la forma de la ecuación de velocidad de la reacción enzimática.

2.2.2.4 DESNATURALIZACIÓN DE LA ENZIMA.

El primer miembro de la ecuación [2.30]

$$y = \int_0^t e_T dt = F(e_0, t) \quad [2.31]$$

donde e_0 representa la concentración total de enzima activa a tiempo cero, y depende, como ya se ha indicado, de la cinética de la desnaturalización de la enzima en las condiciones de operación. Los procesos de desnaturalización de proteínas transcurren generalmente por mecanismos complejos, Hijazi y col. (1972) y Ikai y col. (1971), aunque su cinética se suele ajustar a ecuaciones del tipo:

$$-\frac{de_T}{dt} = k_d e_T^n \quad [2.32]$$

variando n de 0 a 5, Laidler y col. (1973), lo que confirma la complejidad ya indicada.

La integración de esta última ecuación permite obtener la expresión de la concentración de enzima activa en función del tiempo y de su valor inicial, que sustituida en [2.31] e integrando de nuevo permite calcular el valor de y . Las ecuaciones obtenidas son:

Para $n = 1$

$$y = \frac{e_0}{k_d} [1 - \exp(- k_d t)] \quad [2.33]$$

Para $n = 2$

$$y = \frac{1}{k_d} [\ln (1 + k_d e_0 t)] \quad [2.34]$$

Para $n \neq 1$ y $n \neq 2$

$$y = \frac{e_0^{2-n}}{(2-n) k_d} \left[1 - [1 - (1 - n) e_0^{n-1} k_d t]^{\frac{2-n}{1-n}} \right] \quad [2.35]$$

Si se define un factor de eficacia para el aprovechamiento de la enzima, Y , mediante la ecuación:

$$y = Y e_0 t \quad [2.36]$$

donde $Y = 1$ si no se produce desnaturalización, y se introduce un tiempo adimensional:

$$\theta = k_d e_0^{n-1} t \quad [2.37]$$

las ecuaciones [2.33], [2.34] y [2.35] pueden expresarse en la forma:

Para $n = 1$

$$Y = \frac{1}{\theta} [1 - \exp (- \theta)] \quad [2.38]$$

Para $n = 2$

$$Y = \frac{1}{\theta} \ln (1 + \theta) \quad [2.39]$$

Para $n \neq 1$ y $n \neq 2$

$$Y = \frac{1}{(2-n)\theta} \left[1 - [1 - (1-n)\theta]^{1-n} \right] \quad [2.40]$$

Se debe tener presente que si $n < 1$ la enzima se desactiva totalmente en un tiempo finito, aunque las cinéticas de orden menor de uno no suelen mantenerse hasta la desaparición total del reactivo, este tiempo y el correspondiente valor de Y vienen dados por:

$$\theta_c = \frac{1}{1-n} \quad Y_c = \frac{1-n}{2-n} \quad [2.41]$$

por lo que la ecuación [2.40] no es aplicable para $n < 1$ y tiempos superiores a θ_c ; cualquier exceso de tiempo sobre este valor sería inútil para la transformación enzimática deseada y sólo contribuiría a disminuir el valor del factor de eficacia.

$$Y = \frac{1}{e_0 t} \int_0^{t_c} e_T dt \quad \text{Para } n < 1 \text{ y } t > t_c \quad [2.42]$$

ecuación que puede expresarse en la forma:

$$Y = \frac{1}{(2-n)\theta} \quad \text{Para } n < 1 \text{ y } \theta > \theta_c \quad [2.43]$$

Mediante las expresiones obtenidas para el factor de eficacia se ha construido el gráfico de la figura 2.3 que permite el cálculo de Y a partir de e_0 , t y de los parámetros cinéticos de la reacción de desnaturalización: k_d y n . Por tanto puede calcularse el valor de Y , útil para investigar la cinética de la reacción enzimática y para el diseño de reactores enzimáticos.

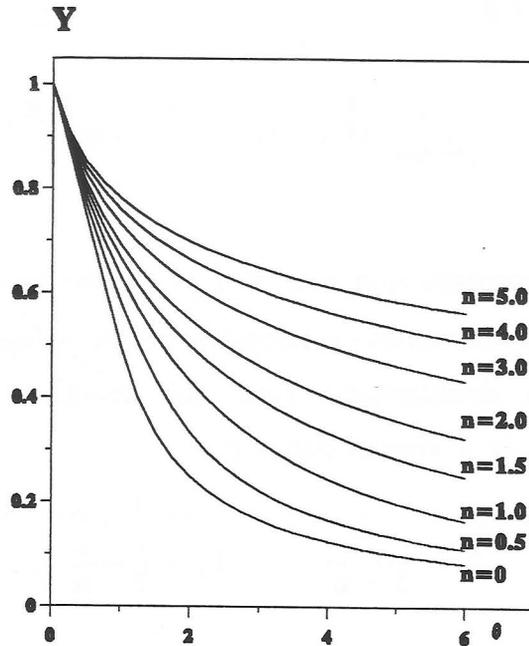


Figura 2.3

Generalmente el estudio experimental de la desnaturalización de enzimas se lleva a cabo en las mismas condiciones: T, pH y fuerza iónica, en que se produce la reacción enzimática, pero en ausencia de sustrato. Sin embargo, es frecuente que el sustrato influya en el proceso de desnaturalización, Laidler y col. (1973), y por tanto conviene poder obtener información sobre la desnaturalización de la enzima mediante experimentos en que se produzca la reacción enzimática. En este sentido se puede realizar una serie de experimentos a:

$$e_0 t = \text{constante} = A_1 \quad [2.44]$$

pero variando el tiempo y por consiguiente la concentración de enzima, figuras 2.4 y 2.5.

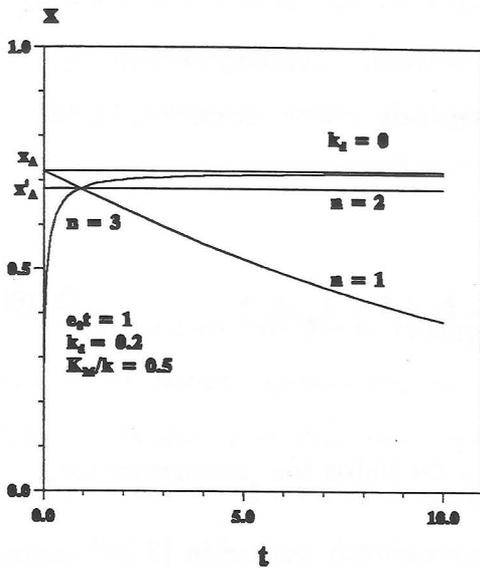


figura 2.4

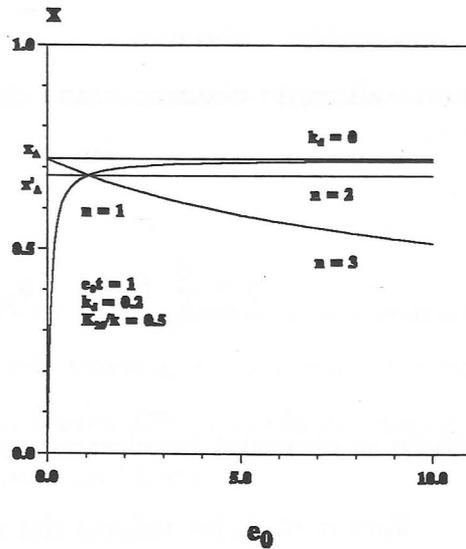


Figura 2.5

Estas figuras se han construido, a título de ejemplo, para una reacción enzimática que responde a la ecuación cinética de Michaelis-Menten y una composición inicial:

$$S_0 = K_M \quad P_0 = 0 \quad [2.45]$$

con lo que teniendo en cuenta las ecuaciones [2.27] a [2.31] se puede efectuar la segunda integral de [2.30] que conduce a:

$$y = \int_0^t e_T dt = \frac{K_M}{k} [x - \ln(1 - x)] \quad [2.46]$$

Se observa en estas figuras que si no se produce desnaturalización de la enzima, $k_d = 0$ en todos los experimentos:

$$y = e_0 t = A_1 \quad [2.47]$$

la conversión obtenida, x_A , será la misma. Análogamente si la desnaturalización obedece a una cinética de segundo orden, ecuación [2.34].

$$y = \frac{1}{k_d} \ln (1 + k_d e_0 t) = \frac{1}{k_d} \ln (1 + k_d A_1) \quad [2.48]$$

también se obtendrá la misma conversión, x'_A , en todos los experimentos.

Para $n < 2$, los valores del tiempo adimensional, ecuación [2.37] serán:

$$\theta = k_d e_0^{n-1} t = k_d A_1^{n-1} t^{2-n} = k_d e_0^{n-2} A_1 \quad [2.49]$$

es decir, que aumentan al aumentar t y disminuyen al aumentar e_0 , puesto que Y disminuye siempre al aumentar θ (figura 2.3), esto significa que la conversión disminuye al aumentar el tiempo (figura 2.4), y aumenta al aumentar e_0 , (figura 2.5). Un razonamiento semejante permite explicar la forma de las líneas correspondientes a $n > 2$ de las figuras 2.4 y 2.5

Si la línea de $n < 2$ de la figura 2.4 se extrapola a tiempo cero, el valor de la conversión obtenida, x_A , corresponderá a:

$$\theta = \theta_0 \quad Y = 1 \quad y = e_0 t = A_1 \quad [2.50]$$

Análogamente, si la línea de $n > 2$ de la figura 2.5 se extrapola a e_0 igual a cero, el valor de x_A obtenido corresponde a las mismas condiciones anteriores. Este método permite obtener una pareja de datos (y,x)

Obsérvese que la extrapolación a tiempo cero de la línea $n > 2$ de la figura 2.4 y la extrapolación a un valor nulo de e_0 de la línea de $n < 2$ de la figura 2.5 conducen a:

$$\theta = \infty \quad Y = y = x = 0 \quad [2.51]$$

Si a continuación se realizan dos series de experimentos a concentración inicial de enzima constante, B_1 y B_2 respectivamente, y variando el tiempo hasta conseguir conversiones superiores a x_A , figura 2.6, es evidente que en los puntos 1 y 2 de esta figura se cumplirá la ecuación [2.35]

$$A_1 = \frac{B_1^{2-n}}{(2-n) k_d} \left[1 - [1 - (1-n) B_1^{n-1} k_d t_1]^{\frac{2-n}{1-n}} \right] \quad [2.52]$$

$$A_1 = \frac{B_2^{2-n}}{(2-n) k_d} \left[1 - [1 - (1-n) B_2^{n-1} k_d t_2]^{\frac{2-n}{1-n}} \right] \quad [2.53]$$

sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas que por métodos iterativos permite el cálculo de n y k_d .

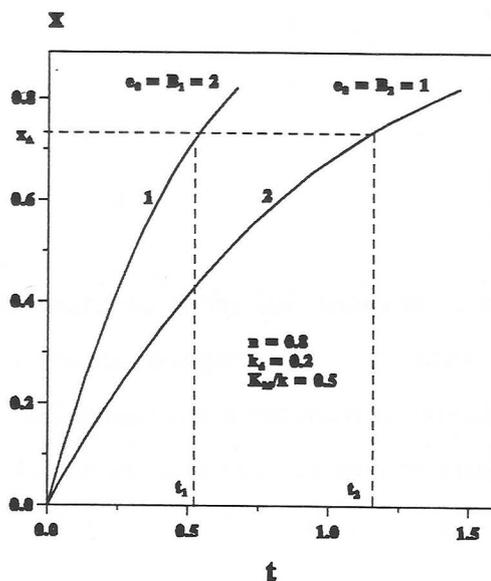
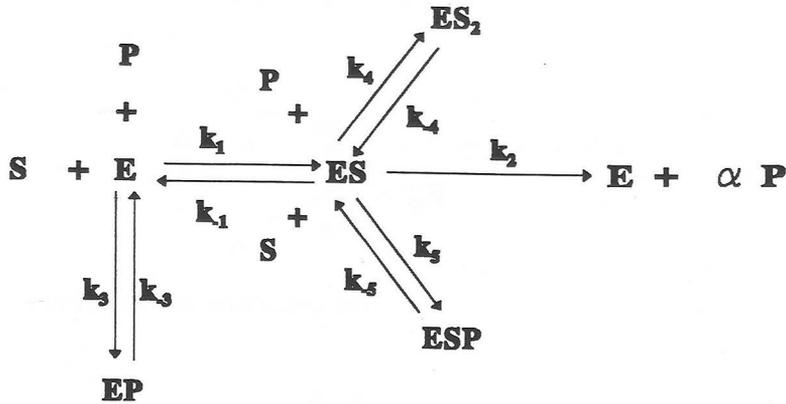


Figura 2.6

Los valores obtenidos pueden confirmarse con todos los resultados experimentales de las tres series realizadas calculando para cada experimento: θ (ecuación [2.37]), Y (figura 2.3) e y mediante la ecuación [2.38]; si se representan los valores de la conversión, x , frente a los de y todos los puntos experimentales de las tres series deben quedar en la misma línea.

2.2.2.5 INHIBICIÓN DE SUSTRATO Y DE PRODUCTO.

Para la integración del segundo miembro de la ecuación [2.30] es necesario suponer el mecanismo por el que tiene lugar la reacción [2.25]; un mecanismo bastante general para este tipo de reacciones es:



[2.54]

que incluye inhibición de sustrato e inhibición mezclada de producto, aunque para simplificar se supone que los dos complejos triples existentes no son útiles para la formación de producto.

La aplicación de la aproximación de estado estacionario para todos los intermedios del esquema [2.54] conduce a la siguiente ecuación de velocidad:

$$r = \frac{k_s S}{1 + K_s S + K_{s2} S^2 + K_p P + K_{sp} S P} e_T \quad [2.55]$$

donde las constantes aparentes vienen dadas por:

$$k_s = \frac{k_2 k_1}{k_{-1} + k_2} \quad [2.56]$$

$$K_s = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} \quad [2.57]$$

$$K_{SP} = \frac{k_5 k_1}{k_{-5} (k_{-1} + k_2)} \quad [2.58]$$

$$K_P = \frac{k_3}{k_{-3}} \quad [2.59]$$

$$K_{S2} = \frac{k_4 k_1}{k_{-4} (k_{-1} + k_2)} \quad [2.60]$$

La sustitución en la ecuación [2.55] de las expresiones para P, S y r en función de la conversión, ecuaciones [2.27] a [2.29] permite obtener la función $f(x, P_T)$ y resolver la segunda integral de [2.30].

$$y = A \ln \frac{1 - x_0}{1 - x} + B (x - x_0) + D (x^2 - x_0^2) \quad [2.61]$$

donde:

$$A = \frac{1}{k_S} (1 + K_P P_T) \quad [2.62]$$

$$B = \frac{1}{k_S} \left[\left(\frac{K_S}{\alpha} - K_P \right) P_T + \frac{K_{S2}}{\alpha^2} P_T^2 \right] \quad [2.63]$$

$$D = \frac{1}{k_S} \left[\left(\frac{K_{SP}}{\alpha} - \frac{K_{S2}}{\alpha^2} \right) \frac{P_T^2}{2} \right] \quad [2.64]$$

Si se realizan series de experimentos en las que para un valor dado de P_T y $x_0 = 0$ se determina como varía la conversión con y , la ecuación [2.61] se puede expresar en la forma:

$$\frac{y}{x} = A \frac{-\ln(1-x)}{x} + B + D x \quad [2.65]$$

ecuación que presenta un mínimo en:

$$\frac{\frac{x_{\min}}{1-x_{\min}} + \ln(1-x_{\min})}{x_{\min}^2} = -\frac{D}{A} \quad [2.66]$$

siempre que D sea negativo y se cumpla:

$$-D > \frac{A}{2} \quad [2.67]$$

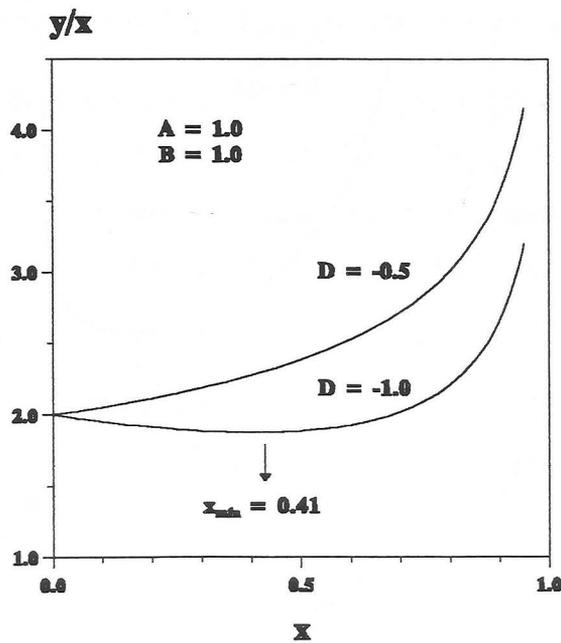


Figura 2.7

como se observa en la figura 2.7. Por otra parte, la extrapolación a conversión cero en esta representación conduce a:

$$\left[\frac{y}{x} \right]_{x=0} = A + B \quad [2.68]$$

que proporciona otra relación entre los parámetros de [2.61].

Una tercera relación entre dichos parámetros se puede obtener mediante la representación de y/x^2 frente x , figura 2.8.

$$\frac{y}{x^2} = A \frac{-\ln(1-x)}{x^2} + B \frac{1}{x} + D \quad [2.69]$$

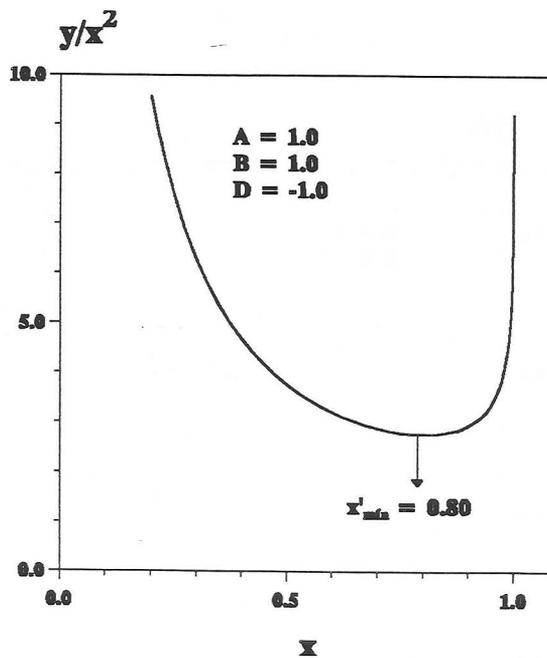


Figura 2.8

que debe presentar siempre un mínimo en un valor de la conversión dado por:

$$\frac{\frac{x'_{\min}}{1 - x'_{\min}} + 2 \ln (1 - x'_{\min})}{x'_{\min}} = \frac{B}{A} \quad [2.70]$$

Las representaciones indicadas en las figuras 2.7 y 2.8, y las ecuaciones [2.66], [2.68] y [2.70], permiten comprobar si la ecuación cinética [2.55] es adecuada para representar los resultados experimentales obtenidos y, si es así, determinar los valores iniciales de los parámetros A, B y D que pueden mejorarse posteriormente por regresión no lineal.

En el caso de que no se detectara un mínimo en la representación de y/x frente a x , o éste fuera poco pronunciado se podría utilizar en lugar de la ecuación [2.66], una relación entre A, B y D proporcionada por la ecuación [2.65], para unos valores dados de x , por ejemplo sustituyendo el valor de y obtenido para una conversión 0.5 en una representación gráfica de $y-x$.

La variación de los valores de estos parámetros con la concentración inicial de sustrato o su equivalente, P_T , permite confirmar la validez del modelo y determinar los valores de las constantes que aparecen en la ecuación [2.55] como se observa en la figura 2.9 basada en las ecuaciones [2.62] a [2.64].

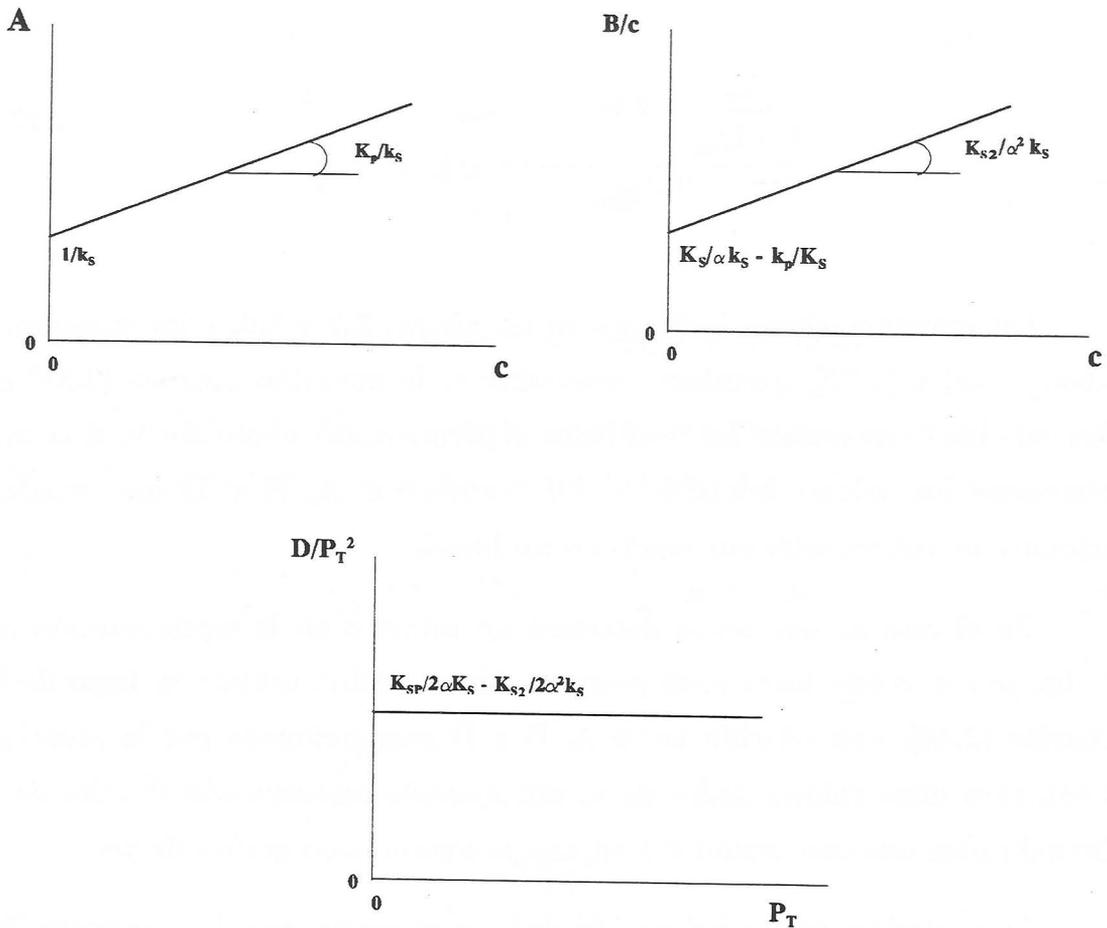


Figura 2.9

2.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CELULOSA.

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

- Transferencia de las moléculas de enzima desde el seno de la fase acuosa hasta la superficie de las partículas de celulosa.
- Formación del complejo enzima-sustrato (ES) por adsorción de las moléculas de enzima.

- Adsorción del agua sobre los centros activos del complejo ES y reacción superficial entre el H_2O y la celulosa.
- Transferencia de los productos de reacción solubles (glucosa y celobiosa fundamentalmente) hasta el seno de la fase acuosa.
- Hidrólisis en fase homogénea de la celobiosa a glucosa por acción de la β -1,4-glucosidasa.

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

En cualquier caso la cinética de la hidrólisis enzimática de la celulosa dependerá fundamentalmente de la estructura interna del sustrato, de la naturaleza del sistema enzimático, de las interacciones enzima-sustrato y del efecto inhibitor que pueda existir por parte de los productos, del sustrato o de las sustancias extrañas presentes en el medio.

Para evaluar la influencia de la naturaleza del sustrato y de la enzima sobre la velocidad de hidrólisis se han planteado distintos modelos cinéticos. Éstos se pueden clasificar en dos grandes grupos, según traten al complejo enzimático y al sustrato como sustancias únicas o bien formadas por varios componentes, lo que es más correcto, ya que se aproxima al fenómeno real. También se han propuesto algunos modelos empíricos, Holtzapple y col. (1984).

En el primer caso, lo usual es considerar una cinética enzimática simple con inhibición competitiva de producto; es decir, se admite que la reacción transcurre según el siguiente mecanismo:



donde S y E representan al sustrato y a la enzima, respectivamente, SE a un complejo intermedio, P a los productos de la reacción y PE al complejo responsable de la inhibición de producto.

Mediante el modelo anterior explican sus resultados Howell y col. (1975), Koichiro y col. (1982) y Huang (1975), entre otros autores. En general, este modelo ajusta los resultados experimentales a conversiones de sustrato bajas y complejos celulolíticos muy deficientes en β -glucosidasas, es decir, cuando la reacción homogénea esta minimizada. Por ello, es lógico que a conversiones altas, mayores del 50 por 100, la desviación entre resultados teóricos y experimentales sea notable. Howell (1978), intenta explicar este hecho admitiendo una cierta desnaturalización de la enzima y la formación de un complejo triple muerto. Sin embargo, los tiempos de reacción y las condiciones de operación, pH y temperatura, no parecen ser lo suficientemente drásticas como para provocarla; en consecuencia, parece lógico pensar que las desviaciones del modelo están provocadas por la compleja naturaleza del sustrato y de la enzima.

Moo-Young y col. (1977), Suga y col. (1975), Okazaki y col. (1978) y Lee y col. (1978), han realizado una aproximación teórica a la hidrólisis enzimática de la celulosa considerando que la enzima está formada por tres componentes; en cuanto al sustrato, estiman que, independientemente de su naturaleza y estructura inicial, durante la hidrólisis se van a ir formando cadenas de celulosa de longitud variable. Las tres enzimas, según estos autores, actúan simultáneamente; así E_1 forma un complejo enzima-sustrato con las moléculas de celulosa rompiéndolas al azar y liberan cadenas más cortas, celobiosa y glucosa; E_2 forma un complejo con los extremos no reductores

separando celobiosa y E_3 hidroliza ésta a glucosa. Las tres enzimas pueden presentar inhibición competitiva o no competitiva, por parte de la celobiosa y de la glucosa.

La ecuación cinética para la degradación de la celulosa obtenida según las hipótesis anteriores resulta extremadamente compleja por el número de parámetros y de concentraciones que aparecen en su formulación. Por ello, aunque este modelo supone una aproximación teórica, razonada y fundamentada al proceso de hidrólisis, parece inviable desde un punto de vista práctico.

Una solución intermedia entre el primero y el segundo grupo de modelos, es la propuesta por Wald y col. (1984). Consideran al sustrato formado por una fracción amorfa y otra cristalina y no distinguen entre la acción de E_1 y E_2 . Es decir, admiten que E_2 y E_1 , liberan la celobiosa que se hidroliza en fase homogénea a glucosa por acción de la β -glucosidasa.

A la vista de lo anteriormente expuesto se deduce que es necesario atenuar la inhibición de producto para conseguir un mayor aprovechamiento de la enzima. Esto se puede conseguir mediante alguno de los siguientes procedimientos:

1. Mediante la adición de β -glucosidasa al sistema, ya que de esta forma se alivia la inhibición de la celobiosa sobre la actuación de las endo y exoglucanasas, Pemberton y col. (1980), Desrochers y col. (1981). En este sentido la obtención de β -1,4-glucosidasa a partir de *Aspergillus* es interesante, ya que este microorganismo es más económico en su producción.

2. Realizar la hidrólisis y fermentación, etanólica o a SCP, simultáneamente, ya que de esta forma se retiran glucosa y celobiosa del medio, por lo que se disminuye la inhibición de producto. Los inconvenientes de este método de operación residen en que las paredes celulares de las levaduras pueden ser atacadas por la enzima y en la inhibición que produce el

etanol sobre la obtención de celulasas, Pemberton y col. (1980), Ghose y col. (1984), Reese y col. (1980).

En la actualidad las cantidades de enzimas necesarias y su costo de producción son la mayor barrera a vencer si se pretende que la hidrólisis enzimática sea económicamente viable, Mandels (1982). En consecuencia, es necesario idear nuevos métodos para que la utilización de la enzima, durante los procesos de hidrólisis, sea óptima. En este sentido se han propuesto, además de los ya mencionados con respecto a la inhibición de producto, distintos caminos:

Inmovilizar las celulasas. Es poco útil, ya que se trata de un sustrato insoluble y, en consecuencia, la superficie de contacto enzima-sustrato será pequeña; esta solución sólo parece ser viable para hidrolizar los jarabes, obtenidos en la etapa heterogénea, mediante glucosidasas inmovilizadas, Bissett y col. (1978), Sundstrom y col. (1981), Woodward y col. (1982), Karube y col. (1977), ya que de esta forma se reduce la inhibición producida por la celobiosa sobre E_1 y E_2 y de la glucosa sobre E_3 .

Recuperar las enzimas. La reutilización de las enzimas que permanecen en el jarabe de hidrólisis, precipitándolas o adsorbiéndolas sobre sustrato fresco o por ultrafiltración, Castanon y col. (1980), Peitersen y col. (1977), presenta el inconveniente de que las celulasas se adsorben fuertemente sobre el sustrato, Peitersen y col. (1977), Lee y col. (1982), Binder y col. (1978), por lo que sólo una pequeña fracción de exo y endoglucanasas permanece en disolución.

Modificar las características superficiales del sustrato mediante la adición de sustancias externas. En este sentido son destacables los trabajos de Castanon y col. (1980 y 1981), con Twen 80; la adición de este tensioactivo incrementa la recuperación de la enzima y el grado de hidrólisis.

2.3.1 PRODUCCIÓN DE CELULASAS.

Las celulasas más activas son aquellas que provienen del *Trichoderma viride* o *resei*, *T. lignorum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* y *T. longibrachiatum*, Mandels (1982). Todos estos microorganismos sufren represión por parte de algunos catabolitos y sobre todo por parte de la glucosa; de ahí que la producción de celulasas se realice, generalmente, fuera de los procesos de hidrólisis propiamente dichos, Mandels (1982), Moreira y col. (1981).

De los microorganismos mencionados, el *T. Viride* es el más utilizado, ya que produce celulasas relativamente equilibradas en cuanto a su composición, y su rendimiento es alto. Sin embargo, es frecuente que las celulasas sean deficientes en β -1,4-glucosidasa; por ello se está tratando de mejorar las fuentes de celulasas. Así, en bibliografía aparecen trabajos en donde se utilizan nuevos mutantes o nuevos hongos celulolíticos, tales como el *Aspergillus foetidus*, Sadana y col. (1979) y el *A. niger*, Clarke y col. (1965). Los resultados obtenidos indican que las celulasas provenientes de los *Aspergillus* tienen un alto contenido en β -glucosidasa, pero son deficientes en exoglucanasas.

Por otra parte, la producción de celulasas a partir de *Actomicetes thermofillicus*, como el *Thermonospora sp.*, tiene el inconveniente de dar lugar a unas endo y exoglucanasas que parecen estar fuertemente inhibidas por la celobiosa; además, sus β -glucosidasas son térmicamente inestables, Mandels (1982), Meyer y col. (1982).

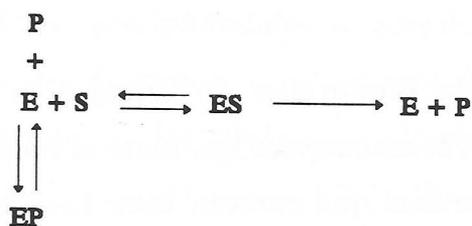
En la actualidad las investigaciones se dirigen a encontrar microorganismos celulolíticos, termofílicos, aerobios o anaerobios, capaces de producir celulasas en cantidad suficiente y equilibradas en su composición, para realizar la hidrólisis y fermentación simultáneamente. En este sentido, los resultados obtenidos con el *Chaetoniium cellulolyticum* en la obtención de SCP y con el *Clostridium thermocellum*, Zertuche y col. (1982), Herrero y col.

(1980), García Martínez y col. (1980), y *Thermoanaerobium brockii*, Ben-Bassat y col. (1981), Lamed y col. (1980), en la producción de etanol, parecen ser prometedores.

2.3.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA HOMOGÉNEA DE DERIVADOS DE CELULOSA.

Con objeto de poder profundizar en el mecanismo de las reacciones enzimáticas que tienen lugar en la hidrólisis de celulosa, evitando la complejidad del sistema heterogéneo, se han realizado estudios cinéticos con carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato dada su solubilidad en agua.

Poulsen y Petersen (1985) estudian la hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa utilizando un extracto crudo de *cellulomonas sp.* ATC 21399 a diferentes diluciones, es decir a diferentes valores de la concentración inicial de enzima e_0 . Para la interpretación de sus resultados utilizan la ecuación integrada de Huang para inhibición competitiva de producto:



[2.73]

que tiene la forma:

$$Y = \alpha_1 X + b_1 \quad [2.74]$$

donde Y y X pueden obtenerse a partir de los resultados experimentales:

$$Y = \frac{t}{[P]} \quad X = \frac{1}{[P]} \ln \frac{S_0}{S_0 - [P]} \quad [2.75]$$

y los valores α_1 y b_1 son funciones lineales de $1/e_0$.

Fujii y Shimizu (1986), en el estudio experimental de derivados solubles de celulosa: carboximetilcelulosa e hidroxietilcelulosa con celulasas constituidas por endo y exoenzimas separadas de *Tridoderma Koningii*, encuentran que se produce sinergismo entre ambos tipos de enzimas en las primeras etapas de la reacción; sin embargo a partir de un peso molecular crítico de 4000 Da la acción de la endoenzima puede despreciarse y la ecuación cinética responde sólo a la acción de la exoenzima para lo cual los parámetros cinéticos cambian linealmente con el peso molecular medio del sustrato.

Jain y Wilkins (1987) estudian la hidrólisis de carboximetilcelulosa y de serrín de madera de pino con un preparado comercial de celulasas, Celluclast 200L tipo N de los laboratorios NOVO, procedente de *Trichoderma reesei*, inmovilizadas sobre soportes derivados de nylon y encuentran un pH óptimo de 5 para ambos sustratos, si bien la temperatura óptima es del orden de 40°C para la carboximetilcelulosa y de 60°C para el serrín de madera de pino.

Camacho y col. (1987) estudian la hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa con celulasas procedentes de *Trichoderma viride* a pH = 4.9 y 40°C. Sus resultados indican la aparición de un sinergismo independiente de la concentración de sustrato que es más acusado a medida que aumenta la concentración inicial de celulosa y disminuye con el tiempo de hidrólisis. En un trabajo posterior, (1987), estudian la cinética de esta reacción y proponen un modelo de dos reacciones en serie con inhibición competitiva de producto en ambos casos.



Lo que sugiere que el sistema puede representarse por la acción combinada de la exoenzima y del la β -1,4-glucosidasa. Este modelo permite evaluar la conversión obtenida en función del producto e,t con una desviación inferior al 10%.

Kim (1995), caracteriza una endogluconasa de *Bacillus circulans* con una alta actividad para la hidrólisis de carboximetilcelulosa y especialmente resistente a la desnaturalización térmica. Sus condiciones ópticas de operación son pH = 4.5 y 50°C. Los parámetros de la ecuación de Michaelis - Menten determinados para la hidrólisis de carboximetilcelulosa con esta enzima son: $K_M = 0.87 \text{ mg/mL}$ y $r_m = 210 \text{ } \mu\text{mol}/(\text{min.mg})$.

2.3.3 HIDROLISIS ENZIMATICA DE CELOBIOSA.

Dada la gran variedad de procedencias para la enzima β -glucosidasa (hongos, bacterias y tejidos vegetales), así como la abundancia de información bibliográfica, resulta difícil unificarla y obtener conclusiones de validez general.

A título de ejemplo, en la tabla 2.3, se presenta un resumen de los parámetros característicos correspondientes a β -glucosidasa de diferentes orígenes, pudiéndose observar las notables diferencias en sus valores.

Tabla 2.3 Parámetros característicos de β -glucosidasa.

| HONGOS | pH _{ópt} | T _{ópt} | K _M | r _{max} | Referencia |
|------------------|-------------------|------------------|----------------|------------------|-------------------------|
| <i>T. viride</i> | --- | --- | 1.5 | -- | Sternberg , (1976) |
| <i>T. viride</i> | 4.75 | 50 | 2.6 | -- | Gong y col. (1977) |
| <i>T. viride</i> | 4.80 | 50 | 5.6 | -- | Hong y col. (1981) |
| <i>T. reesei</i> | 6.50 | --- | 3.3 | -- | Inglin y col. (1980) |
| <i>T. reesei</i> | 4.80 | 50 | 1.9 | -- | Woodward y col. (1981) |
| <i>T. reesei</i> | 4.50 | 70 | 0.5 | 55.0 | Schmid y col. (1987) |
| <i>T. reesei</i> | --- | --- | 1.2 | 1.1 | Estrada y col. (1990) |
| <i>T. reesei</i> | --- | --- | 2.6 | -- | Martín y col. (1988) |
| <i>T. reesei</i> | --- | --- | 1.31 | -- | Bravo y col. (1991) |
| <i>T. ressei</i> | 4.6 | 65-70 | 2.1 | 43.5 | Chen y col. (1992) |
| <i>A. niger</i> | 5-5.5 | 60 | 2.0 | 1.39 | Singh y col. (1990) |
| <i>A. niger</i> | 4.5 | 60-70 | 5.6 | 33.7 | Dekker, (1986) |
| <i>A. niger</i> | --- | --- | 2.7 | 0.5 | Beltrame y col. (1984) |
| <i>A. niger</i> | --- | --- | 2.5 | -- | Mandenius y col. (1988) |
| <i>A. niger</i> | --- | --- | 1.7 | 0.14 | Grous y col. (1985) |
| <i>A. niger</i> | 3.5-6 | --- | 1.7 | 0.3 | Woodward y col. (1982) |
| <i>A. niger</i> | --- | --- | 1.1 | 20.8 | Alfani y col. (1987) |

Tabla 2.3 (cont.) Parámetros característicos de β -glucosidasa.

| HONGOS | pH _{ópt} | T _{ópt} | K _M | r _{max} | Referencia |
|--------------------------|-------------------|------------------|----------------|------------------|-------------------------|
| <i>T. clypeatus</i> | 5.0 | 65 | 1.20 | 91.00 | Sengupta y col. (1991) |
| <i>T. pullulans</i> | --- | --- | 10.4 | 1.90 | Adami y col. (1988) |
| <i>N. frontalis</i> | --- | --- | 0.05 | 5.88 | Li y col. (1991) |
| <i>H. grisea</i> | 6.0 | 50 | 0.6 | 14.88 | Peralta y col. (1990) |
| <i>P. etchellsii</i> | 6.5 | 50 | 12.2 | --- | Jain y col. (1984) |
| <i>B. oxiporus</i> | 4.8 | 50 | 580.0 | --- | Caminal y col. (1985) |
| <i>P. funiculosum</i> | --- | --- | 2.0 | 0.40 | Rao y col. (1983) |
| <i>A. phoenicis</i> | 4.3 | --- | 0.75 | --- | Sternberg y col. (1977) |
| <i>A. phoenicis</i> | 4.5 | --- | 0.8 | --- | Bisset y col. (1978) |
| <i>A. phoenicis</i> | 3 - 5 | --- | 0.75 | --- | Sundstrom y col. (1981) |
| <i>A. fumigatus</i> | 4 - 5 | --- | 0.84 | --- | Rudick y col. (1975) |
| BACTERIAS | | | | | |
| <i>T. ethanolicus</i> | 5 - 7 | 70 | 4.2 | --- | Mitchell y col. (1982) |
| <i>C. thermocellum</i> | 6.0 | 65 | 83.0 | --- | Ait y col. (1979) |
| <i>B. succinogenes</i> | 6.8 | --- | 4.3 | --- | Groleau y col. (1981) |
| TEJIDOS VEGETALES | | | | | |
| Almendras | 5.5 | --- | 9.3 | 3.17 | Sarkar y col. (1983) |
| | 5.6 | --- | 2.3 | 4.17 | Miyairi y col. (1978) |
| | 5.6 | --- | 117 | --- | Vernardos y col. (1980) |
| | --- | --- | 110 | --- | Camacho y col. (1987) |

Así, se deduce que el pH óptimo está comprendido entre 3 y 7 y la temperatura óptima entre 50 y 75°C siendo la primera la más frecuente. La afinidad frente a la celobiosa, medida por el parámetro cinético K_M varía ampliamente según la β -glucosidasa utilizada.

La velocidad máxima de reacción, r_{max} , varía también de forma apreciable, aunque estas variaciones no siempre concuerdan con las observadas en K_M .

Así, por ejemplo, Woodward y Arnold (1981), cuando utilizan β -glucosidasa procedente de *T. reesei* encuentran que hay inhibición competitiva por glucosa. Estudian la influencia del pH sobre esta inhibición y observan que es máxima a pH de 4.8, no observándose inhibición para $pH \geq 6.5$.

Hong y col. (1981), con celobiosa aislada de una preparación comercial de celulasas (MILES) procedentes de *T. viride*, encuentran inhibición de sustrato para concentraciones de celobiosa por encima de 10 mM, siendo la velocidad de reacción máxima para una concentración de celobiosa de 15 mM. Con respecto al producto indican que se trata de una inhibición no competitiva.

Sundstron y col. (1981), estudian la hidrólisis enzimática de celobiosa a glucosa utilizando β -glucosidasa procedente de *A. phoenicis*, tanto libre como inmovilizada sobre alúmina de poro controlado, para analizar la conversión de celobiosa a glucosa. Ajustan sus datos en los dos casos a una cinética simple de Michaelis-Menten, e indican que para altas concentraciones de celobiosa los resultados se desvían de este modelo debido a inhibición por sustrato.

Jain y Ghose (1984), estudian la hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa procedente de *Pichia etchellsii* libre e inmovilizada por atrapamiento sobre alginato cálcico, siendo su pH y temperatura óptimos de 6.5 y 50°C respectivamente para los dos casos. El estudio cinético con la enzima inmovilizada lo realizan en un reactor de lecho fijo y encuentran que la glucosa inhibe la reacción de forma no competitiva.

Grous y col. (1985), utilizan en su investigación β -glucosidasa procedente de *A. niger*, Cellobiasa 250L, preparado comercial de la casa NOVO, con alta actividad, y encuentran inhibición fuerte por sustrato e inhibición competitiva de producto. También utilizan celobiasa procedente de una cepa de *T. reesei*, Rut C-30, pero con esta enzima no encuentran inhibición por sustrato, aunque sí por producto, de caracter competitivo.

Dekker (1986), utiliza un preparado comercial de NOVO, Novozym 188, que contiene β -glucosidasa procedente de *A. niger*. Este preparado se purifica para eliminar la glucosa y después se concentra por ultrafiltración. El estudio cinético se realiza en el rango de 0.1 mM-9.5 mM de celobiosa y no encuentran inhibición por sustrato.

Camacho y col. (1987), estudian la hidrólisis enzimática de celobiosa con β -1,4-glucosidasa procedente de almendras a 50°C y pH = 5.2. Los resultados experimentales indican que la afinidad de esta enzima por la celobiosa es considerablemente inferior que las de las β -glucosidasas procedentes de hongos o bacterias. En las condiciones de operación y al menos durante una hora no aprecian desnaturalización de la enzima. El estudio cinético que proponen para la reacción sugiere inhibición débil de sustrato e inhibición parabólica de producto.

Schmid y Wandrey (1987), aislan tres fracciones de enzima procedentes de una cepa de *T. reesei*, QM 9414, por HPLC y encuentran que sólo una de ellas tiene actividad β -glucosidasa, siendo su pH óptimo de 4.5 y la temperatura óptima próxima a 70°C. A altas concentraciones de sustrato encuentran que hay inhibición por el mismo.

Adami y col. (1988), estudian la hidrólisis de celobiosa con células viables de *Trichosporon pullulans*, tanto libres como inmovilizadas. En este último caso las células se inmovilizan en alginato cálcico y se utiliza un reactor de lecho fijo para el estudio cinético. Analizan la influencia del pH y encuentran un pH óptimo de 4.8 para las células libres y de 4 para las células inmovilizadas, explicando esta influencia por la existencia de diferentes formas

protonadas de la enzima, y determinan las constantes de disociación. También analizan la influencia de la temperatura y encuentran que el valor óptimo de la misma es de 60°C, tanto para las células libres como inmovilizadas. La influencia de la concentración de sustrato se analiza en el rango de 4 a 500 mM y observan un aumento de la velocidad de reacción por encima de 100 mM que podría ser debida a activación de sustrato.

Bravo y col. (1990), en un estudio de la hidrólisis enzimática de celobiosa a 40°C y pH = 4.9 mediante celulasas procedentes de *Trichoderma reesei* determinan que existe desnaturalización de la enzima y que la velocidad de desactivación se puede ajustar a un modelo potencial con valores para los parámetros de desactivación de $k_d = 0.0173 \text{ (g/L)}^{1-n} / \text{min}$ y $n = 1.66$. Con la incorporación de la desnaturalización de la enzima encuentran que el cociente entre la velocidad de reacción y la concentración de enzima en el instante inicial vale 0.122 y 0.128 mmol de celobiosa/(g de enzima.min), para concentraciones de celobiosa de 0.1 y 0.2 M respectivamente, que corresponde a la zona de orden cero en la ecuación de Michaelis-Menten.

Pizzichini y col. (1989), estudian la hidrólisis de celobiosa con células viables de *Hansenula henricii* inmovilizadas en un reactor de fibra hueca y explican sus resultados considerando que se produce inhibición competitiva de producto.

Peralta y col. (1990), con β -glucosidasa procedente del hongo *Hunicala grisea*, variedad *thermoidea*, encuentran que la actividad es óptima a pH = 6 y 50°C, y que a concentraciones apreciables de sustrato aparece inhibición.

Clarke y col. (1990), estudian la hidrólisis de p-nitrofenil- β -D-glucósido (pNFG) con β -glucosidasa procedente del hongo *Schizophyllum commune* para profundizar en el mecanismo de la reacción enzimática, y también encuentran un pH óptimo justificado por la existencia de la enzima en diferentes formas protonadas.

Bravo y col. (1991), desarrollan un método para establecer la actividad relativa de dos lotes distintos de una misma enzima, considerando la desactivación simultánea a la propia reacción enzimática. Aplican dicho método a la medida de la actividad β -1,4-glucosidasa en la hidrólisis de celobiosa con celulasas procedentes de *T. reesei*. También analizan la influencia de la concentración de celobiosa determinando que los datos se ajustan a la ecuación de Michaelis-Menten.

Li (1991), en el estudio cinético la hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa purificada procedente de *Neocallimastix frontalis* EB 188, encuentran que hay inhibición de sustrato e inhibición competitiva de producto. A la misma conclusión llega Sengupta y col. (1991), cuando la enzima purificada procede de un cultivo del hongo *Thermatomyces clypeatus*.

Chen y col. (1992), indican que *T. reesei* produce dos tipos de β -glucosidasa diferentes, con puntos isoeléctricos a pH 8.7 y 4.8. La primera tiene poca afinidad por el sustrato, mientras que la β -glucosidasa ácida presenta gran afinidad por el mismo. Se han determinado los parámetros cinéticos con pNFG y celobiosa como sustratos para las dos enzimas; la influencia del producto sólo se ha estudiado con pNFG.

Gabelsberger y col. (1993), caracterizan la enzima β -glucosidasa procedente de la bacteria *Thermotoga marítima* e indican que esta formada por dos subunidades iguales, de pesos moleculares alrededor de 47 kDa. Por otra parte, realizan el estudio cinético con diferentes sustratos: o-nitrofenil- β -D-glucopiranososa y o-nitrofenil- β -D-galactopiranososa a 75°C y con concentraciones de los mismos entre 0.05-20 mM y 0.1-10 mM respectivamente resultando una relación no lineal al utilizar los gráficos de Lineweaver-Burk y Eadie-Hofstee, mientras que la celobiosa y lactosa no provocan este efecto. La lactosa produce inhibición por sustrato a una concentración alrededor de 350 mM. Esta enzima es la más termoestable conocida hasta el momento reteniendo más del 60% de su actividad inicial después de 6 horas a 95°C.

Aguado y col (1995), estudian la desactivación térmica de la β -glucosidasa procedente de *Penicillium funiculosum* libre e inmovilizada en un rango de temperatura entre 30 y 70°C y explican la desactivación mediante un mecanismo de dos etapas en serie que implica efectos de inhibición por sustrato y por producto (de tipo no competitivo). La ecuación cinética resultante permite ajustar sus resultados experimentales con una desviación menor del 10%.

Saha y col. (1996), utilizan una β -glucosidasa termoestable procedente del *Aureo basidium pullulans* cuya actividad óptima tiene lugar a pH=4.5 y 75°C. Para el estudio cinético utilizan como sustrato pNFG y celobiosa.

Ximenes Ferreira (1996), caracteriza la enzima β -glucosidasa procedente del hongo termoestable *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Estima su peso molecular y sugiere que la enzima nativa esta formada por dos subunidades idénticas. La enzima purificada es estable a 60°C al menos durante una hora y a pH entre 4 y 4.5. Determina los valores de los parámetros cinéticos de la ecuación de Michaelis-Menten con pNFG siendo $K_M=0.316$ mM y $r_m = 0.459$ IU.mL⁻¹. La actividad β -glucosidasa es inhibida competitivamente por la glucosa siendo $k_i = 0.6$ mM.

Tambien Ximenes y col. (1996), estudian la hidrólisis enzimática de pNFG y celobiosa con una enzima con actividad β -glucosidasa procedente del *Aspergillus fumigatus* obteniendo unos valores de la constante de Michaelis-Menten de 1.36 y 0.075 mM y tambien encuentran que la glucosa inhibe de forma competitiva cuando el sustrato es el pNFG siendo el valor de k_i de 3.5 mM. Determinan los valores óptimos del pH y de la temperatura siendo de 5 y 65°C para el pNFG y de 4 y 60°C para la celobiosa.

De la revisión bibliográfica realizada se deduce que los resultados obtenidos por los diferentes autores parecen indicar que la importancia de la inhibición por sustrato, así como la inhibición por producto está determinada por la procedencia y pureza de la enzima.

2.4 OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN.

En el apartado 2.1 se ha puesto de manifiesto que en los procesos de aprovechamiento de la biomasa residual una etapa fundamental es la de hidrólisis enzimática mediante celulasas de los residuos pretratados y que las más ampliamente utilizadas son las procedentes de *T. viride* o *T. reesei* por su rendimiento hidrolítico global relativamente elevado.

Por otra parte, en el apartado 2.2 también se ha considerado la dificultad de evaluar los parámetros cinéticos mediante el método integral por lo que, en general, es recomendable utilizar en primer lugar el método diferencial y en particular el de las velocidades iniciales.

Finalmente, en el apartado 2.3 se ha puesto de manifiesto que la hidrólisis enzimática de la celulosa mediante celulasas es un proceso heterogeneo dada su naturaleza insoluble, con la actuación de, fundamentalmente, tres enzimas: endo y exoglucanasas y β -1,4-glucosidasas, por lo que para profundizar en el mecanismo y cinética de este proceso se pueden utilizar inicialmente sustratos, como la celobiosa y la carboximetilcelulosa (CMC), de naturaleza conocida y que permiten operar en condiciones homogéneas.

Por ello, el objetivo fundamental de esta investigación ha sido el de estudiar la hidrólisis de celobiosa y de CMC con un mismo complejo enzimático, seleccionándose uno comercial, Celluclast, preparado líquido de celulasas inmovilizadas procedentes de *T. reesei*. En primer término se planteó el estudio de su posible desactivación en las condiciones de operación y la posible influencia del tiempo de parada de reacción según la técnica de parada que se utilizara.

Para la hidrólisis de celobiosa con Celluclast se seleccionaron, de acuerdo con la bibliografía, un pH de 4.9 y una temperatura de 40°C para efectuar un estudio amplio de la influencia de la concentración inicial de

celobiosa, utilizando experimentos a diferentes tiempos de reacción y concentraciones de enzima que permitieran la aplicación tanto del método de las velocidades iniciales como del método integral de tratamiento de datos cinéticos. También se planificaron otras series experimentales destinadas a analizar la influencia de la temperatura, en el intervalo de 40 a 60°C, y del pH, en el intervalo de 3.9 a 5.9, sobre los parámetros cinéticos de la ecuación de velocidad.

Para la hidrólisis de CMC con Celluclast se decidió utilizar un seguimiento de la variación con el tiempo tanto de la concentración de glucosa como de la de celobiosa, con objeto de poder determinar de forma separada los parámetros cinéticos de las diferentes etapas del proceso global. En primer lugar se plantearon series experimentales dirigidas a establecer los resultados correspondientes a tiempos elevados, hidrólisis total, y la influencia de la intensidad de tratamiento, ya que se ha señalado la existencia de un posible efecto sinérgico entre las endo y las exoglucanasas, efecto que se puede detectar comparando la conversión global alcanzada para distintos tiempos de reacción pero manteniendo constante el producto de la concentración inicial de enzima por el tiempo.

Finalmente, se planificaron series experimentales a distintos valores de la temperatura, entre 40 y 60°C, del pH, entre 3.9 y 5.9, y de la concentración inicial de CMC, entre 12.5 y 1 g/L, que permitieran desarrollar un modelo cinético para la hidrólisis de CMC y analizar la influencia del pH y de la temperatura sobre los correspondientes parámetros cinéticos.

TÉCNICA EXPERIMENTAL

A continuación se indican los productos, los métodos de análisis y el procedimiento experimental utilizados en esta investigación.

3.1 PRODUCTOS UTILIZADOS.

3.1.1 PRODUCTOS QUÍMICOS.

Los reactivos utilizados y sus características se incluyen en la siguiente relación:

Acetonitrilo para HPLC, 99.8%, (CH_3CN), Carlo Erba.

Acido acético, 99%, (CH_3COOH), Panreac.

Acido clorhídrico, 35%, (HCl), Panreac.

Acido 3,5-dinitrosalicílico, 98%, ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$), Panreac.

Carboximetilcelulosa (CMC) de baja viscosidad, Sigma C-5678.

D-Celobiosa, ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), Sigma C-7252.

D-Glucosa anhidra, P. A., ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), Panreac.

Fenol, P.A., ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$), Probus.

Reactivo enzimático de determinación de glucosa, N° Cat. 670057, Boehringer Mannheim.

Sodio acetato, 99%, (CH_3COONa), Probus.

Sodio hidróxido, P.A., (NaOH), 99%, Merck.

Sodio y potasio tartrato tetrahidratado, P.A., 99%, ($\text{COOK}(\text{CHOH})_2\text{COONa}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Carlo Erba.

Sodio sulfito heptahidratado, P.A., ($\text{Na}_2\text{SO}_3\cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Carlo Erba.

3.1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA.

Para el estudio de la cinética de la hidrólisis de carboximetilcelulosa, así como de celobiosa, se ha utilizado un complejo de celulasas, preparado comercial de la casa Novo Nordisk, Celluclast 1.5 L. Este es un preparado líquido de celulasas producido por fermentación sumergida de una cepa seleccionada del hongo *Trichoderma reesei*. La enzima cataliza la degradación de celulosa en glucosa, celobiosa y polímeros con alto contenido de glucosa. Las cantidades relativas de productos de reacción formados dependen de las condiciones de reacción y tiene un pronunciado efecto reductor de la viscosidad en sustratos celulósicos solubles. El producto es un líquido marrón con una densidad aproximada de 1.2 g/mL.

Los productos de reacción de la hidrólisis de carboximetilcelulosa con Celluclast son fundamentalmente celobiosa y glucosa. La celobiosa no es un azúcar fermentable. Por eso, cuando se desea una conversión máxima en azúcar fermentable es necesario el uso de una celobiasa como Novozym 188 en combinación con Celluclast.

Los componentes enzimáticos activos de Celluclast son fácilmente solubles en agua en todas las concentraciones de uso normal.

Las figuras 3.1 y 3.2 muestran la actividad de Celluclast a diferentes valores del pH y la temperatura, utilizando carboximetilcelulosa como sustrato. La estabilidad térmica y frente al pH de la enzima en disolución acuosa aparece en las figuras 3.3 y 3.4. Para aplicaciones prácticas las condiciones de producción óptimas son: alrededor de 50-60°C, pH 4.5-6.0.

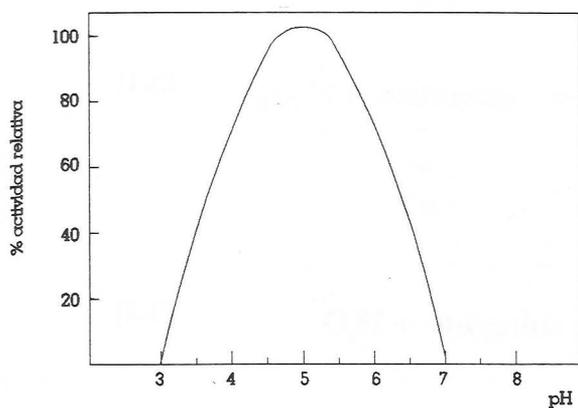


Figura 3.1

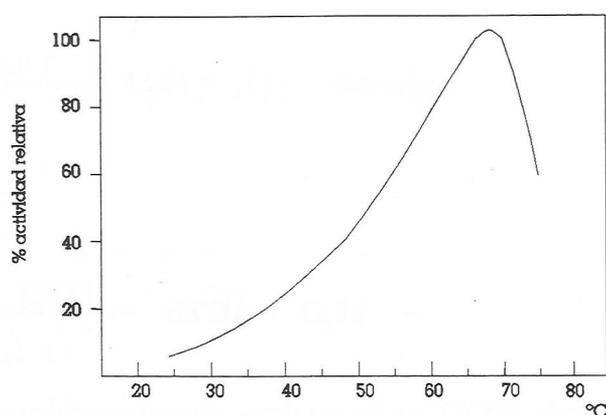


Figura 3.2

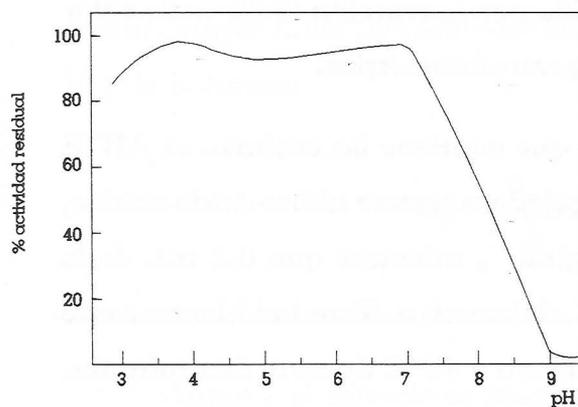


Figura 3.3

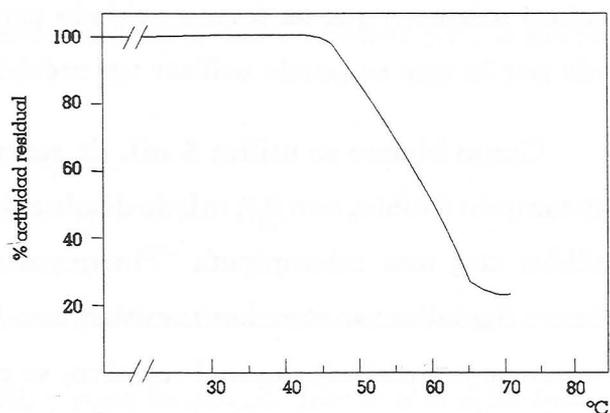


Figura 3.4

3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS Y ENSAYOS PREVIOS.

Se han aplicado análisis de glucosa y de azúcares reductores e identificado los azúcares por HPLC, y efectuado ensayos previos sobre los productos utilizados, la técnica de parada de reacción y la variación del pH durante la misma.

3.2.1 ANÁLISIS DE GLUCOSA.

Para analizar la concentración de glucosa se ha utilizado el método de la

glucosa-oxidasa, método GOD-Perid, Werner y col. (1970), basado en las reacciones:



donde GOD es la enzima glucosa-oxidasa, POD la enzima peroxidasa y ABTS el 2,2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolina-ácido sulfónico (6)]-sal amónica. Este compuesto es incoloro mientras que su forma oxidada producida por la reacción [3.2], es de color verde por lo que se puede utilizar un método espectrofotométrico.

Como blanco se utiliza 5 mL de reactivo, que contiene las enzimas, el ABTS y un tampón fosfato, con 0.2 mL de disolución reguladora acetato sódico-ácido acético, medidos con una micropipeta "Finnpipette Digital", mientras que 0.2 mL de la muestra a analizar se mezclan también con 5 mL de reactivo. Tanto el blanco como la muestra ya mezclados con el reactivo, se mantienen a 40°C durante diez minutos, posteriormente se hace la lectura de la absorbancia, no debiendo transcurrir más de diez minutos para dicha lectura. Esta se efectúa a 610 nm mediante un espectrofotómetro "Spectronic 2000".

Con objeto de disponer de una recta patrón para la disolución preparada de reactivo de glucosa se efectuaron distintas medidas de absorbancia de disoluciones conteniendo una concentración prefijada de glucosa, los resultados se recogen en la figura 3.5.

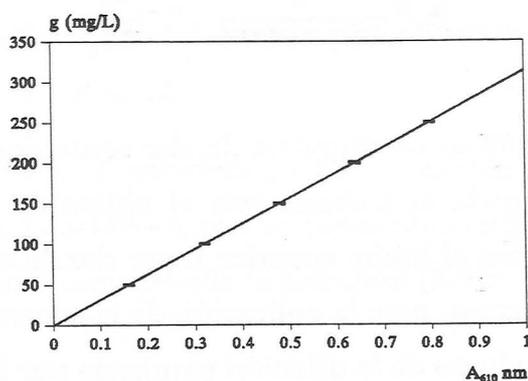


Figura 3.5

Dado que se han empleado concentraciones lo suficientemente reducidas para que se cumpla la ley de Lambert-Beer, puede calcularse una constante para la glucosa, K_G , de la forma:

$$K_G = \frac{A_{610}}{g} \quad g = 313.0 A_{610} \quad [3.3]$$

donde A es la absorbancia medida y g la concentración de glucosa en mg/L.

Aunque el método es muy específico para la glucosa frente a la celobiosa, de acuerdo con Kaplan (1957), sólo se oxida 0.09 de celobiosa por 100 de glucosa, también se realizó una recta patrón para la celobiosa, determinándose de la misma forma la constante correspondiente a la celobiosa, que, comparada con K_G presenta una interferencia despreciable, por lo que no fue necesario tenerla en cuenta.

Por lo tanto, a partir de la ecuación [3.3] y teniendo en cuenta la definición de P_T dada por la ecuación [2.26], es posible determinar, por medida de la absorbancia y con el valor de P_T igual a $2C_0$ dado que se trata de experimentos realizados en ausencia de glucosa inicial, la concentración molar final de glucosa y por lo tanto aplicando la ecuación [2.27] la conversión alcanzada, que vendrá dada por:

$$x = \frac{g}{2C_0 \cdot 180.16} = \frac{G}{2C_0} \quad [3.4]$$

Hay que indicar que en las muestras de alto contenido en glucosa fue preciso efectuar una dilución previa al análisis, con el objeto de que la absorbancia no sobrepasara en ningún caso el límite superior hasta donde es válido el valor de K_G . Evidentemente, en estos casos, para la aplicación de la ecuación [3.4], el valor de g o G vendrá dado por el producto de la dilución empleada por la absorbancia medida y por K_G .

3.2.2 ANÁLISIS DE AZUCARES REDUCTORES.

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

En esta determinación se mezclan dos volúmenes definidos de la disolución de azúcares reductores y de reactivo DNS en un tubo de ensayo que se mantiene en agua hirviendo 15 minutos, con lo que se alcanza el desarrollo del color. A continuación se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente y se mide su absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro "Spectronic 2000". Como blanco se ha utilizado una disolución de idéntica composición y volumen que la disolución problema, sometida a los mismos tratamientos, pero de concentración nula de azúcares reductores.

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

3.2.2.1 DETERMINACIÓN DE CELOBIOSA.

Si se acepta que los azúcares reductores procedentes de la hidrólisis enzimática

de carboximetilcelulosa son únicamente celobiosa y glucosa, se puede desarrollar un método que permita desglosar el total de azúcares reductores, calculado como glucosa equivalente, en celobiosa y glucosa.

Para ello se midieron las absorbancias a 640 nm para distintas concentraciones de celobiosa por el método del DNS, con lo que se obtuvo la recta patrón que aparece en la figura 3.6 y a la que corresponde la ecuación [3.5]:

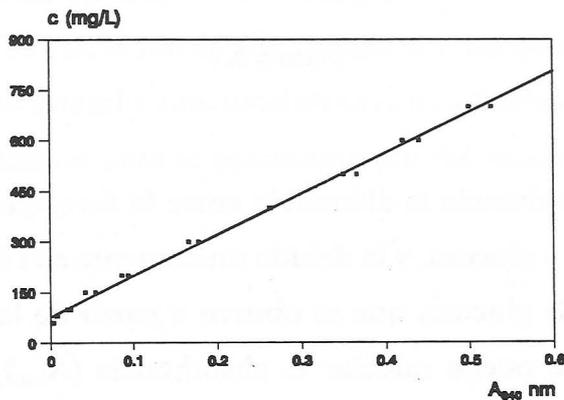


Figura 3.6

$$c = 77.7 + 1213.0 A_{640} \quad [3.5]$$

3.2.2.2 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA.

Por otra parte a partir de disoluciones preparadas a una concentración constante de celobiosa y concentraciones de glucosa variables se encontró que la dependencia entre la concentración de glucosa, g , y la absorbancia a 640 nm es de proporcionalidad directa, ecuación 3.6 y figura 3.7.

$$g = 935.5 (A_{640})_G \quad [3.6]$$

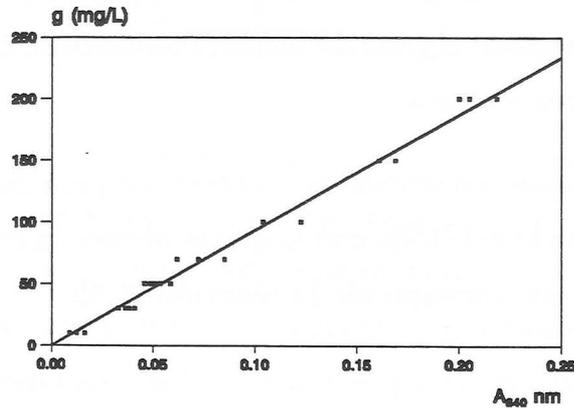


Figura 3.7

Siendo esta absorbancia la diferencia entre la correspondiente a la disolución formada por celobiosa y glucosa, y la debida únicamente a la celobiosa. De forma que conociendo g (mg/L) de glucosa, que se obtuvo a partir de la medida de A_{610} por el método GOD-Perid, se puede calcular la absorbancia $(A_{640})_G$ que corresponde a la glucosa a 640 nm y de la $(A_{640})_{AR}$ para azúcares reductores totales obtener $(A_{640})_C$ para la celobiosa por diferencia:

$$(A_{640})_C = (A_{640})_{AR} - (A_{640})_G \quad [3.7]$$

y por lo tanto la concentración de celobiosa en las muestras.

3.2.3 DETERMINACIÓN DE CELOBIOSA Y GLUCOSA POR HPLC.

La identificación de azúcares (glucosa y celobiosa) se realizó mediante un cromatógrafo de líquidos HPLC en las siguientes condiciones:

Disolvente portador: mezcla 60% acetonitrilo y 40% agua destilada y desionizada. Detector: índice de refracción. Columna: S 10 AMINO, longitud 25 cm, diámetro 4.6 mm. Caudal de portador: 1.25 mL/min. Volumen de muestra: 20 μ L. Temperatura de trabajo: 35°C.

En la figura 3.8 se representa un cromatograma en el que se aprecia la separación entre los picos de glucosa y celobiosa y sus tiempos de retención, para una disolución preparada de concentraciones 2.5 g/L y 1.25 g/L respectivamente.

Mientras que en la figura 3.9 se representa el cromatograma correspondiente a una muestra tomada a 15 minutos de hidrólisis, pH = 4.9 y 40°C, de una disolución de 10 g/L de carboximetilcelulosa utilizando 15 g/L de Celluclast. En dicho cromatograma puede observarse la presencia de sólo dos picos que, en las mismas condiciones de operación, aparecen a los tiempos de retención correspondientes a glucosa y celobiosa por lo que se puede aceptar que son los componentes mayoritarios obtenidos en la hidrólisis de carboximetilcelulosa con Celluclast, hecho que se utilizará en la discusión de resultados para el planteamiento del modelo cinético.

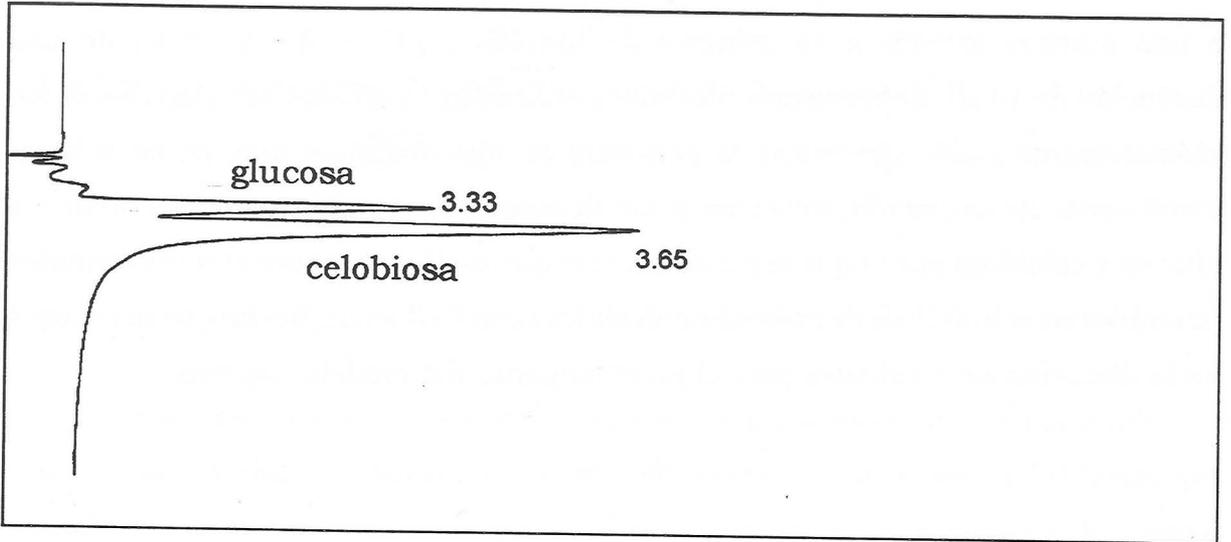


Figura 3.8

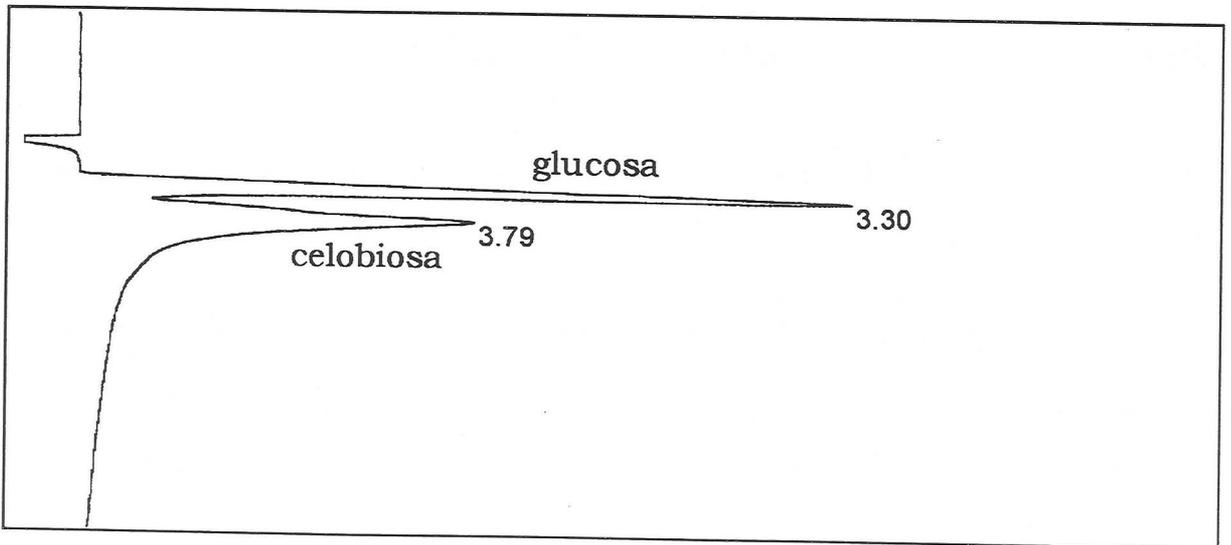


Figura 3.9

3.2.4 ANÁLISIS PREVIOS.

Para determinar la posible repercusión de la celobiosa, de la carboximetilcelulosa o de la enzima en los resultados experimentales se efectuaron análisis de sus disoluciones por separado. En ningún caso, como puede apreciarse en la Tabla 3.2.1, se detectaron cantidades significativas de glucosa o de azúcares reductores que deban tenerse en cuenta.

Tabla 3.2.1

| Sustancia | g glucosa/g sustancia | g A. reductores/g sustancia |
|----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Celobiosa | 0 | 0 |
| Carboximetilcelulosa | 0 | 0.005 |
| Celluclast | 0.002 | 0.007 |

3.2.5 PARADA DE REACCIÓN.

La forma de detener la hidrólisis para proceder al análisis de las muestras es desnaturalizar la enzima, tal y como indican Hong y col. (1981), Jain y col. (1984), Stemberg (1976), esto se consigue sumergiendo el tubo de ensayo en agua hirviendo durante cinco minutos; sin embargo se probaron otras formas de parada de reacción: adición de distintas concentraciones de HCl, adición de distintas concentraciones de NaOH, en agua hirviendo y dejando enfriar a la temperatura ambiente y en agua hirviendo y enfriando con hielo, no encontrándose variaciones muy importantes en los resultados del análisis de glucosa, como puede verse en la tabla 3.2.2, donde aparecen las absorbancias medidas a 610 nm para una concentración inicial de celobiosa de 50 mM, de enzima de 2 g/L y un tiempo de reacción de 35 minutos aunque se observa que sumergir el tubo en agua hirviendo puede ser una técnica eficaz además de simple.

Tabla 3.2.2

| $C_0 = 50 \text{ mM}$ $e_0 = 2 \text{ g/L}$ $t = 35 \text{ min.}$ | A_{610} |
|---|-----------|
| Agua hirviendo y dejar enfriar | 0.166 |
| Agua hirviendo y enfriar en hielo | 0.169 |
| Adición de 0.2 mL de NaOH 2M | 0.168 |
| Adición de 0.2 mL de NaOH 3M | 0.180 |
| Adición de 0.2 mL de HCL 4M | 0.175 |
| Adición de 0.2 mL de HCL 6M | 0.183 |

3.2.6 VARIACIÓN DEL pH DURANTE LA REACCIÓN.

También se comprobó que el pH no experimentaba ninguna variación significativa durante el desarrollo de la hidrólisis. Para esto se tomaron muestras a varios tiempos y se les hizo la medida del pH, en todos los casos se mantuvo prácticamente constante.

En los experimentos realizados a pH 3.9 fue necesario elevarlo en las muestras a analizar mediante la adición de NaOH (0.2 mL), con el objeto de evitar la precipitación que aparecía al añadir el reactivo DNS.

3.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

De acuerdo con las condiciones utilizadas por diferentes autores, se decidió estudiar la cinética a las temperaturas de 40, 50, y 60°C y a los pH de 3.9, 4.9 y 5.9 que se conseguían mediante una disolución reguladora de acetato sódico-ácido acético. En estas condiciones los experimentos se realizaron en tubos de ensayo de 1 cm de diámetro interno y 15 mL de capacidad. Las muestras se han mantenido en un baño termostático durante los tiempos de hidrólisis prefijados.

3.3.1 HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE CELOBIOSA.

Para la hidrólisis de celobiosa la mezcla reaccionante estuvo formada por 1 mL de disolución de celobiosa de distintas concentraciones (comprendidas entre 200 mM y 2 mM) y 1 mL de la disolución de enzima (60 g/L a 0.5 g/L). La hidrólisis se ha realizado a tiempos de reacción de 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Trascurrido el tiempo fijado para la reacción, esta se detiene sumergiendo el tubo de ensayo en agua hirviendo durante cinco minutos, ya que de esta forma como se ha indicado anteriormente se desnaturaliza la enzima y se detiene la reacción.

3.3.2 HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE CARBOXIMETILCELULOSA.

En el caso de la hidrólisis de carboximetilcelulosa el volumen de mezcla reaccionante fue de 3.3 mL, resultado de añadir 0.3 mL de disolución de enzima, con concentraciones entre 40 g/L y 0.02 g/L, y 3 mL de disolución de carboximetilcelulosa, en este caso el rango seleccionado fué de 25 g/L a 2 g/L. Como en el caso de la hidrólisis de celobiosa, tras los mismos tiempos de reacción (0, 15, 30, 45 y 60 min.), ésta se detiene de la misma manera.

3.4 DESACTIVACIÓN DE LA ENZIMA.

Las enzimas son proteínas globulares que pueden sufrir cambios en su estructura y por lo tanto pérdida de actividad catalítica; los cambios estructurales pueden estar originados por agentes físicos, como la temperatura, o químicos, como variaciones del pH y/o modificaciones de la fuerza iónica de la disolución. Se han realizado experimentos con la finalidad de determinar la posible pérdida de actividad de la enzima cuando se mantiene a la temperatura prefijada durante un determinado tiempo previo, t_0 , antes de proceder a la hidrólisis.

En todos los casos el sustrato utilizado fue celobiosa 5 mM y la concentración de enzima de 1 g/L, procediéndose de la siguiente manera: la disolución de enzima se

calienta a la temperatura de 40, 50 y 60°C durante un tiempo que varía de 0 a 4 horas y a continuación se procede como se ha indicado en el apartado 3.3.1. Los resultados obtenidos se indican en las tablas 3.4.1 a 3.4.13 y por el procedimiento que se desarrollará en el apartado 5.1.1 se han determinado los valores del cociente entre la velocidad inicial de reacción y la concentración inicial de enzima, r_0/e_0 , que se han representado de forma conjunta para todos los experimentos realizados en la figura 3.10, no observándose ninguna variación significativa de la velocidad de reacción, lo que parece indicar que no existe desnaturalización apreciable de la enzima al menos hasta 60°C.

TABLA 3.4.1

pH = 4.9 T = 40 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L
 t₀ = 0 h

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0221 |
| 15 | 0.0245 |
| 30 | 0.0413 |
| 30 | 0.0391 |
| 45 | 0.0561 |
| 45 | 0.0537 |
| 60 | 0.0702 |
| 60 | 0.0717 |

TABLA 3.4.2

pH = 4.9 T = 40 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L
 t = 0.5 h

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0273 |
| 15 | 0.0264 |
| 30 | 0.0445 |
| 30 | 0.0438 |
| 45 | 0.0611 |
| 45 | 0.0591 |
| 60 | 0.0742 |
| 60 | 0.0723 |

TABLA 3.4.3

pH = 4.9 T = 40 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L
 t₀ = 1 h

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0267 |
| 15 | 0.0271 |
| 30 | 0.0439 |
| 30 | 0.0438 |
| 45 | 0.0582 |
| 45 | 0.0575 |
| 60 | 0.0731 |
| 60 | 0.0716 |

TABLA 3.4.4

pH = 4.9 T = 50 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L
 t₀ = 0 h

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0332 |
| 15 | 0.0339 |
| 30 | 0.0556 |
| 30 | 0.0591 |
| 45 | 0.0778 |
| 45 | 0.0810 |
| 60 | 0.0988 |
| 60 | 0.1053 |

TABLA 3.4.5

pH = 4.9 T = 50 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L
 t₀ = 0.5 h

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0351 |
| 15 | 0.0346 |
| 30 | 0.0594 |
| 30 | 0.0592 |
| 45 | 0.0825 |
| 45 | 0.0815 |
| 60 | 0.0988 |
| 60 | 0.1039 |

TABLA 3.4.6

pH = 4.9 T = 50 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L
 t₀ = 1 h

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0287 |
| 15 | 0.0266 |
| 30 | 0.0552 |
| 30 | 0.0507 |
| 45 | 0.0804 |
| 45 | 0.0759 |
| 60 | 0.1044 |
| 60 | 0.0969 |

TABLA 3.4.7

pH = 4.9 T = 50 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L
 t₀ = 1.5 h

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0358 |
| 15 | 0.0346 |
| 30 | 0.0585 |
| 30 | 0.0610 |
| 45 | 0.0780 |
| 45 | 0.0813 |
| 60 | 0.0973 |
| 60 | 0.1030 |

TABLA 3.4.8

pH = 4.9 T = 50 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L
 t₀ = 2 h

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0354 |
| 15 | 0.0353 |
| 30 | 0.0582 |
| 30 | 0.0590 |
| 45 | 0.0813 |
| 45 | 0.0816 |
| 60 | 0.1000 |
| 60 | 0.1042 |

TABLA 3.4.9

pH = 4.9 T = 50 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L
 t₀ = 3 h

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0360 |
| 15 | 0.0373 |
| 30 | 0.0603 |
| 30 | 0.0620 |
| 45 | 0.0803 |
| 45 | 0.0811 |
| 60 | 0.1006 |
| 60 | 0.1032 |

TABLA 3.4.10

pH = 4.9 T = 50 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L
 t₀ = 4 h

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0349 |
| 15 | 0.0344 |
| 30 | 0.0566 |
| 30 | 0.0568 |
| 45 | 0.0780 |
| 45 | 0.0787 |
| 60 | 0.0959 |
| 60 | 0.1035 |

TABLA 3.4.11

pH = 4.9 T = 60 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L
 t₀ = 0 h

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0505 |
| 15 | 0.0486 |
| 30 | 0.0839 |
| 30 | 0.0849 |
| 45 | 0.1152 |
| 45 | 0.1159 |
| 60 | 0.1404 |
| 60 | 0.1440 |

TABLA 3.4.12

pH = 4.9 T = 60 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L
 t₀ = 0.5 h

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0450 |
| 15 | 0.0492 |
| 30 | 0.0825 |
| 30 | 0.0844 |
| 45 | 0.1136 |
| 45 | 0.1174 |
| 60 | 0.1425 |
| 60 | 0.1458 |

TABLA 3.4.13

pH = 4.9 T = 60 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L
 t₀ = 1 h

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0439 |
| 15 | 0.0450 |
| 30 | 0.0782 |
| 30 | 0.0810 |
| 45 | 0.1096 |
| 45 | 0.1133 |
| 60 | 0.1371 |

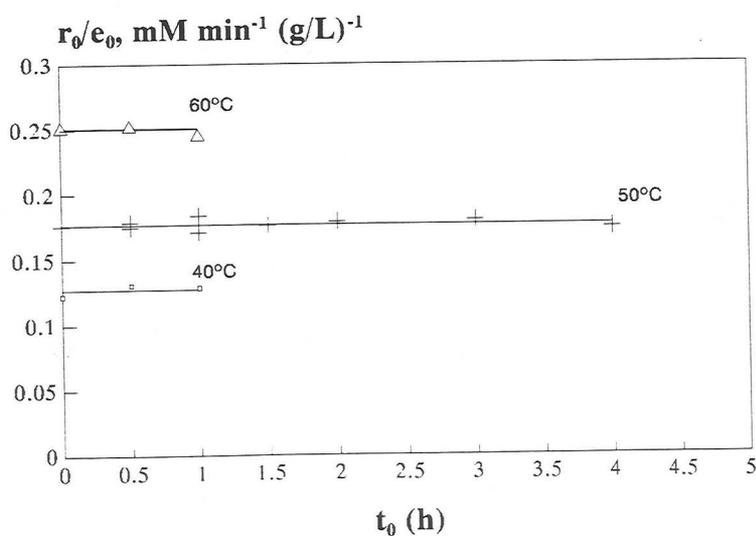


Figura 3.10

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Se ha estudiado experimentalmente la hidrólisis enzimática de celobiosa y de carboximetilcelulosa con la enzima Celluclast 1.5L que es un preparado líquido de celulasas inmovilizadas procedente del hongo *Trichoderma reesei*.

4.1 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CELOBIOSA.

En los experimentos descritos en el apartado 3.4 de esta Memoria se comprobó que no se producía desactivación de la enzima en las condiciones de operación, por lo que se programaron experimentos para analizar la influencia de las siguientes variables: influencia de la concentración inicial de celobiosa, influencia de la temperatura e influencia del pH.

Influencia de la concentración de celobiosa.

Para analizar la influencia de la concentración de celobiosa se realizaron experimentos a $\text{pH} = 4.9$ y $T = 40^\circ\text{C}$ y a las concentraciones de 100, 75, 50, 10, 5, y 1 mM, para al menos dos niveles de enzima en cada caso. Los resultados obtenidos se indican en las tablas A.4.1 a A.4.17.

Influencia de la temperatura.

El estudio de la influencia de la temperatura se hizo a 40, 50 y 60°C manteniéndose el pH igual a 4.9. Las concentraciones de celobiosa se variaron entre 100 y 1 mM y cada serie se realizó al menos a dos niveles de enzima. Los resultados obtenidos se indican en las tablas B.4.1 a B.4.11 para la temperatura de 50°C y B.4.12 a B.4.21 para la de 60°C .

Influencia del pH.

Manteniendo la temperatura a 50°C se estudió la influencia del pH eligiendo los valores de 5.9, 4.9 y 3.9 para distintas concentraciones de celobiosa y en cada serie experimental se utilizaron dos niveles de enzima. Los resultados se indican en las tablas C.4.1 a C.4.10 para pH = 5.9 y C.4.11 a C.4.20 para pH = 3.9.

TABLA A.4.1

pH = 4.9 T = 40 °C
C₀ = 100 mM e₀ = 30 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0418 |
| 15 | 0.0417 |
| 30 | 0.0543 |
| 30 | 0.0570 |
| 45 | 0.0697 |
| 45 | 0.0703 |
| 60 | 0.0876 |
| 60 | 0.0886 |

TABLA A.4.2

pH = 4.9 T = 40 °C
C₀ = 100 mM e₀ = 20 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0232 |
| 15 | 0.0241 |
| 30 | 0.0346 |
| 30 | 0.0364 |
| 45 | 0.0471 |
| 45 | 0.0447 |
| 60 | 0.0557 |
| 60 | 0.0610 |

TABLA A.4.3

pH = 4.9 T = 40 °C
C₀ = 100 mM e₀ = 10 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0064 |
| 15 | 0.0136 |
| 15 | 0.0146 |
| 30 | 0.0203 |
| 30 | 0.0220 |
| 45 | 0.0293 |
| 45 | 0.0309 |
| 60 | 0.0341 |
| 60 | 0.0354 |

TABLA A.4.4

pH = 4.9 T = 40 °C
C₀ = 100 mM e₀ = 5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 30 | 0.0128 |
| 30 | 0.0137 |
| 60 | 0.0203 |
| 60 | 0.0202 |
| 90 | 0.0278 |
| 90 | 0.0272 |
| 120 | 0.0340 |
| 120 | 0.0344 |

TABLA A.4.5

pH = 4.9 T = 40 °C
C₀ = 75 mM e₀ = 20 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0111 |
| 15 | 0.0331 |
| 15 | 0.0340 |
| 30 | 0.0489 |
| 30 | 0.0494 |
| 45 | 0.0647 |
| 45 | 0.0628 |
| 60 | 0.0777 |
| 60 | 0.0753 |

TABLA A.4.6

pH = 4.9 T = 40 °C
C₀ = 75 mM e₀ = 10 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0067 |
| 15 | 0.0186 |
| 15 | 0.0190 |
| 30 | 0.0276 |
| 30 | 0.0279 |
| 45 | 0.0333 |
| 45 | 0.0307 |
| 60 | 0.0457 |
| 60 | 0.0427 |

TABLA A.4.7

pH = 4.9 T = 40 °C
 C₀ = 50 mM e₀ = 10 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0075 |
| 15 | 0.0272 |
| 15 | 0.0248 |
| 30 | 0.0383 |
| 30 | 0.0380 |
| 45 | 0.0516 |
| 45 | 0.0476 |
| 60 | 0.0577 |
| 60 | 0.0619 |

TABLA A.4.8

pH = 4.9 T = 40 °C
 C₀ = 50 mM e₀ = 5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0052 |
| 15 | 0.0144 |
| 15 | 0.0147 |
| 30 | 0.0227 |
| 30 | 0.0222 |
| 45 | 0.0301 |
| 45 | 0.0291 |
| 60 | 0.0371 |
| 60 | 0.0365 |

TABLA A.4.9

pH = 4.9 T = 40 °C
 C₀ = 25 mM e₀ = 10 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0152 |
| 15 | 0.0497 |
| 15 | 0.0493 |
| 30 | 0.0730 |
| 30 | 0.0707 |
| 45 | 0.0860 |
| 45 | 0.0898 |
| 60 | 0.1032 |
| 60 | 0.1066 |

TABLA A.4.10

pH = 4.9 T = 40 °C
 C₀ = 25 mM e₀ = 2.5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0154 |
| 15 | 0.0154 |
| 15 | 0.0148 |
| 30 | 0.0215 |
| 30 | 0.0223 |
| 45 | 0.0296 |
| 45 | 0.0292 |
| 60 | 0.0363 |
| 60 | 0.0346 |

TABLA A.4.11

pH = 4.9 T = 40 °C
 C₀ = 10 mM e₀ = 5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0189 |
| 15 | 0.0610 |
| 15 | 0.0506 |
| 30 | 0.0850 |
| 30 | 0.0881 |
| 45 | 0.1068 |
| 45 | 0.1121 |
| 60 | 0.1287 |
| 60 | 0.1501 |

TABLA A.4.12

pH = 4.9 T = 40 °C
 C₀ = 10 mM e₀ = 2.5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0100 |
| 15 | 0.0270 |
| 15 | 0.0272 |
| 30 | 0.0421 |
| 30 | 0.0420 |
| 45 | 0.0573 |
| 45 | 0.0592 |
| 60 | 0.0738 |
| 60 | 0.0770 |

TABLA A.4.13

pH = 4.9 T = 40 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 2.5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0241 |
| 15 | 0.0495 |
| 15 | 0.0488 |
| 15 | 0.0499 |
| 15 | 0.0511 |
| 30 | 0.0811 |
| 30 | 0.0820 |
| 30 | 0.0832 |
| 30 | 0.0843 |
| 45 | 0.1063 |
| 45 | 0.1119 |
| 45 | 0.1122 |
| 45 | 0.1131 |
| 60 | 0.1438 |
| 60 | 0.1444 |
| 60 | 0.1362 |
| 60 | 0.1386 |

TABLA A.4.14

pH = 4.9 T = 40 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0109 |
| 15 | 0.0228 |
| 15 | 0.0231 |
| 15 | 0.0254 |
| 15 | 0.0248 |
| 15 | 0.0221 |
| 15 | 0.0245 |
| 30 | 0.0374 |
| 30 | 0.0389 |
| 30 | 0.0398 |
| 30 | 0.0386 |
| 30 | 0.0413 |
| 30 | 0.0391 |
| 45 | 0.0521 |
| 45 | 0.0504 |
| 45 | 0.0539 |
| 45 | 0.0530 |
| 45 | 0.0563 |
| 45 | 0.0537 |
| 60 | 0.0622 |
| 60 | 0.0636 |
| 60 | 0.0657 |
| 60 | 0.0650 |
| 60 | 0.0702 |
| 60 | 0.0717 |

TABLA A.4.15

pH = 4.9 T = 40 °C
 C₀ = 1 mM e₀ = 1 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0191 |
| 15 | 0.0643 |
| 15 | 0.0634 |
| 30 | 0.1051 |
| 30 | 0.1068 |
| 45 | 0.1459 |
| 45 | 0.1459 |
| 60 | 0.1772 |
| 60 | 0.1798 |

TABLA A.4.16

pH = 4.9 T = 40 °C
 C₀ = 1 mM e₀ = 0.5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0139 |
| 15 | 0.0365 |
| 15 | 0.0400 |
| 30 | 0.0608 |
| 30 | 0.0608 |
| 45 | 0.0860 |
| 45 | 0.0851 |
| 60 | 0.1034 |
| 60 | 0.1008 |

TABLA A.4.17

pH = 4.9 T = 40 °C
C₀ = 1 mM e₀ = 0.25 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0104 |
| 15 | 0.0174 |
| 15 | 0.0174 |
| 30 | 0.0295 |
| 30 | 0.0278 |
| 45 | 0.0374 |
| 45 | 0.0382 |
| 60 | 0.0486 |
| 60 | 0.0478 |

TABLA B.4.1

pH = 4.9 T = 50 °C
C₀ = 100 mM e₀ = 20 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0388 |
| 15 | 0.0404 |
| 30 | 0.0625 |
| 30 | 0.0632 |
| 45 | 0.0816 |
| 45 | 0.0862 |
| 60 | 0.1032 |
| 60 | 0.1085 |

TABLA B.4.2

pH = 4.9 T = 50 °C
C₀ = 100 mM e₀ = 10 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0191 |
| 15 | 0.0212 |
| 30 | 0.0315 |
| 30 | 0.0339 |
| 45 | 0.0428 |
| 45 | 0.0438 |
| 60 | 0.0520 |
| 60 | 0.0543 |

TABLA B.4.3

pH = 4.9 T = 50 °C
C₀ = 50 mM e₀ = 10 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0329 |
| 15 | 0.0336 |
| 30 | 0.0533 |
| 30 | 0.0554 |
| 45 | 0.0707 |
| 45 | 0.0772 |
| 60 | 0.0910 |
| 60 | 0.0908 |

TABLA B.4.4

pH = 4.9 T = 50 °C
C₀ = 50 mM e₀ = 5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0204 |
| 15 | 0.0210 |
| 30 | 0.0325 |
| 30 | 0.0311 |
| 45 | 0.0420 |
| 45 | 0.0460 |
| 60 | 0.0522 |
| 60 | 0.0542 |

TABLA B.4.5

pH = 4.9 T = 50 °C
C₀ = 10 mM e₀ = 5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0782 |
| 15 | 0.0839 |
| 30 | 0.1313 |
| 30 | 0.1350 |
| 45 | 0.1782 |
| 45 | 0.1798 |
| 60 | 0.2184 |
| 60 | 0.2184 |

TABLA B.4.6

pH = 4.9 T = 50 °C
C₀ = 10 mM e₀ = 2.5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0464 |
| 15 | 0.0432 |
| 30 | 0.0808 |
| 45 | 0.1089 |
| 45 | 0.1089 |
| 60 | 0.1324 |
| 60 | 0.1329 |

TABLA B.4.7

pH = 4.9 T = 50 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 2.5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0726 |
| 15 | 0.0684 |
| 30 | 0.1244 |
| 30 | 0.1247 |
| 45 | 0.1650 |
| 45 | 0.1716 |
| 60 | 0.2060 |
| 60 | 0.2015 |

TABLA B.4.8

pH = 4.9 T = 50 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0332 |
| 15 | 0.0342 |
| 30 | 0.0604 |
| 30 | 0.0584 |
| 45 | 0.0839 |
| 45 | 0.0842 |
| 60 | 0.1030 |
| 60 | 0.1087 |

TABLA B.4.9

pH = 4.9 T = 50 °C
 C₀ = 1 mM e₀ = 1 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0929 |
| 15 | 0.0929 |
| 30 | 0.1590 |
| 30 | 0.1581 |
| 45 | 0.2137 |
| 45 | 0.2172 |
| 60 | 0.2588 |
| 60 | 0.2649 |

TABLA B.4.10

pH = 4.9 T = 50 °C
 C₀ = 1 mM e₀ = 0.5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0443 |
| 15 | 0.0443 |
| 30 | 0.0782 |
| 30 | 0.0790 |
| 45 | 0.1129 |
| 45 | 0.1147 |
| 60 | 0.1451 |
| 60 | 0.1355 |

TABLA B.4.11

pH = 4.9 T = 50 °C
 C₀ = 1 mM e₀ = 0.25 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0252 |
| 15 | 0.0252 |
| 30 | 0.0391 |
| 30 | 0.0408 |
| 45 | 0.0530 |
| 45 | 0.0565 |
| 60 | 0.0651 |
| 60 | 0.0651 |

TABLA B.4.12

pH = 4.9 T = 60 °C
C₀ = 100 mM e₀ = 20 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0501 |
| 15 | 0.0508 |
| 30 | 0.0821 |
| 30 | 0.0834 |
| 45 | 0.1093 |
| 45 | 0.1100 |
| 60 | 0.1364 |
| 60 | 0.1379 |

TABLA B.4.13

pH = 4.9 T = 60 °C
C₀ = 100 mM e₀ = 10 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0285 |
| 15 | 0.0300 |
| 30 | 0.0473 |
| 30 | 0.0504 |
| 45 | 0.0638 |
| 45 | 0.0688 |
| 60 | 0.0793 |
| 60 | 0.0874 |

TABLA B.4.14

pH = 4.9 T = 60 °C
C₀ = 50 mM e₀ = 10 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0443 |
| 15 | 0.0436 |
| 30 | 0.0745 |
| 30 | 0.0749 |
| 45 | 0.1047 |
| 45 | 0.1049 |
| 60 | 0.1366 |
| 60 | 0.1284 |

TABLA B.4.15

pH = 4.9 T = 60 °C
C₀ = 50 mM e₀ = 5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0248 |
| 15 | 0.0257 |
| 30 | 0.0427 |
| 30 | 0.0444 |
| 45 | 0.0602 |
| 45 | 0.0632 |
| 60 | 0.0760 |
| 60 | 0.0739 |

TABLA B.4.16

pH = 4.9 T = 60 °C
C₀ = 10 mM e₀ = 5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.1120 |
| 15 | 0.1100 |
| 30 | 0.1829 |
| 30 | 0.1913 |
| 45 | 0.2548 |
| 45 | 0.2548 |
| 60 | 0.3033 |
| 60 | 0.2981 |

TABLA B.4.17

pH = 4.9 T = 60 °C
C₀ = 10 mM e₀ = 2.5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0641 |
| 15 | 0.0573 |
| 30 | 0.1141 |
| 30 | 0.0975 |
| 45 | 0.1376 |
| 45 | 0.1355 |
| 60 | 0.1767 |
| 60 | 0.1704 |

TABLA B.4.18

pH = 4.9 T = 60 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 2.5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0966 |
| 15 | 0.0966 |
| 30 | 0.1706 |
| 30 | 0.1734 |
| 45 | 0.2283 |
| 45 | 0.2279 |
| 60 | 0.2689 |
| 60 | 0.2689 |

TABLA B.4.19

pH = 4.9 T = 60 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0505 |
| 15 | 0.0486 |
| 15 | 0.0467 |
| 15 | 0.0478 |
| 30 | 0.0839 |
| 30 | 0.0849 |
| 30 | 0.0636 |
| 30 | 0.0813 |
| 45 | 0.1152 |
| 45 | 0.1162 |
| 45 | 0.1115 |
| 45 | 0.1147 |
| 60 | 0.1404 |
| 60 | 0.1440 |
| 60 | 0.1353 |
| 60 | 0.1529 |

TABLA B.4.20

pH = 4.9 T = 60 °C
 C₀ = 1 mM e₀ = 1 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.1147 |
| 15 | 0.1155 |
| 30 | 0.1980 |
| 30 | 0.1963 |
| 45 | 0.2693 |
| 45 | 0.2641 |
| 60 | 0.3179 |
| 60 | 0.3283 |

TABLA B.4.21

pH = 4.9 T = 60 °C
 C₀ = 1 mM e₀ = 0.5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 15 | 0.0547 |
| 15 | 0.0530 |
| 30 | 0.0964 |
| 30 | 0.0973 |
| 45 | 0.1511 |
| 45 | 0.1494 |
| 60 | 0.1867 |
| 60 | 0.1746 |

TABLA C.4.1

pH = 5.9 T = 50 °C
C₀ = 100 mM e₀ = 20 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0090 |
| 15 | 0.0214 |
| 15 | 0.0212 |
| 30 | 0.0316 |
| 30 | 0.0320 |
| 45 | 0.0406 |
| 45 | 0.0436 |
| 60 | 0.0509 |
| 60 | 0.0502 |

TABLA C.4.2

pH = 5.9 T = 50 °C
C₀ = 100 mM e₀ = 10 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0072 |
| 15 | 0.0142 |
| 15 | 0.0144 |
| 30 | 0.0207 |
| 30 | 0.0207 |
| 45 | 0.0271 |
| 45 | 0.0287 |
| 60 | 0.0384 |
| 60 | 0.0320 |

TABLA C.4.3

pH = 5.9 T = 50 °C
C₀ = 50 mM e₀ = 10 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0095 |
| 15 | 0.0214 |
| 15 | 0.0208 |
| 30 | 0.0321 |
| 30 | 0.0325 |
| 45 | 0.0432 |
| 45 | 0.0439 |
| 60 | 0.0516 |
| 60 | 0.0530 |

TABLA C.4.4

pH = 5.9 T = 50 °C
C₀ = 50 mM e₀ = 5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0073 |
| 15 | 0.0142 |
| 15 | 0.0142 |
| 30 | 0.0208 |
| 30 | 0.0212 |
| 45 | 0.0287 |
| 45 | 0.0283 |
| 60 | 0.0353 |
| 60 | 0.0342 |

TABLA C.4.5

pH = 5.9 T = 50 °C
C₀ = 10 mM e₀ = 5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0175 |
| 15 | 0.0453 |
| 15 | 0.0459 |
| 30 | 0.0699 |
| 30 | 0.0740 |
| 45 | 0.0938 |
| 45 | 0.0933 |
| 60 | 0.1058 |
| 60 | 0.1126 |

TABLA C.4.6

pH = 5.9 T = 50 °C
C₀ = 10 mM e₀ = 2.5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0138 |
| 15 | 0.0302 |
| 15 | 0.0302 |
| 30 | 0.0464 |
| 30 | 0.0474 |
| 45 | 0.0573 |
| 45 | 0.0620 |
| 60 | 0.0735 |
| 60 | 0.0745 |

TABLA C.4.7

pH = 5.9 T = 50 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 2.5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0128 |
| 15 | 0.0387 |
| 15 | 0.0384 |
| 30 | 0.0631 |
| 30 | 0.0823 |
| 45 | 0.0806 |
| 45 | 0.1027 |
| 60 | 0.0995 |
| 60 | 0.0995 |

TABLA C.4.8

pH = 5.9 T = 50 °C
 C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0085 |
| 15 | 0.0182 |
| 15 | 0.0194 |
| 30 | 0.0333 |
| 30 | 0.0330 |
| 45 | 0.0405 |
| 45 | 0.0429 |
| 60 | 0.0549 |
| 60 | 0.0533 |

TABLA C.4.9

pH = 5.9 T = 50 °C
 C₀ = 1 mM e₀ = 1 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0182 |
| 15 | 0.0512 |
| 15 | 0.0512 |
| 30 | 0.0825 |
| 30 | 0.0860 |
| 45 | 0.1060 |
| 45 | 0.1147 |
| 60 | 0.1346 |
| 60 | 0.1398 |

TABLA C.4.10

pH = 5.9 T = 50 °C
 C₀ = 1 mM e₀ = 0.5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0108 |
| 15 | 0.0287 |
| 15 | 0.0304 |
| 30 | 0.0486 |
| 30 | 0.0521 |
| 45 | 0.0686 |
| 45 | 0.0686 |
| 60 | 0.0852 |
| 60 | 0.0842 |

TABLA C.4.11

pH = 3.9 T = 50 °C
 C₀ = 100 mM e₀ = 20 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0086 |
| 15 | 0.0405 |
| 15 | 0.0412 |
| 30 | 0.0702 |
| 30 | 0.0710 |
| 45 | 0.0992 |
| 45 | 0.1027 |
| 60 | 0.1272 |
| 60 | 0.1296 |

TABLA C.4.12

pH = 3.9 T = 50 °C
 C₀ = 100 mM e₀ = 10 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0058 |
| 15 | 0.0234 |
| 15 | 0.0241 |
| 30 | 0.0408 |
| 30 | 0.0420 |
| 45 | 0.0578 |
| 45 | 0.0585 |
| 60 | 0.0743 |
| 60 | 0.0721 |

TABLA C.4.13

pH = 3.9 T = 50°C
C₀ = 50 mM e₀ = 10 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0084 |
| 15 | 0.0316 |
| 15 | 0.0330 |
| 30 | 0.0532 |
| 30 | 0.0528 |
| 45 | 0.0747 |
| 45 | 0.0757 |
| 60 | 0.0978 |
| 60 | 0.0985 |

TABLA C.4.14

pH = 3.9 T = 50°C
C₀ = 50 mM e₀ = 5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0051 |
| 15 | 0.0181 |
| 15 | 0.0189 |
| 30 | 0.0314 |
| 30 | 0.0313 |
| 45 | 0.0434 |
| 45 | 0.0436 |
| 60 | 0.0535 |
| 60 | 0.0561 |

TABLA C.4.15

pH = 3.9 T = 50°C
C₀ = 10 mM e₀ = 5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0154 |
| 15 | 0.0625 |
| 15 | 0.0641 |
| 30 | 0.1115 |
| 30 | 0.1100 |
| 45 | 0.1584 |
| 45 | 0.1610 |
| 60 | 0.1980 |
| 60 | 0.2053 |

TABLA C.4.16

pH = 3.9 T = 50°C
C₀ = 10 mM e₀ = 2.5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0081 |
| 15 | 0.0360 |
| 15 | 0.0354 |
| 30 | 0.0604 |
| 30 | 0.0625 |
| 45 | 0.0928 |
| 45 | 0.0933 |
| 60 | 0.1147 |
| 60 | 0.1141 |

TABLA C.4.17

pH = 3.9 T = 50°C
C₀ = 5 mM e₀ = 2.5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0135 |
| 15 | 0.0570 |
| 15 | 0.0594 |
| 30 | 0.1025 |
| 30 | 0.1056 |
| 45 | 0.1477 |
| 45 | 0.1515 |
| 60 | 0.1855 |
| 60 | 0.1900 |

TABLA C.4.18

pH = 3.9 T = 50°C
C₀ = 5 mM e₀ = 1 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0078 |
| 15 | 0.0250 |
| 15 | 0.0257 |
| 30 | 0.0452 |
| 30 | 0.0465 |
| 45 | 0.0650 |
| 45 | 0.0684 |
| 60 | 0.0851 |
| 60 | 0.0841 |

TABLA C.4.19

pH = 3.9 T = 50°C
C₀ = 1 mM e₀ = 1 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0195 |
| 15 | 0.0695 |
| 15 | 0.0712 |
| 30 | 0.1164 |
| 30 | 0.1216 |
| 45 | 0.1676 |
| 45 | 0.1685 |
| 60 | 0.2102 |
| 60 | 0.2085 |

TABLA C.4.20

pH = 3.9 T = 50°C
C₀ = 1 mM e₀ = 0.5 g/L

| t, min | x |
|--------|--------|
| 0 | 0.0095 |
| 15 | 0.0382 |
| 15 | 0.0373 |
| 30 | 0.0660 |
| 30 | 0.0634 |
| 45 | 0.0921 |
| 45 | 0.0929 |
| 60 | 0.1181 |
| 60 | 0.1138 |

4.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CARBOXIMETILCELULOSA.

Utilizando el método descrito en el apartado 3.3.2 de esta Memoria se ha estudiado la hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa con la enzima Celluclast 1.5L. Se programaron experimentos para estudiar: la hidrólisis total de CMC y la influencia de la intensidad del tratamiento, de la concentración inicial de CMC, de la temperatura y del pH.

Hidrólisis total de carboximetilcelulosa.

Para evaluar la concentración inicial de sustrato en cada experimento, expresada en g/L de enlaces hidrolizables (medidos como glucosa equivalente) se ha realizado la hidrólisis total de carboximetilcelulosa eligiéndose una concentración de 1 ó 2 g/L de CMC, una concentración de enzima de 0.328 ó 5 g/L y unas condiciones de operación de pH = 4.9 y temperaturas de 40 a 50°C. Los resultados de la variación con el tiempo de las concentraciones de celobiosa y glucosa se indican en las tablas D.4.1 a D.4.4. También se ha incluido, tabla D.4.5, los resultados obtenidos por Omar (1997) utilizando una mezcla de 0.5 g/L de Celluclast y 0.5 g/L de Novozym, (e_{03}).

Influencia de la intensidad del tratamiento.

Se programaron estos experimentos manteniendo el producto $e_0 t$ constante para diferentes concentraciones iniciales de CMC. Los resultados experimentales obtenidos se indican en las tablas E.4.1 a E.4.4. Además se llevaron a cabo experimentos, tablas E.4.5 a E.4.8, en los que se mantuvo constante el producto $e_0(t + t_p)$ con el significado de t_p que se establece en el apartado 5.1. En todos los casos las condiciones de operación fueron de pH = 4.9 y T = 40°C.

Influencia de la concentración de CMC.

En las tablas F.4.1 a F.4.10 se recogen los resultados experimentales a $\text{pH} = 4.9$ y $T = 40^\circ\text{C}$ para concentraciones iniciales de CMC de 10, 7.5, 5, 2 y 1 g/L y diferentes concentraciones de enzima en cada caso.

Influencia de la temperatura.

La influencia de la temperatura se estudió en el intervalo de 40°C a 60°C y $\text{pH} = 4.9$ para diferentes concentraciones iniciales de CMC 12.5, 10, 7.5, 5, 2 y 1 g/L y dos niveles de enzima para cada caso. Los resultados experimentales obtenidos se indican en las tablas G.4.1 a G.4.12 para $T = 50^\circ\text{C}$ y en las tablas G.4.13 a G.4.22 para 60°C .

Influencia del pH.

Se estudió la influencia del pH en el intervalo de 3.9 a 5.9 manteniendo la temperatura en 50°C y variando la concentración inicial de CMC entre 10 y 1 g/L, en cada caso se utilizaron dos niveles de enzima. Los resultados obtenidos se indican en las tablas H.4.1 a H.4.8 para $\text{pH} = 5.9$ y en las tablas H.4.9 a H.4.16 para $\text{pH} = 3.9$.

TABLA D.4.1

pH = 4.9 T = 40 °C
 S₀ = 1 g/L e₀ = 0.328 g/L

| t, horas | g, mg/L | c, mg/L |
|----------|---------|---------|
| 24 | 77 | 175 |
| 28 | 85 | 150 |
| 28.5 | 80 | 177 |
| 47 | 90 | 195 |
| 48 | 88 | 187 |
| 53 | 89 | 183 |
| 72 | 88 | 200 |
| 96 | 91 | 207 |
| 124 | 98 | 202 |
| 144 | 95 | 200 |
| 168 | 92 | 196 |
| 192 | 93 | 195 |

TABLA D.4.2

pH = 4.9 T = 50 °C
 S₀ = 2 g/L e₀ = 0.5 g/L

| t, horas | g, mg/L | c, mg/L |
|----------|---------|---------|
| 23 | 180 | 330 |
| 24 | 183 | 328 |
| 25 | 169 | 370 |
| 29 | 168 | 355 |
| 30 | 180 | 356 |
| 48 | 180 | 393 |
| 49 | 180 | 374 |
| 72 | 189 | 374 |

TABLA D.4.3

pH = 4.9 T = 45 °C
 S₀ = 2 g/L e₀ = 0.5 g/L

| t, horas | g, mg/L | c, mg/L |
|----------|---------|---------|
| 24 | 176 | 357 |
| 43 | 199 | 339 |
| 47 | 194 | 344 |
| 65.5 | 199 | 330 |
| 95 | 201 | 296 |
| 138 | 205 | 370 |
| 144 | 199 | 350 |
| 160.5 | 209 | 329 |
| 168 | 211 | 325 |
| 185 | 210 | 322 |
| 192 | 213 | 314 |
| 209 | 198 | 353 |
| 330 | 216 | 360 |

TABLA D.4.4

pH = 4.9
 $S_0 = 2 \text{ g/L}$

T = 45 °C
 $e_0 = 0.5 \text{ g/L}$

| t, horas | g, mg/L | c, mg/L |
|----------|---------|---------|
| 100 | 190 | 371 |
| 168 | 201 | 397 |
| 312 | 195 | 366 |
| 336 | 203 | 355 |
| 480 | 214 | 335 |
| 502 | 217 | 323 |
| 574 | 226 | 355 |
| 600 | 227 | 320 |
| 648 | 210 | 349 |
| 744 | 201 | 358 |
| 912 | 206 | 363 |
| 936 | 208 | 344 |
| 960 | 206 | 350 |
| 984 | 231 | 329 |
| 1008 | 216 | 358 |

TABLA D.4.5

pH = 4.9
 $S_0 = 2 \text{ g/L}$

T = 45 °C
 $e_{03} = 0.5 \text{ g/L}$
 $e_0 = 0.5 \text{ g/L}$

| t, horas | g, mg/L | c, mg/L |
|----------|---------|---------|
| 1 | 146 | 269 |
| 2 | 166 | 280 |
| 3 | 173 | 284 |
| 5 | 182 | 311 |
| 6 | 183 | 313 |
| 7 | 186 | 312 |
| 8 | 186 | 309 |
| 23 | 203 | 301 |
| 24 | 203 | 305 |
| 25 | 203 | 310 |
| 26 | 205 | 309 |
| 27 | 202 | 319 |
| 29 | 204 | 323 |
| 32 | 206 | 323 |
| 47 | 207 | 331 |
| 48 | 208 | 327 |
| 50 | 208 | 329 |
| 51 | 210 | 333 |
| 52 | 210 | 328 |
| 72 | 211 | 328 |
| 73 | 211 | 328 |
| 74 | 210 | 331 |
| 75 | 210 | 327 |
| 76 | 211 | 324 |
| 77 | 210 | 327 |
| 115 | 211 | 328 |
| 116 | 211 | 325 |
| 117 | 210 | 331 |
| 118 | 210 | 328 |
| 119 | 211 | 328 |
| 120 | 211 | 328 |

TABLA E.4.1

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 12.5 \text{ g/L}$ $e_0 t = 3 \text{ g min/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 45 | 47 | 913 |
| 45 | 47 | 950 |
| 60 | 38 | 868 |
| 60 | 35 | 843 |
| 90 | 32 | 802 |
| 90 | 32 | 806 |
| 120 | 28 | 771 |
| 120 | 27 | 735 |
| 150 | 26 | 746 |
| 150 | 27 | 754 |
| 180 | 25 | 750 |
| 180 | 27 | 739 |

TABLA E.4.2

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 12.5 \text{ g/L}$ $e_0 t = 0.375 \text{ g min/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 60 | 0.9 | 216 |
| 60 | 1.2 | 224 |
| 90 | 0.6 | 226 |
| 90 | 0.9 | 227 |
| 120 | 0.9 | 196 |
| 120 | 0.6 | 210 |
| 150 | 0.3 | 200 |
| 150 | 0.6 | 203 |
| 180 | 0.6 | 198 |
| 180 | 0.3 | 206 |

TABLA E.4.3

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 5 \text{ g/L}$ $e_0 t = 3 \text{ g min/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 45 | 52 | 622 |
| 45 | 50 | 627 |
| 60 | 36 | 590 |
| 60 | 41 | 583 |
| 90 | 35 | 566 |
| 90 | 31 | 553 |
| 120 | 27 | 530 |
| 120 | 31 | 527 |
| 150 | 28 | 496 |
| 150 | 25 | 511 |
| 180 | 24 | 513 |
| 180 | 27 | 507 |

TABLA E.4.4

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 5 \text{ g/L}$ $e_0 t = 0.375 \text{ g min/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 60 | 3.1 | 191 |
| 60 | 2.5 | 177 |
| 90 | 1.6 | 168 |
| 90 | 2.2 | 154 |
| 120 | 1.2 | 146 |
| 120 | 1.9 | 146 |
| 150 | 1.9 | 166 |
| 150 | 1.9 | 156 |
| 180 | 1.6 | 152 |
| 180 | 1.9 | 153 |

TABLA E.4.5

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 12.5 \text{ g/L}$ $e_0(t+t_p) = 3 \text{ g min/L}$

| (t + t _p) min | g, mg/L | c, mg/L |
|------------------------------|---------|---------|
| 60 | 32 | 850 |
| 60 | 35 | 813 |
| 90 | 27 | 792 |
| 90 | 30 | 771 |
| 120 | 28 | 771 |
| 120 | 26 | 761 |
| 150 | 26 | 778 |
| 150 | 27 | 767 |
| 180 | 27 | 733 |
| 180 | 26 | 756 |

TABLA E.4.6

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 12.5 \text{ g/L}$, $e_0(t+t_p) = 0.375 \text{ g min/L}$

| (t + t _p) min | g, mg/L | c, mg/L |
|------------------------------|---------|---------|
| 60 | 0.3 | 180 |
| 60 | 0.9 | 171 |
| 90 | 0.3 | 180 |
| 90 | 0.9 | 172 |
| 120 | 0.3 | 186 |
| 120 | 0.6 | 184 |
| 150 | 0.3 | 196 |
| 150 | 0.6 | 182 |
| 180 | 0.3 | 190 |
| 180 | 0.6 | 182 |

TABLA E.4.7

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 5 \text{ g/L}$ $e_0(t+t_p) = 3 \text{ g min/L}$

| (t + t _p) min | g, mg/L | c, mg/L |
|------------------------------|---------|---------|
| 60 | 24 | 509 |
| 60 | 26 | 509 |
| 90 | 22 | 498 |
| 90 | 20 | 503 |
| 120 | 19 | 492 |
| 120 | 19 | 494 |
| 150 | 16 | 509 |
| 150 | 18 | 496 |
| 180 | 14 | 488 |
| 180 | 16 | 481 |

TABLA E.4.8

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 5 \text{ g/L}$ $e_0(t+t_p) = 0.375 \text{ g min/L}$

| (t + t _p) min | g, mg/L | c, mg/L |
|------------------------------|---------|---------|
| 30 | 5.3 | 152 |
| 30 | 5.0 | 150 |
| 60 | 3.7 | 144 |
| 60 | 4.1 | 151 |
| 90 | 3.7 | 141 |
| 90 | 3.7 | 132 |
| 120 | 2.8 | 127 |
| 120 | 3.7 | 130 |
| 150 | 3.1 | 132 |
| 150 | 4.1 | 122 |
| 180 | 3.1 | 124 |
| 180 | 4.7 | 130 |

TABLA F.4.1

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 10 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.125 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 15 | 33 | 641 |
| 15 | 33 | 648 |
| 30 | 49 | 805 |
| 30 | 49 | 781 |
| 45 | 58 | 851 |
| 45 | 59 | 886 |
| 60 | 74 | 949 |
| 60 | 73 | 947 |

TABLA F.4.2

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 10 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.05 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 5.2 | 321 |
| 15 | 12 | 489 |
| 15 | 12 | 475 |
| 30 | 17 | 554 |
| 30 | 17 | 541 |
| 45 | 22 | 630 |
| 45 | 19 | 568 |
| 60 | 27 | 635 |
| 60 | 25 | 668 |

TABLA F.4.3

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 7.5 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.05 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 6.4 | 258 |
| 15 | 13 | 381 |
| 15 | 13 | 376 |
| 30 | 19 | 454 |
| 30 | 20 | 468 |
| 45 | 26 | 556 |
| 45 | 24 | 525 |
| 60 | 30 | 575 |
| 60 | 29 | 579 |

TABLA F.4.4

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 7.5 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 3.9 | 177 |
| 15 | 5.9 | 269 |
| 15 | 6.2 | 265 |
| 30 | 8.8 | 342 |
| 30 | 8.4 | 338 |
| 45 | 11 | 420 |
| 45 | 12 | 403 |
| 60 | 13 | 437 |
| 60 | 13 | 429 |

TABLA F.4.5

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 5 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.05 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 6.6 | 284 |
| 15 | 14 | 369 |
| 15 | 13 | 371 |
| 30 | 20 | 441 |
| 30 | 20 | 448 |
| 45 | 25 | 480 |
| 45 | 24 | 467 |
| 60 | 29 | 505 |
| 60 | 27 | 498 |

TABLA F.4.6

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 5 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 4.8 | 175 |
| 15 | 6.9 | 224 |
| 15 | 7.2 | 222 |
| 30 | 8.1 | 237 |
| 30 | 7.8 | 219 |
| 45 | 12 | 283 |
| 45 | 11 | 296 |
| 60 | 14 | 333 |
| 60 | 15 | 338 |

TABLA F.4.7

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 2 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 4.8 | 133 |
| 15 | 6.9 | 172 |
| 15 | 7.2 | 165 |
| 30 | 9.1 | 193 |
| 30 | 9.1 | 187 |
| 45 | 11 | 213 |
| 45 | 11 | 210 |
| 60 | 12 | 221 |
| 60 | 12 | 213 |

TABLA F.4.8

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 2 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.01 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 1.2 | 83 |
| 15 | 2.5 | 101 |
| 15 | 2.5 | 99 |
| 30 | 3.7 | 116 |
| 30 | 3.7 | 116 |
| 45 | 4.4 | 129 |
| 45 | 4.7 | 133 |
| 60 | 5.3 | 140 |

TABLA F.4.9

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 1 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 3.6 | 89 |
| 15 | 5.6 | 97 |
| 15 | 5.6 | 99 |
| 30 | 6.9 | 115 |
| 30 | 6.9 | 111 |
| 45 | 7.8 | 121 |
| 45 | 8.1 | 134 |
| 60 | 12 | 113 |

TABLA F.4.10

pH = 4.9 T = 40 °C
 $S_0 = 1 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.01 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 15 | 2.5 | 65 |
| 15 | 2.5 | 74 |
| 30 | 2.8 | 70 |
| 30 | 3.1 | 80 |
| 45 | 3.7 | 87 |
| 45 | 3.7 | 96 |
| 60 | 3.7 | 81 |
| 60 | 4.4 | 90 |

TABLA G.4.1

pH = 4.9 T = 50 °C
 $S_0 = 12.5 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.05 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 5 | 344 |
| 15 | 18 | 631 |
| 30 | 27 | 782 |
| 45 | 38 | 920 |
| 60 | 49 | 972 |

TABLA G.4.2

pH = 4.9 T = 50 °C
 $S_0 = 12.5 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 0 | 177 |
| 15 | 3.1 | 381 |
| 30 | 7.5 | 528 |
| 45 | 12 | 642 |
| 60 | 16 | 703 |

TABLA G.4.3

pH = 4.9 T = 50 °C
 $S_0 = 10 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.05 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 4.5 | 310 |
| 15 | 15 | 549 |
| 15 | 16 | 572 |
| 30 | 27 | 725 |
| 30 | 28 | 743 |
| 45 | 42 | 923 |
| 45 | 40 | 903 |
| 60 | 49 | 959 |
| 60 | 52 | 962 |

TABLA G.4.4

pH = 4.9 T = 50 °C
 $S_0 = 10 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 15 | 5.6 | 354 |
| 15 | 6.2 | 351 |
| 30 | 13 | 522 |
| 30 | 12 | 510 |
| 45 | 19 | 623 |
| 45 | 19 | 615 |
| 60 | 25 | 705 |
| 60 | 24 | 716 |

TABLA G.4.5

pH = 4.9 T = 50 °C
 $S_0 = 7.5 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.05 \text{ g/L}$

| t, min | g | c(mg/L) |
|--------|-----|---------|
| 0 | 3.7 | 289 |
| 15 | 15 | 505 |
| 15 | 14 | 486 |
| 30 | 27 | 653 |
| 30 | 27 | 661 |
| 45 | 38 | 781 |
| 45 | 37 | |
| 60 | 46 | 819 |
| 60 | 48 | 824 |

TABLA G.4.6

pH = 4.9 T = 50 °C
 $S_0 = 7.5 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g | c(mg/L) |
|--------|-----|---------|
| 0 | 0.6 | 133 |
| 15 | 6.9 | 316 |
| 15 | 6.2 | 332 |
| 30 | 14 | 441 |
| 30 | 11 | 456 |
| 45 | 19 | 544 |
| 45 | 18 | 539 |
| 60 | 26 | 605 |
| 60 | 25 | 639 |

TABLA G.4.7

pH = 4.9 T = 50 °C
 $S_0 = 5 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.05 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 8.6 | 306 |
| 15 | 16 | 425 |
| 15 | 16 | 413 |
| 30 | 26 | 517 |
| 30 | 27 | 512 |
| 45 | 33 | 571 |
| 45 | 32 | 604 |
| 60 | 40 | 616 |
| 60 | 42 | 617 |

TABLA G.4.8

pH = 4.9 T = 50 °C
 $S_0 = 5 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | | 133 |
| 15 | 5.6 | 266 |
| 15 | 6.2 | 272 |
| 30 | 11 | 374 |
| 30 | 12 | 377 |
| 45 | 17 | 431 |
| 45 | 16 | 441 |
| 60 | 21 | 493 |
| 60 | 22 | |

TABLA G.4.9

pH = 4.9 T = 50 °C
 $S_0 = 2 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 2.2 | 127 |
| 15 | 5.3 | 173 |
| 15 | 5.6 | 165 |
| 30 | 8.4 | 201 |
| 30 | 9.1 | 194 |
| 45 | 11 | 226 |
| 45 | 12 | 243 |
| 60 | 13 | 236 |
| 60 | 14 | 240 |

TABLA G.4.10

pH = 4.9 T = 50 °C
 $S_0 = 2 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.01 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 0.6 | 77 |
| 15 | 1.9 | 95 |
| 15 | 1.9 | 93 |
| 30 | 3.1 | 118 |
| 30 | 3.7 | 119 |
| 45 | 4.7 | 141 |
| 45 | 5.0 | 139 |
| 60 | 5.9 | 151 |
| 60 | 5.9 | 161 |

TABLA G.4.11

pH = 4.9 T = 50 °C
 $S_0 = 1 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 4.1 | 95 |
| 15 | 5.6 | 108 |
| 15 | 5.9 | 109 |
| 30 | 7.2 | 116 |
| 30 | 7.8 | 121 |
| 45 | 8.4 | 135 |
| 45 | 9.4 | 141 |
| 60 | 9.7 | 132 |
| 60 | 10 | 134 |

TABLA G.4.12

pH = 4.9 T = 50 °C
 $S_0 = 1 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.01 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 1.5 | 78 |
| 15 | 2.8 | 86 |
| 15 | 3.1 | 82 |
| 30 | 3.7 | 99 |
| 30 | 3.7 | 95 |
| 45 | 4.4 | 106 |
| 45 | 5.0 | 100 |
| 60 | 5.0 | 117 |
| 60 | 5.6 | 113 |

TABLA G.4.13

pH = 4.9 T = 60 °C
 S₀ = 10 g/L e₀ = 0.025 g/L

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 3.5 | 252 |
| 15 | 10 | 492 |
| 15 | 9.7 | 480 |
| 30 | 17 | 684 |
| 30 | 17 | 652 |
| 45 | 22 | 794 |
| 45 | 22 | 801 |
| 60 | 27 | 858 |
| 60 | 28 | 888 |

TABLA G.4.14

pH = 4.9 T = 60 °C
 S₀ = 10 g/L e₀ = 0.01 g/L

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 0.0 | 108 |
| 15 | 2.5 | 275 |
| 15 | 2.2 | 257 |
| 30 | 4.7 | 375 |
| 30 | 4.7 | 397 |
| 45 | 6.9 | 450 |
| 45 | 6.9 | 452 |
| 60 | 8.4 | 547 |
| 60 | 9.1 | 499 |

TABLA G.4.15

pH = 4.9 T = 60 °C
 S₀ = 7.5 g/L e₀ = 0.05 g/L

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 8.0 | 307 |
| 15 | 22 | 575 |
| 15 | 23 | 578 |
| 30 | 33 | 750 |
| 30 | 34 | 716 |
| 45 | 42 | 794 |
| 45 | 42 | 852 |
| 60 | 52 | 876 |
| 60 | 50 | 841 |

TABLA G.4.16

pH = 4.9 T = 60 °C
 S₀ = 7.5 g/L e₀ = 0.025 g/L

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 1.7 | 154 |
| 15 | 8.4 | 391 |
| 15 | 9.4 | 374 |
| 30 | 15 | 523 |
| 30 | 15 | 514 |
| 45 | 19 | 584 |
| 45 | 20 | 589 |
| 60 | 24 | 657 |
| 60 | 25 | 676 |

TABLA G.4.17

pH = 4.9 T = 60 °C
 S₀ = 5 g/L e₀ = 0.05 g/L

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | | 302 |
| 15 | 21 | 428 |
| 15 | 24 | 454 |
| 15 | 25 | 462 |
| 15 | 23 | 453 |
| 30 | 31 | 529 |
| 45 | 36 | 543 |
| 60 | 42 | 622 |

TABLA G.4.18

pH = 4.9 T = 60 °C
 S₀ = 5 g/L e₀ = 0.025 g/L

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 3.4 | 175 |
| 30 | 15 | 434 |
| 30 | 16 | 432 |
| 45 | 20 | 480 |
| 45 | 20 | 481 |
| 60 | 23 | 536 |
| 60 | 23 | 543 |
| 75 | 25 | 553 |
| 75 | 26 | 558 |

TABLA G.4.19

pH = 4.9 T = 60 °C
 $S_0 = 2 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 5.2 | 132 |
| 15 | 8.4 | 186 |
| 15 | 8.8 | 192 |
| 30 | 12 | 234 |
| 30 | 11 | 238 |
| 45 | 13 | 241 |
| 45 | 13 | 264 |
| 60 | 14 | 270 |
| 60 | 13 | 269 |

TABLA G.4.20

pH = 4.9 T = 60 °C
 $S_0 = 2 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.01 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 1.2 | 81 |
| 15 | 3.1 | 111 |
| 15 | 3.4 | 111 |
| 30 | 4.3 | 143 |
| 45 | 5.6 | 160 |
| 45 | 5.3 | 167 |
| 60 | 5.9 | 174 |
| 60 | 6.2 | 187 |

TABLA G.4.21

pH = 4.9 T = 60 °C
 $S_0 = 1 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 3.3 | 104 |
| 15 | 5.6 | 122 |
| 15 | 5.3 | 128 |
| 30 | 7.2 | 137 |
| 30 | 6.9 | 135 |
| 45 | 8.1 | 159 |
| 45 | 8.1 | 150 |
| 60 | 9.7 | 144 |
| 60 | 9.4 | 148 |

TABLA G.4.22

pH = 4.9 T = 60 °C
 $S_0 = 1 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.01 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 0.9 | 85 |
| 15 | 2.5 | 89 |
| 15 | 2.2 | 87 |
| 30 | 4.7 | 106 |
| 30 | 4.7 | 105 |
| 45 | 6.9 | 110 |
| 45 | 6.9 | 110 |
| 60 | 8.4 | 119 |
| 60 | 9.1 | 129 |

TABLA H.4.1

pH = 5.9 T = 50 °C
 $S_0 = 10 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.05 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 15 | 17 | 579 |
| 15 | 18 | 571 |
| 30 | 25 | 705 |
| 30 | 22 | 652 |
| 45 | 27 | 736 |
| 45 | 27 | 712 |
| 60 | 29 | 766 |
| 60 | 28 | 775 |

TABLA H.4.2

pH = 5.9 T = 50 °C
 $S_0 = 10 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 3.6 | 242 |
| 15 | 6.9 | 339 |
| 15 | 6.9 | 337 |
| 30 | 11 | 431 |
| 30 | 11 | 433 |
| 45 | 14 | 522 |
| 45 | 13 | 503 |
| 60 | 14 | 538 |
| 60 | 16 | 547 |

TABLA H.4.3

pH = 5.9 T = 50 °C
 $S_0 = 7.5 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.05 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 4.1 | 242 |
| 15 | 12 | 418 |
| 15 | 12 | 413 |
| 30 | 16 | 499 |
| 30 | 16 | 493 |
| 45 | 21 | 555 |
| 45 | 21 | 552 |
| 60 | 25 | 607 |
| 60 | 24 | 634 |

TABLA H.4.4

pH = 5.9 T = 50 °C
 $S_0 = 7.5 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 1.2 | 135 |
| 15 | 4.7 | 267 |
| 15 | 5.3 | 283 |
| 30 | 7.8 | 337 |
| 30 | 8.1 | 351 |
| 45 | 11 | 414 |
| 45 | 11 | 416 |
| 60 | 13 | 460 |
| 60 | 13 | 454 |

TABLA H.4.5

pH = 5.9 T = 50 °C
 $S_0 = 5 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.05 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 5.5 | 242 |
| 15 | 10 | 342 |
| 15 | 10 | 334 |
| 30 | 14 | 396 |
| 30 | 14 | 395 |
| 45 | 17 | 419 |
| 45 | 17 | 431 |
| 60 | 20 | 453 |
| 60 | 20 | 479 |

TABLA H.4.6

pH = 5.9 T = 50 °C
 $S_0 = 5 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 2.7 | 154 |
| 15 | 5.0 | 226 |
| 15 | 6.2 | 236 |
| 30 | 8.4 | 291 |
| 30 | 7.8 | 287 |
| 45 | 11 | 327 |
| 45 | 11 | 319 |
| 60 | 12 | 359 |
| 60 | 12 | 373 |

TABLA H.4.7

pH = 5.9 T = 50 °C
 $S_0 = 1 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 1.1 | 76 |
| 15 | 2.5 | 85 |
| 15 | 2.5 | 88 |
| 30 | 3.1 | 95 |
| 30 | 3.4 | 97 |
| 45 | 3.4 | 95 |
| 45 | 4.1 | 101 |
| 60 | 4.7 | 107 |
| 60 | 4.7 | 131 |

TABLA H.4.8

pH = 5.9 T = 50 °C
 $S_0 = 1 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.01 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 0.8 | 77 |
| 15 | 1.5 | 76 |
| 15 | 1.9 | 75 |
| 30 | 1.9 | 79 |
| 30 | 2.2 | 77 |
| 45 | 2.2 | 81 |
| 45 | 2.5 | 85 |
| 60 | 3.1 | 83 |
| 60 | 2.8 | 87 |

TABLA H.4.9

pH = 3.9 T = 50 °C
 $S_0 = 10 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.05 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 5.3 | 384 |
| 15 | 11 | 569 |
| 15 | 11 | 558 |
| 30 | 17 | 710 |
| 30 | 18 | 704 |
| 45 | 25 | 793 |
| 45 | 25 | 845 |
| 60 | 32 | 869 |
| 60 | 33 | 919 |

TABLA H.4.10

pH = 3.9 T = 50 °C
 $S_0 = 10 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 4.5 | |
| 15 | 6.9 | 438 |
| 15 | 7.2 | 435 |
| 30 | 10 | 533 |
| 30 | 10 | 525 |
| 45 | 13 | 604 |
| 45 | 14 | 573 |
| 60 | 17 | 649 |
| 60 | 17 | 650 |

TABLA H.4.11

pH = 3.9 T = 50 °C
 $S_0 = 7.5 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.05 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 4.1 | |
| 15 | 9.6 | 460 |
| 15 | 9.3 | 459 |
| 30 | 15 | 563 |
| 30 | 15 | 557 |
| 45 | 22 | 679 |
| 45 | 22 | 591 |
| 60 | 28 | 700 |
| 60 | 28 | |

TABLA H.4.12

pH = 3.9 T = 50 °C
 $S_0 = 7.5 \text{ g/L}$ $e_0 = 0.025 \text{ g/L}$

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 2.9 | 285 |
| 15 | 5.2 | 391 |
| 15 | 5.2 | 359 |
| 30 | 8.6 | 465 |
| 30 | 8.3 | 427 |
| 45 | 11 | 484 |
| 45 | 12 | 433 |
| 60 | 14 | 519 |
| 60 | 14 | 441 |

TABLA H.4.13

pH = 3.9 T = 50 °C
 S₀ = 5 g/L e₀ = 0.05 g/L

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 15 | 7.9 | 359 |
| 15 | 7.9 | 361 |
| 30 | 15 | 492 |
| 30 | 15 | 496 |
| 45 | 23 | 590 |
| 45 | 22 | 608 |
| 60 | 30 | 701 |
| 60 | 28 | 665 |

TABLA H.4.14

pH = 3.9 T = 50 °C
 S₀ = 5 g/L e₀ = 0.025 g/L

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 15 | 3.4 | 228 |
| 15 | 4.1 | 228 |
| 30 | 7.6 | 317 |
| 30 | 7.9 | 327 |
| 45 | 11 | 370 |
| 45 | 12 | |
| 60 | 14 | 470 |
| 60 | 15 | |

TABLA H.4.15

pH = 3.9 T = 50 °C
 S₀ = 1 g/L e₀ = 0.025 g/L

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 1.0 | 85 |
| 15 | 3.8 | 122 |
| 15 | 3.4 | 102 |
| 30 | 5.8 | 142 |
| 30 | 5.8 | 135 |
| 45 | 7.6 | 148 |
| 45 | 7.6 | 160 |
| 60 | 10 | 161 |
| 60 | 9.3 | 181 |

TABLA H.4.16

pH = 3.9 T = 50 °C
 S₀ = 1 g/L e₀ = 0.01 g/L

| t, min | g, mg/L | c, mg/L |
|--------|---------|---------|
| 0 | 0.5 | 88 |
| 15 | 1.7 | 84 |
| 30 | 2.7 | 90 |
| 30 | 2.4 | 100 |
| 45 | 3.8 | 107 |
| 45 | 3.4 | 105 |
| 60 | 4.5 | 116 |
| 60 | 4.8 | 124 |

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CELOBIOSA.

En las tablas A, B y C del apartado 4 de resultados experimentales se ha recogido la variación de la conversión de celobiosa a glucosa en función del tiempo para diferentes valores de las concentraciones iniciales de celobiosa y enzima, de temperatura y de pH. Dado que en el apartado 3.4 se ha comprobado, mediante los experimentos realizados modificando el tiempo previo, que es posible aceptar que no existe desactivación significativa de la enzima, se decidió utilizar el método de las velocidades iniciales para efectuar una primera aproximación al estudio de la cinética de la hidrólisis de celobiosa.

A tal efecto se efectuaron representaciones de la conversión frente al tiempo a las diferentes concentraciones iniciales de celobiosa y valores del pH y de la temperatura, pero eligiendo en cada caso los experimentos correspondientes a la concentración inicial de enzima más reducida de las empleadas. A título de ejemplo en la figura 5.1 se recogen seis de las series experimentales a 40°C y pH igual a 4.9, en la figura 5.2 otras seis a 50°C y 60°C y pH igual a 4.9 y en la figura 5.3 otras seis a 50°C y pH igual a 3.9 y a 5.9. En todos los casos se observa que los puntos experimentales se pueden ajustar mediante líneas rectas que no pasan por el origen y en cambio tienden al valor de la conversión correspondiente a los experimentos realizados a tiempo de reacción cero, es decir, a pesar de que los diferentes métodos que se han ensayado para detener la reacción enzimática conducen a los mismos resultados, como se puso de manifiesto en el apartado 3.2.5, existe un tiempo de parada de reacción que determina la conversión detectada en los experimentos a tiempo de reacción cero. Para tener en cuenta este tiempo de parada de la reacción se decidió efectuar su estimación atendiendo a que, al utilizar en cada caso los experimentos de menor concentración inicial de enzima, los puntos se ajustan aceptablemente mediante líneas rectas:

$$x = m + nt$$

[5.1]

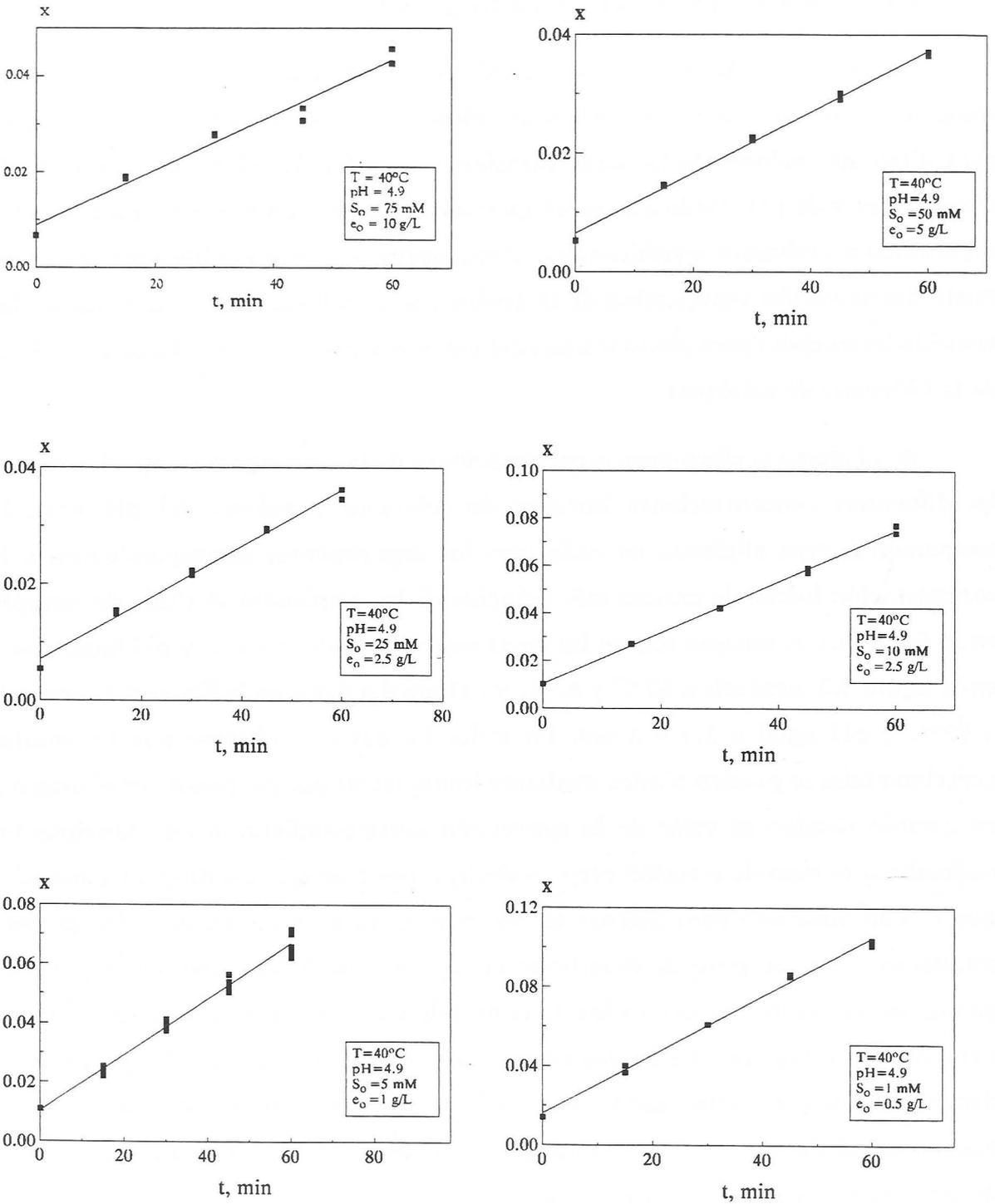


Figura 5.1

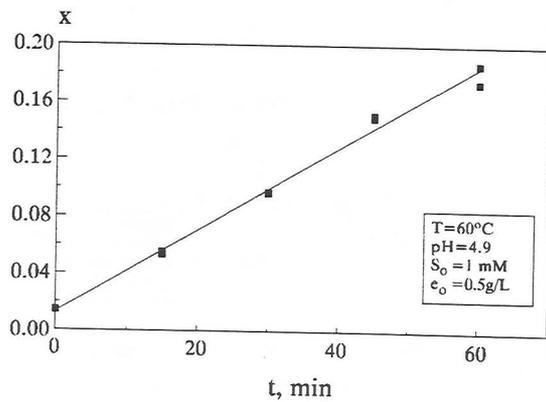
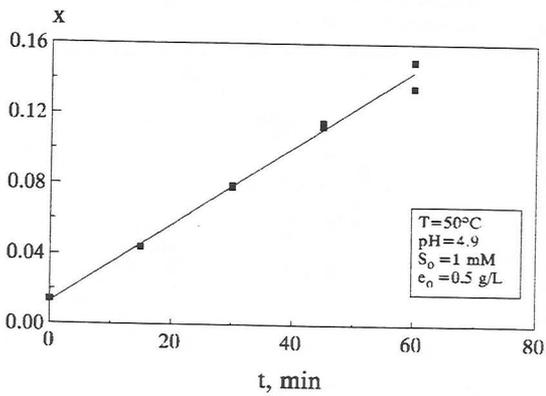
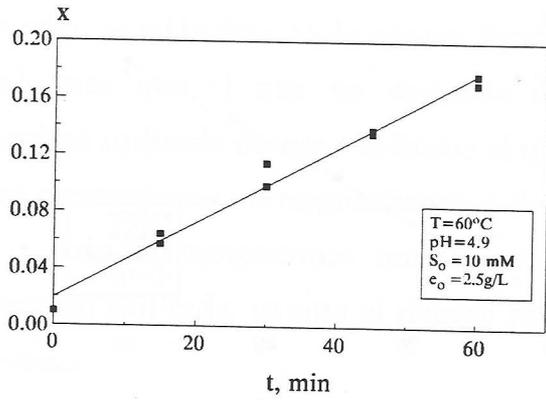
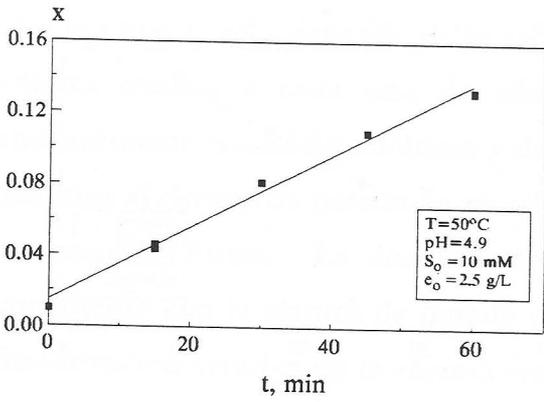
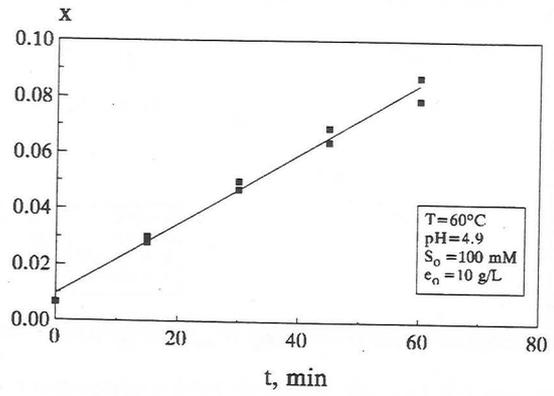
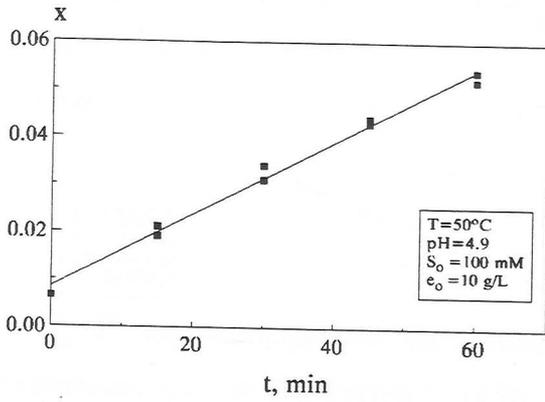


Figura 5.2

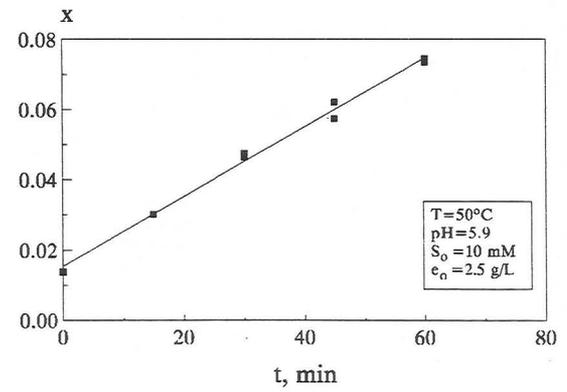
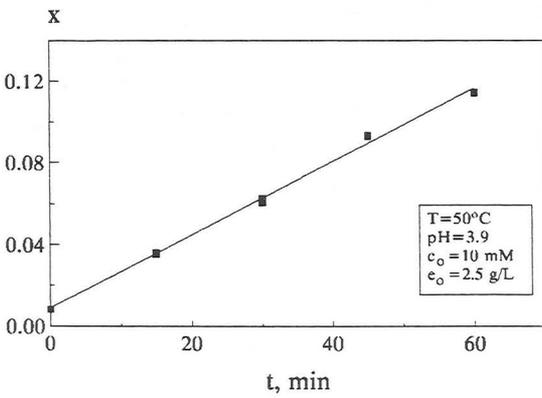
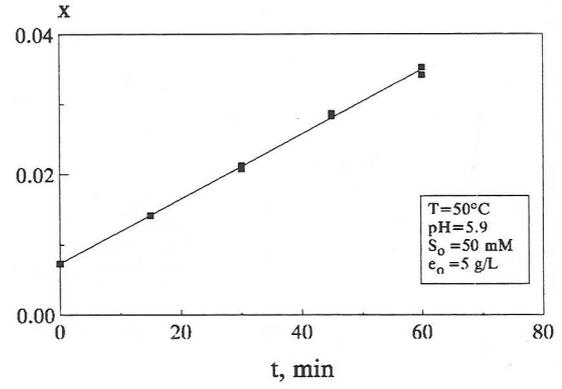
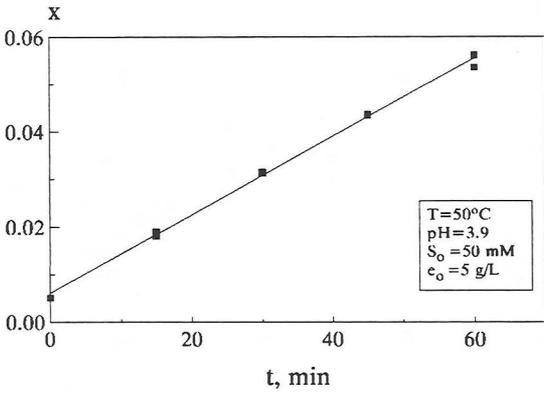
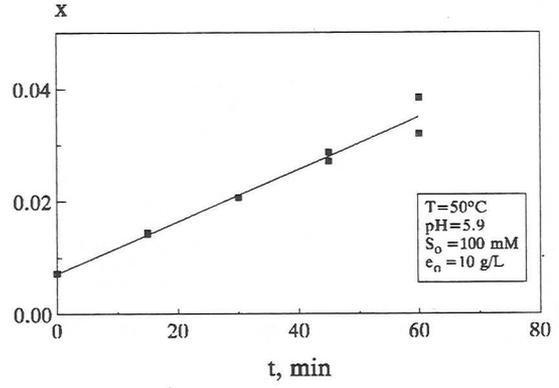
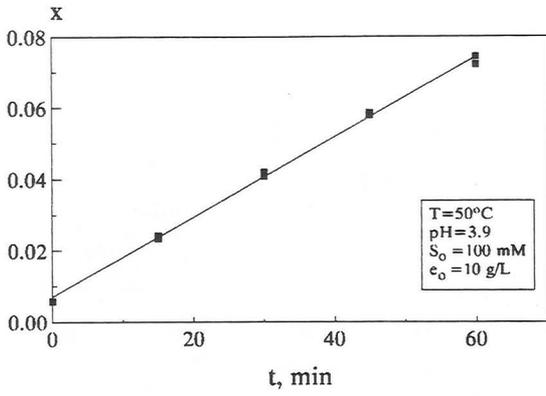


Figura 5.3

por lo que se puede calcular un tiempo de parada t_p , que sumado al tiempo de reacción t determine que la conversión inicial sea nula, ya que como se estableció en el apartado 3.2.4 no es necesario considerar prácticamente la glucosa aportada por el sustrato o la enzima, dicho tiempo vendrá dado por:

$$t_p = \frac{m}{n} \tag{5.2}$$

De esta forma se han determinado los valores de t_p , a las distintas temperaturas ensayadas, que se representan frente a la concentración inicial de celobiosa en la figura 5.4, en la que también se incluyen los correspondientes a la utilización de otra enzima, Novozym, Omar (1997), para la misma reacción y técnica experimental. Se observa que t_p sólo depende de la temperatura, señalándose en la propia figura los valores medios a cada una de ellas, mientras que el que no dependa de la concentración inicial de celobiosa y de la enzima utilizada parece confirmar el que se atribuya al tiempo de parada de reacción las conversiones correspondientes a tiempo de reacción nulos. La disminución de t_p con la temperatura también resulta consistente con la técnica de parada da reacción utilizada, ya que el tiempo para la desactivación térmica de la enzima será menor.

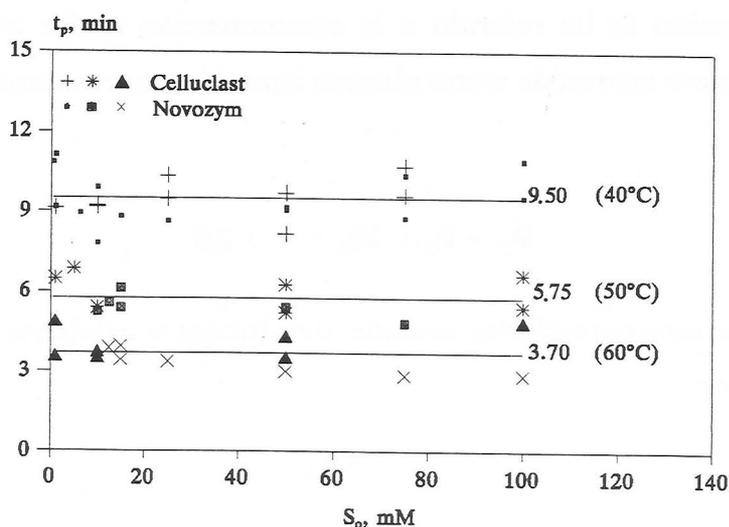


Figura 5.4

Utilizando el valor de t_p a cada temperatura se ha efectuado la representación de todas las series experimentales en la forma de x frente a $(t + t_p)$, a título de ejemplo en la figura 5.5 se recogen seis de ellas para 40°C y pH igual a 4.9, en la figura 5.6 otras seis a 50°C y 60°C y pH igual a 4.9 y en la figura 5.7 otras seis a 50°C y pH igual a 3.9 y 5.9. Se observa que en todos los casos los puntos experimentales se ajustan aceptablemente a líneas rectas que pasan por el origen, por lo que mediante ajustes por mínimos cuadrados a la ecuación:

$$x = n(t + t_p) \quad [5.3]$$

se han determinado los valores de n , que representan por lo tanto los de $(dx/dt)_{t=0}$ y que permiten la aplicación del método de las velocidades iniciales.

5.1.1 MÉTODO DE LAS VELOCIDADES INICIALES.

Sí se considera la reacción irreversible de hidrólisis de celobiosa:



y como la conversión se ha referido a la concentración molar de producto total, glucosa más celobiosa expresada como glucosa equivalente, constante durante todo el tiempo

$$P_T = P_0 + 2S_0 = P + 2S \quad [5.5]$$

se deduce que las concentraciones molares de glucosa y celobiosa en cada instante vendrán dadas por:

$$P = x P_T \quad [5.6]$$

$$S = \frac{P_T}{2} (1 - x) \quad [5.7]$$

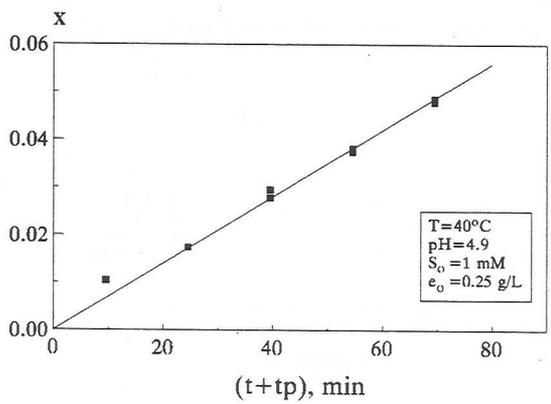
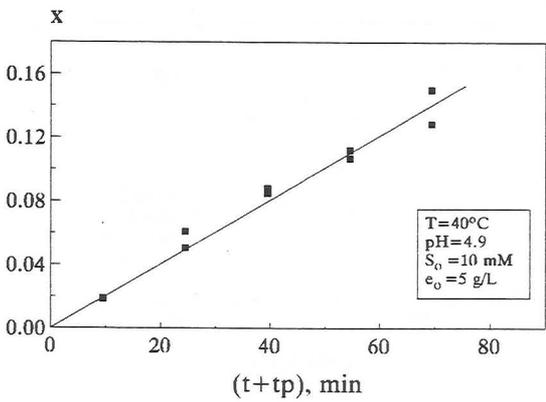
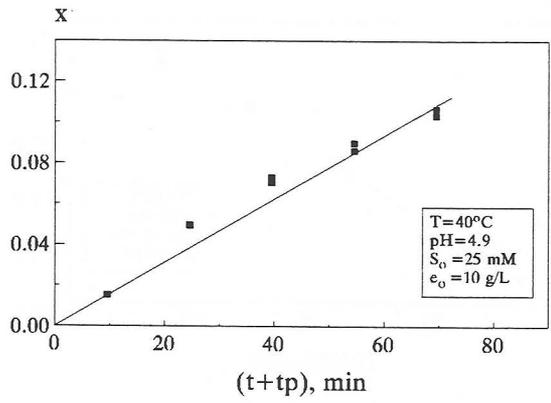
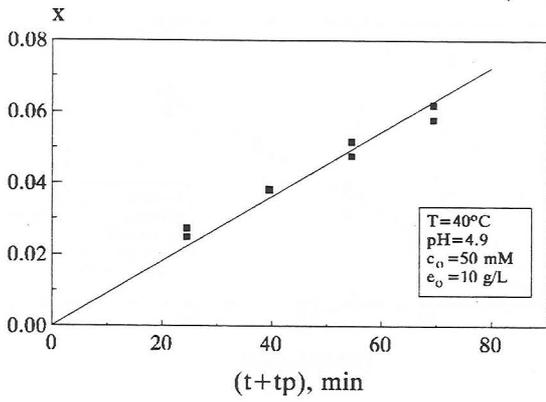
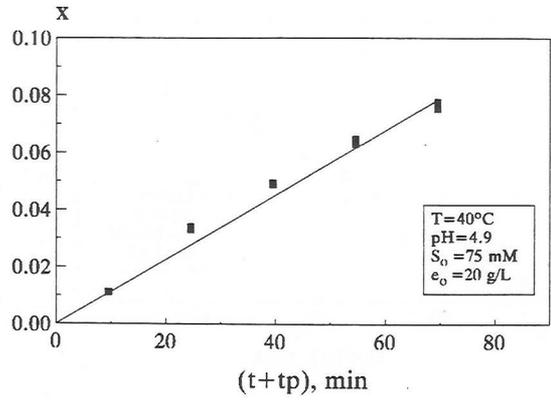
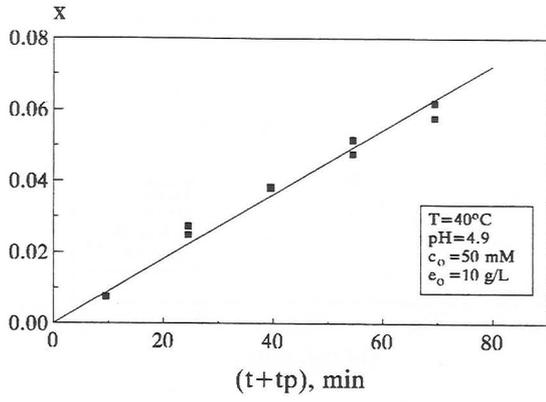


Figura 5.5

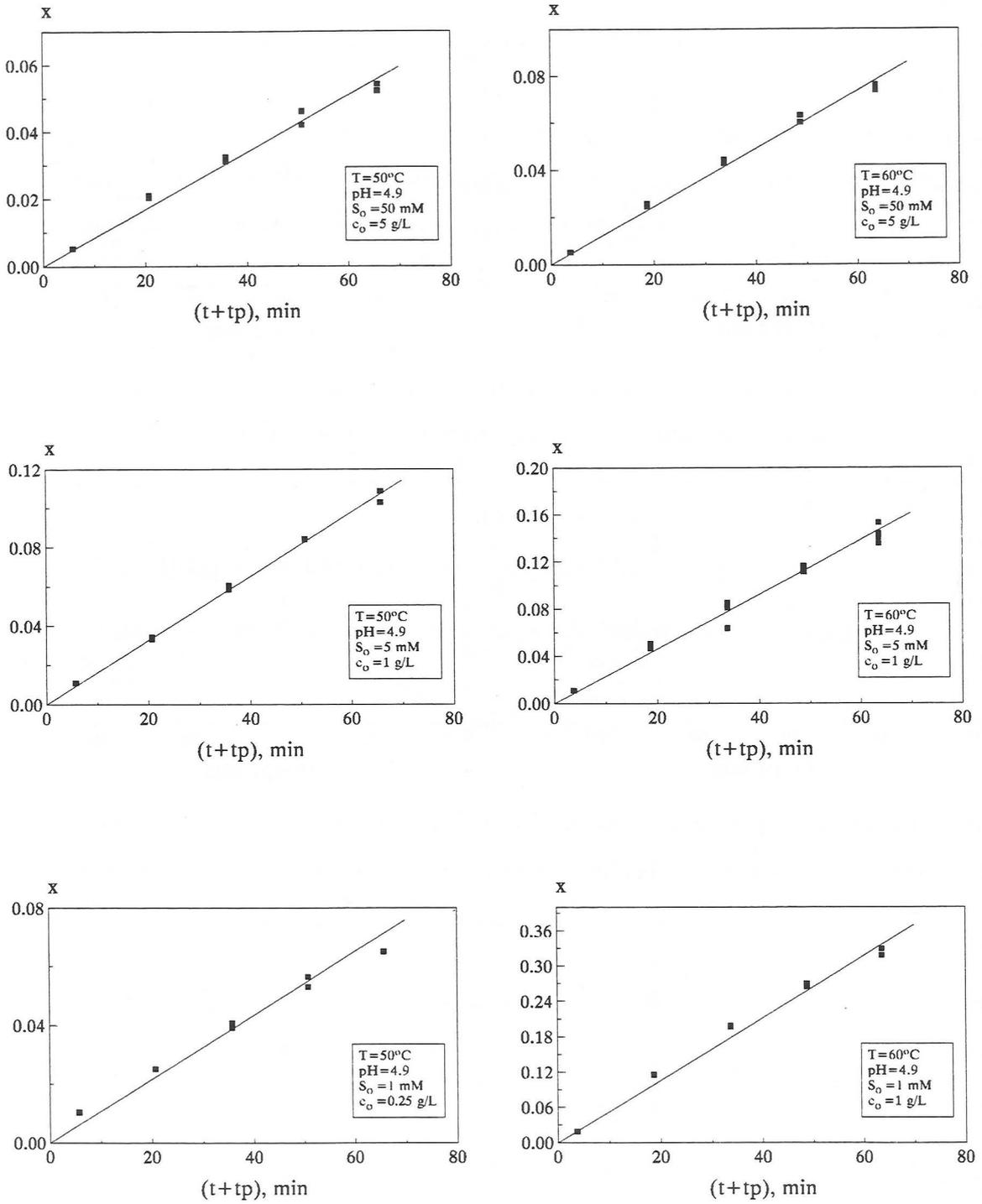


Figura 5.6

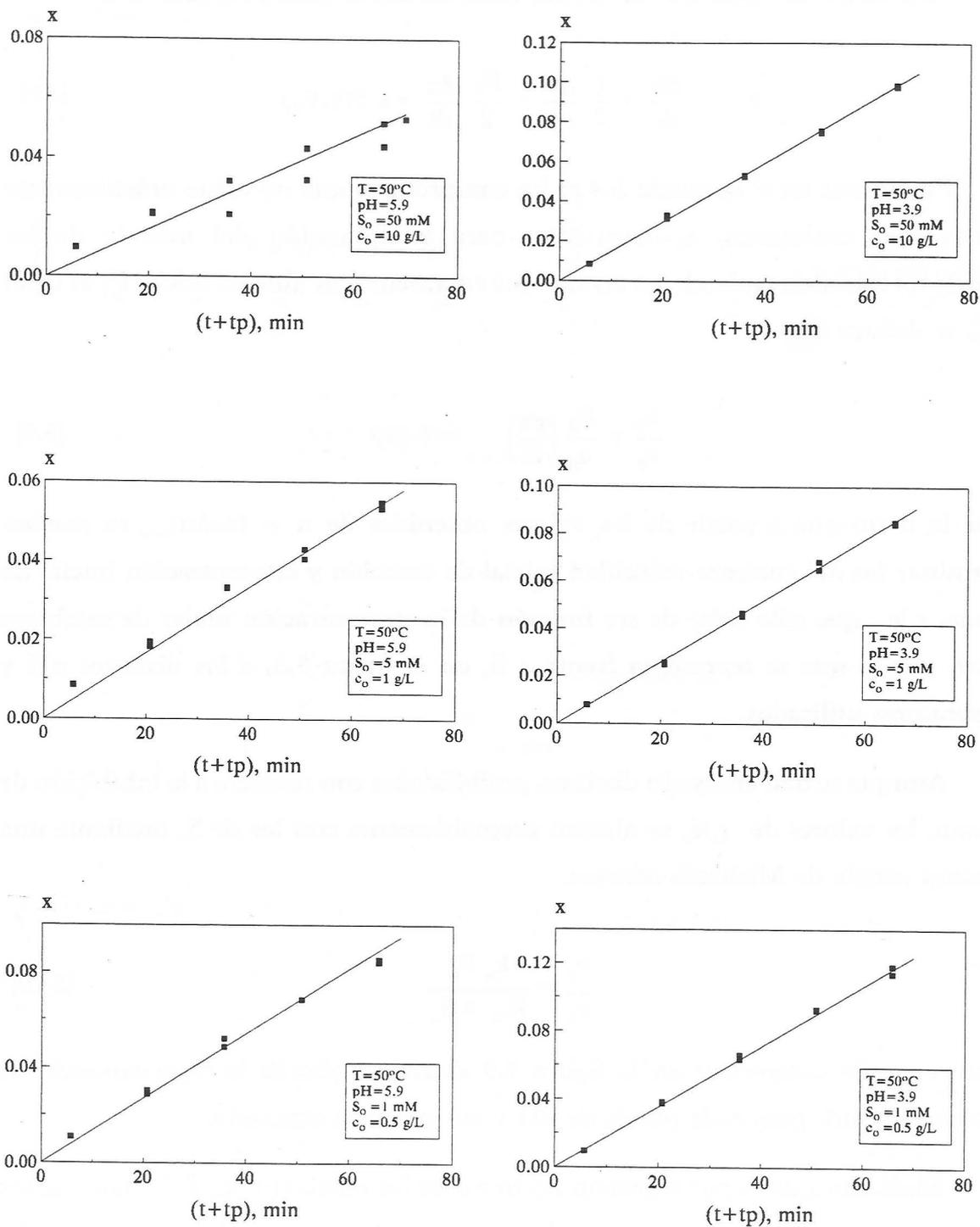


Figura 5.7

con lo que la velocidad de desaparición de celobiosa, r , de acuerdo con los mecanismos usualmente aceptados para las reacciones enzimáticas, se podrá expresar como:

$$r = - \frac{dS}{dt} = \frac{1}{2} \frac{dP}{dt} = \frac{P_T}{2} \frac{dx}{dt} = e f(x, P_T) \quad [5.8]$$

Puesto que en el apartado 3.4 se ha comprobado que no existe prácticamente desactivación enzimática, $e_0 = \text{constante}$, para la aplicación del método de las velocidades iniciales, teniendo en cuenta que en ausencia de glucosa inicial P_T es igual a $2S_0$, se deduce que:

$$\frac{r_0}{e_0} = \frac{S_0}{e_0} \left(\frac{dx}{dt} \right)_{t=0} = f(S_0) \quad [5.9]$$

y por lo tanto que a partir de los valores obtenidos de $n = (dx/dt)_{t=0}$ se pueden determinar los del cociente velocidad inicial de reacción y concentración inicial de enzima, r_0/e_0 , que sólo debe de ser función de la concentración molar de celobiosa inicial, por lo que se representa frente a S_0 en la figura 5.8, a los distintos pH y temperaturas utilizados.

Aunque se han ensayado distintas posibilidades con respecto a la inhibición de sustrato, los valores de r_0/e_0 se ajustan aceptablemente con los de S_0 mediante una ecuación simple de Michaelis-Menten.

$$\frac{r_0}{e_0} = \frac{k_a S_0}{K_M + S_0} \quad [5.10]$$

como se puede comprobar en la figura 5.9 donde se efectúa la representación de Lineweaver-Burk para cada pareja de pH y temperatura ensayado.

Mediante ajustes por regresión no lineal de las parejas ($r_0/e_0, S_0$) a la ecuación [5.10] se han obtenido los valores de k_a y K_M , que han permitido el trazado de las curvas representadas en la figura 5.8 y que por otra parte se representan, valores V.I., frente a la temperatura y el pH en la figura 5.10, conjuntamente con lo que se deducirán en el siguiente apartado por aplicación del método integral, valores M.I.

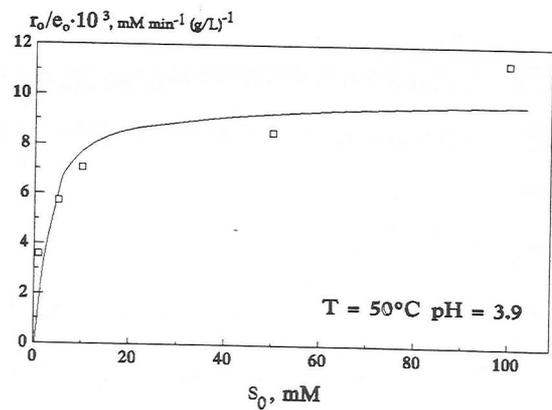
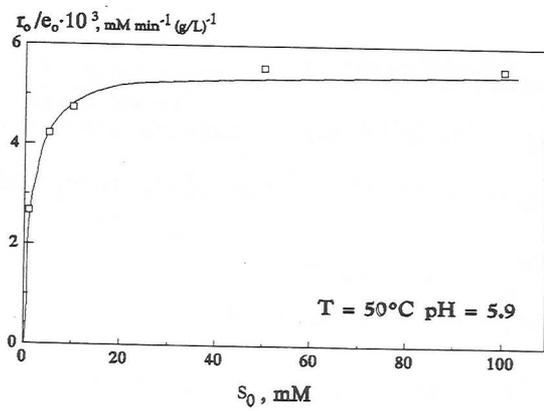
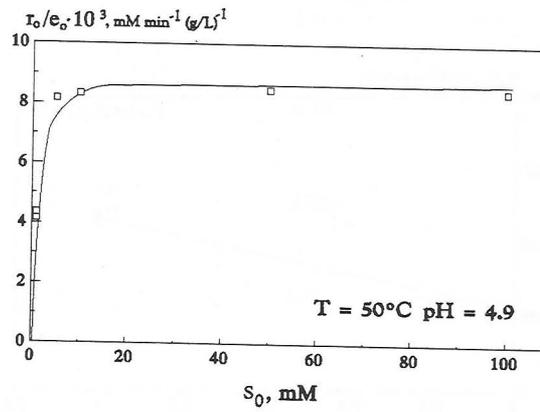
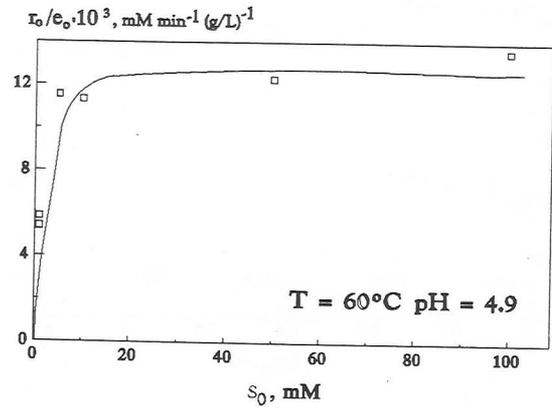
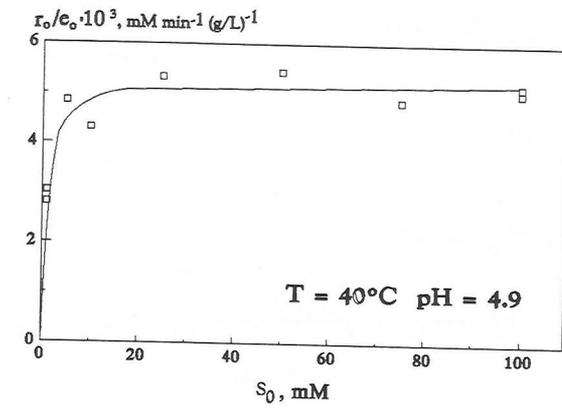


Figura 5.8

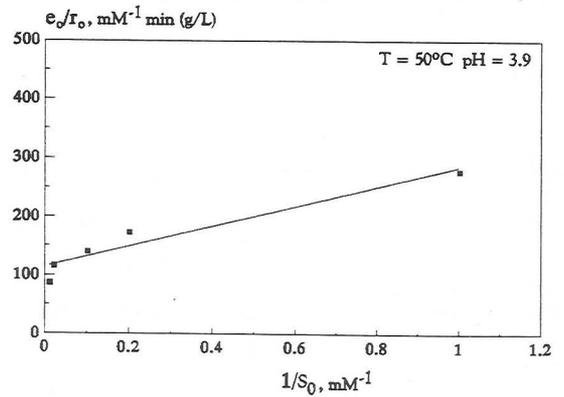
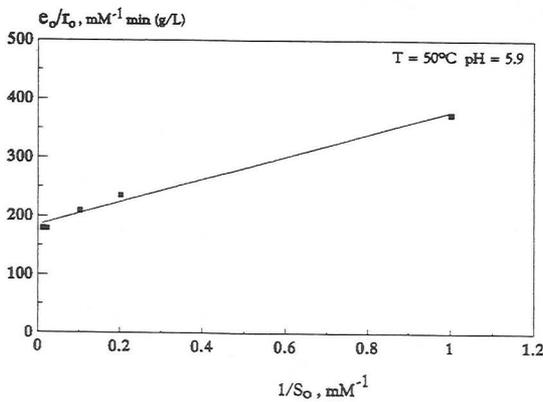
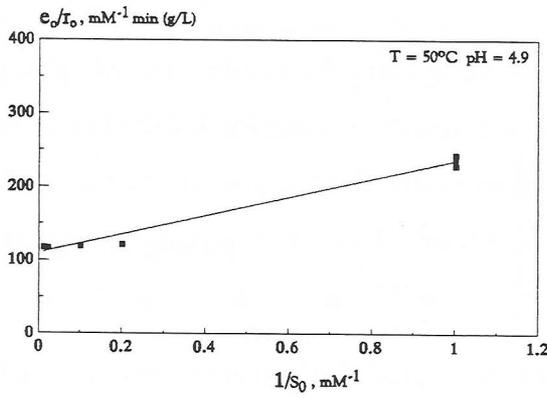
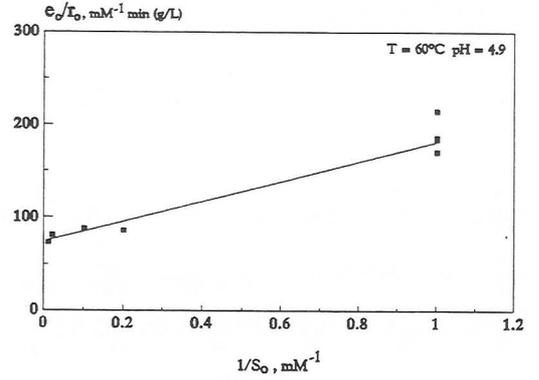
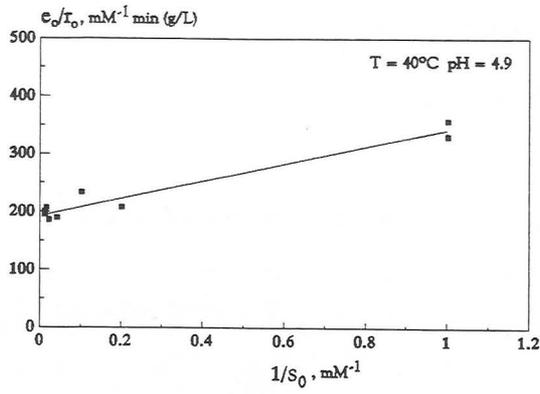


Figura 5.9

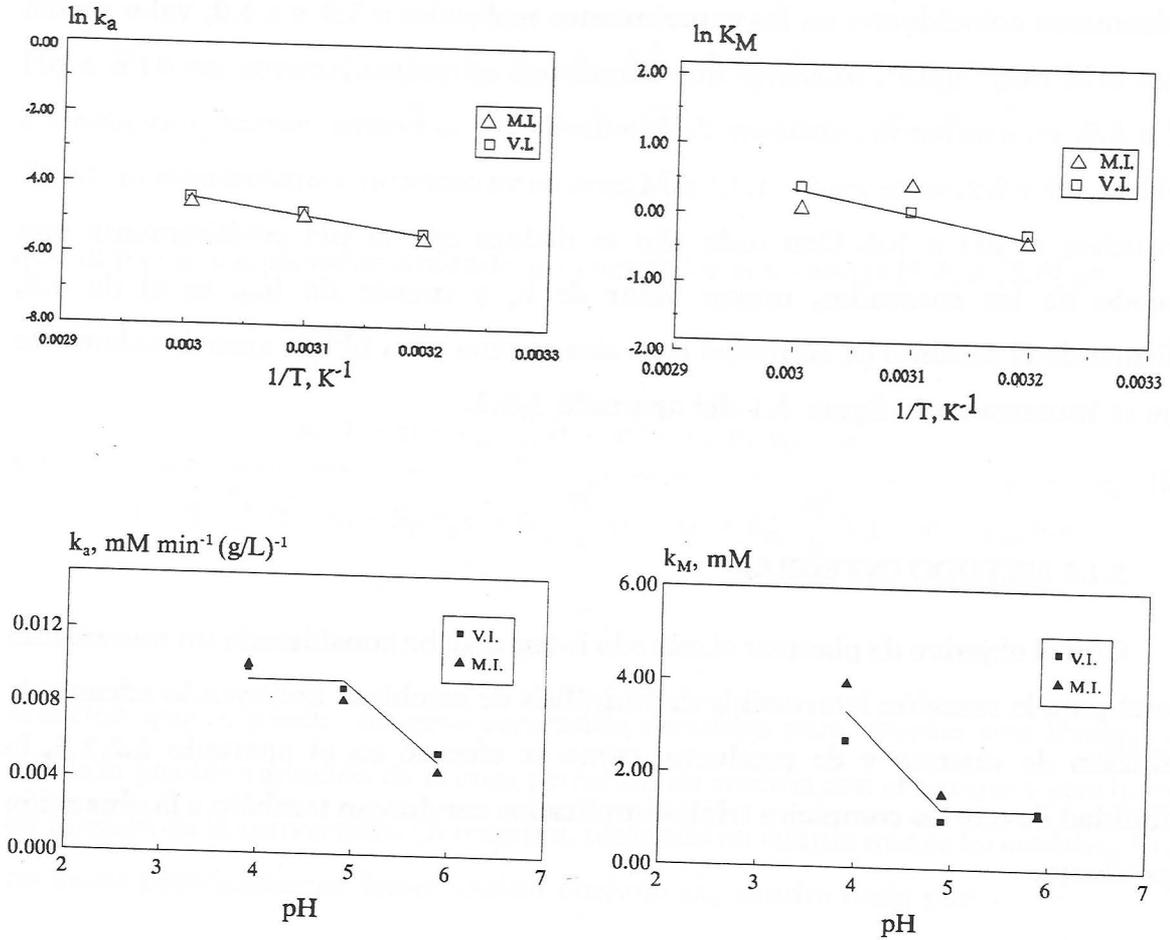


Figura 5.10

Con respecto a la temperatura se observa que los parámetros cinéticos k_a y K_M , constante cinética y de Michaelis, se ajustan aceptablemente a ecuaciones tipo Arrhenius deduciéndose las expresiones:

$$k_a = 2.78 \cdot 10^4 \exp\left(-\frac{40300}{RT}\right), \text{mM min}^{-1} (g/L)^{-1} \quad [5.11]$$

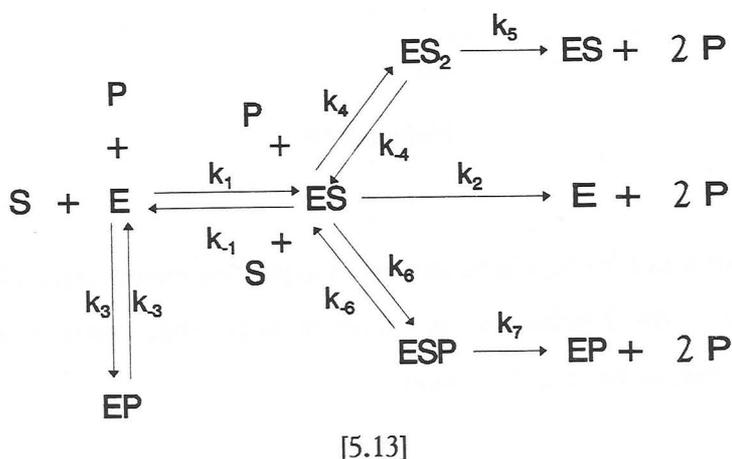
$$K_M = 3.54 \cdot 10^4 \exp\left(-\frac{28000}{RT}\right), \text{mM} \quad [5.12]$$

Con respecto al pH se observa que la constante de velocidad k_a presenta valores

prácticamente coincidentes en los experimentos realizados a 3.9 y a 4.9, valor medio $0.0094 \text{ mM min}^{-1} (\text{g/L})^{-1}$, mientras que disminuye aproximadamente un 41% a pH igual a 5.9, en cambio la constante de Michaelis K_M es prácticamente coincidente a los pH de 4.9 y 5.9, valor medio 1.13 mM para aumentar aproximadamente un 141% al reducirse el pH a 3.9. Con todo ello se deduce que el pH cinéticamente más adecuado de los ensayados, mayor valor de k_a y menor de K_M , es el de 4.9, confirmando el máximo de actividad para esta enzima a un pH de aproximadamente 5 que se muestra en la figura 3.1 del apartado 3.1.2.

5.1.2 MÉTODO INTEGRAL.

Con el objetivo de plantear el método integral se ha considerado un mecanismo general para la reacción irreversible de hidrólisis de celobiosa incluyendo además de inhibición de sustrato y de producto, como se efectuó en el apartado 2.2.2.5, la posibilidad de que los complejos triples implicados conduzcan también a la obtención de producto.



Mediante el procedimiento indicado en el apartado 2.2.1, se deduce la ecuación de velocidad

$$r = \frac{k_s S + k_{s2} S^2 + k_{sp} SP}{1 + K_s S + K_p P + K_{s2} S^2 + K_{sp} SP + K_{p2} P^2} e_o \quad [5.14]$$

que se puede transformar teniendo en cuenta las ecuaciones [5.6] a [5.8] en

$$r = \frac{k_s (1 - x) + k_{s2} \frac{P_T}{2} (1 - x)^2 + k_{sp} P_T x(1 - x)}{1 + K_s \frac{P_T}{2} (1 - x) + K_p P_T x + K_{s2} \frac{P_T^2}{4} (1 - x)^2 + K_{sp} \frac{P_T^2}{2} x(1 - x) + K_{p2} P_T^2 x^2} e_o \quad [5.15]$$

ecuación que se puede integrar separando variables para obtener una integral que refleja la posible variación de la concentración de enzima con el tiempo y otra integral en función de la conversión. La primera, teniendo en cuenta que se ha establecido que no existe prácticamente desactivación enzimática, vendrá dada por

$$y = \int_0^{t+t_p} e_o dt = e_o(t+t_p) \quad [5.16]$$

Cabe destacar que como límite superior de la integral se ha utilizado la suma del tiempo previsto para el experimento más el tiempo de parada establecido en el apartado anterior. Resolviendo la otra integral con respecto a la conversión, con valor cero para la conversión inicial, se deduce finalmente

$$y = A x + B \ln \frac{1}{(1 - x)} + C \ln \frac{1}{(1 - Dx)} \quad [5.17]$$

donde

$$A = \left(\frac{K_{s2} + 4K_{p2} - 2K_{sp}}{k_{s2} - 2k_{sp}} \right) \frac{P_T}{2} \quad [5.18]$$

$$B = \frac{1 + K_P P_T + K_{P2} P_T^2}{k_S + k_{SP} P_T} \quad [5.19]$$

$$C = \frac{2 + K_S P_T + K_{S2} \frac{P_T^2}{2} - (A + B)(2k_S + k_{S2} P_T)}{k_{S2} - 2k_{SP} P_T} \quad [5.20]$$

$$D = \left(\frac{k_{S2} - 2k_{SP}}{2k_S + k_{S2} P_T} \right) P_T \quad [5.21]$$

La ecuación [5.17] puede expresarse en la forma

$$y = m_1 \frac{P_T}{2} x + m_2 \left(\frac{1}{D_1 + P_T} \right) \ln \frac{1 - \frac{x}{\frac{D_2}{P_T} + D_3}}{1 - x} + m_3 \ln \frac{1 - \frac{x}{\frac{D_2}{P_T} + D_3}}{1 - x} +$$

$$+ m_4 P_T \ln \frac{1 - \frac{x}{\frac{D_2}{P_T} + D_3}}{1 - x} + m_5 \ln \frac{1}{1 - \frac{x}{\frac{D_2}{P_T} + D_3}} + m_6 P_T \ln \frac{1}{1 - \frac{x}{\frac{D_2}{P_T} + D_3}} \quad [5.22]$$

donde

$$m_1 = \frac{K_{S2} + 4K_{P2} - 2K_{SP}}{k_{S2} - 2k_{SP}} \quad [5.23]$$

$$m_2 = \frac{1}{k_{SP}} \left(1 - \frac{K_P k_S}{k_{SP}} + \frac{K_{P2} k_S^2}{k_{SP}^2} \right) \quad [5.24]$$

$$m_3 = \frac{K_P}{k_{SP}} - \frac{K_{P2} k_S}{k_{SP}^2} \quad [5.25]$$

$$m_4 = \frac{K_{P2}}{k_{SP}} \quad [5.26]$$

$$m_5 = \frac{K_S - 2K_{SP} - m_1 k_S}{k_{S2} - 2k_{SP}} \quad [5.27]$$

$$m_6 = \frac{K_{SP} - 4K_{P2} - m_1 k_{SP}}{k_{S2} - 2k_{SP}} \quad [5.28]$$

$$D_1 = \frac{k_S}{k_{SP}} \quad [5.29]$$

$$D_2 = \frac{2k_S}{k_S - 2k_{SP}} \quad [5.30]$$

$$D_3 = \frac{k_{S2}}{k_S - 2k_{SP}} \quad [5.31]$$

Los parámetros incluidos se relacionan con los correspondientes a la ecuación de velocidad [5.14] según

$$k_s = \frac{D_1}{m_2 + D_1 m_3} \quad [5.32]$$

$$k_{s2} = \frac{D_3 (D_1 - 2)}{m_2 + D_1 m_3} \quad [5.33]$$

$$k_{sp} = \frac{1}{m_2 + D_1 m_3} \quad [5.34]$$

$$K_{P2} = \frac{m_4}{m_2 + D_1 m_3} \quad [5.35]$$

$$K_P = \frac{m_3 + D_1 m_4}{m_2 + D_1 m_3} \quad [5.36]$$

$$K_{sp} = \frac{m_6 [D_3 (D_1 - 2) - 2] + 4 m_4 + m_1}{m_2 + D_1 m_3} \quad [5.37]$$

$$K_{s2} = \frac{(m_1 + 2 m_6) [D_3 (D_1 - 2) - 2] + 2 (2 m_4 + m_1)}{m_2 + D_1 m_3} \quad [5.38]$$

$$K_s = \frac{(m_5 + 2 m_6) [D_3 (D_1 - 2) - 2] + m_1 (D_1 + 2) + 8 m_4}{m_2 + D_1 m_3} \quad [5.39]$$

Aunque se puede proceder de forma directa a la determinación de los parámetros de la ecuación [5.22] con todos los datos experimentales, mediante

regresión múltiple tanteando los valores de D_1 , D_2 y D_3 , y posteriormente simplificar la ecuación, si algunos parámetros no resultan significativos para el ajuste de los datos experimentales, se ha preferido plantear un procedimiento sistemático utilizando simplificaciones de la ecuación [5.17] como las siguientes:

1ª Inhibición de producto mixta y de sustrato con complejo ES_2 útil:

La ecuación [5.14] se simplifica a

$$r = \frac{k_s S + k_{s2} S^2}{1 + K_s S + K_p P + K_{s2} S^2 + K_{sp} SP} e_o \quad [5.40]$$

y la ecuación integrada a

$$y = \alpha P_T x + \mu \ln \frac{1}{1-x} + \gamma P_T \ln \frac{1}{1-x} + \delta \ln \frac{1}{1 - \frac{x}{1 + \frac{\beta}{P_T}}} + \varepsilon P_T \ln \frac{1}{1 - \frac{x}{1 + \frac{\beta}{P_T}}} \quad [5.41]$$

donde

$$\alpha = \frac{K_{s2} - 2K_{sp}}{2k_{s2}} \Rightarrow K_{s2} = 2 \frac{\alpha + \gamma + \varepsilon}{\mu\beta} \quad [5.42]$$

$$\mu = \frac{1}{k_S} \quad \Rightarrow \quad k_S = \frac{1}{\mu} \quad [5.43]$$

$$\gamma = \frac{K_P}{k_S} \quad \Rightarrow \quad K_P = \frac{\gamma}{\mu} \quad [5.44]$$

$$\delta = \frac{K_S - 2K_P}{k_{S2}} - \frac{1}{k_S} - \frac{(K_{S2} - 2K_{SP}) k_S}{k_{S2}^2} \quad \Rightarrow \quad K_S = \frac{\delta + \mu + 2\beta (\alpha + \gamma)}{\mu\beta} \quad [5.45]$$

$$\varepsilon = \frac{K_{SP}}{k_{S2}} - \frac{K_P}{k_S} \quad \Rightarrow \quad K_{SP} = \frac{\varepsilon + \gamma}{\mu\beta} \quad [5.46]$$

$$\beta = \frac{k_S}{k_{S2}} \quad \Rightarrow \quad k_{S2} = \frac{1}{\mu\beta} \quad [5.47]$$

2ª Inhibición de producto y de sustrato pero con complejo triple ES₂ no útil para la formación de producto:

La ecuación de velocidad se simplifica a

$$r = \frac{k_S S}{1 + K_S S + K_P P + K_{S2} S^2 + K_{SP} SP} e_0 \quad [5.48]$$

y la ecuación integrada a

$$y = \alpha_1 P_T x + \mu \ln \frac{1}{1-x} + \gamma P_T \ln \frac{1}{1-x} + \phi P_T^2 x^2 + \rho P_T^2 x \quad [5.49]$$

existiendo las siguientes relaciones además de las [5.43] y [5.44]

$$\alpha_1 = \frac{K_S - 2K_P}{2k_S} \quad \Rightarrow \quad K_S = 2 \frac{\alpha_1 + \gamma}{\mu} \quad [5.50]$$

$$\phi = \frac{2K_{SP} - K_{S2}}{8k_S} \quad \Rightarrow \quad K_{SP} = 2 \frac{\rho + 2\phi}{\mu} \quad [5.51]$$

$$\rho = \frac{K_{S2}}{4k_S} \quad \Rightarrow \quad K_{S2} = 4 \frac{\rho}{\mu} \quad [5.52]$$

También se puede considerar dentro de este caso las simplificaciones de inhibición de producto acompetitiva; $K_P = 0$ y por lo tanto $\gamma = 0$

$$y = \alpha_2 P_T x + \mu \ln \frac{1}{1-x} + \phi P_T^2 x^2 + \rho P_T^2 x \quad [5.53]$$

donde

$$\alpha_2 = \frac{K_S}{2k_S} \quad \Rightarrow \quad K_S = 2 \frac{\alpha_2}{\mu} \quad [5.54]$$

y de inhibición competitiva; $K_{SP} = 0$, que conduce a una ecuación específica

$$y = \alpha_1 P_T x + \mu \ln \frac{1}{1-x} + \gamma P_T \ln \frac{1}{1-x} + v P_T^2 x (2-x) \quad [5.55]$$

donde

$$v = \frac{K_{S2}}{8 k_S} \quad \rightarrow \quad K_{S2} = 8 \frac{v}{\mu} \quad [5.56]$$

3ª Inhibición de producto:

La ecuación de velocidad se simplifica a

$$r = \frac{k_S S}{1 + K_S S + K_P P + K_{SP} SP} e_0 \quad [5.57]$$

y la ecuación integrada a

$$y = \alpha_1 P_T x + \mu \ln \frac{1}{1-x} + \gamma P_T \ln \frac{1}{1-x} + \phi_1 P_T^2 x^2 \quad [5.58]$$

donde

$$\phi_1 = \frac{K_{SP}}{4k_S} \quad \rightarrow \quad K_{SP} = 4 \frac{\phi_1}{\mu} \quad [5.59]$$

También se puede considerar, dentro de solamente inhibición de producto, las simplificaciones de inhibición competitiva, $K_{SP} = 0$ y por lo tanto $\Phi_1 = 0$

$$y = \alpha_1 P_T x + \mu \ln \frac{1}{1-x} + \gamma P_T \ln \frac{1}{1-x} \quad [5.60]$$

y de inhibición acompetitiva, $K_p = 0$ y por lo tanto $\gamma = 0$

$$y = \alpha_2 P_T x + \mu \ln \frac{1}{1-x} + \phi_1 P_T^2 x^2 \quad [5.61]$$

4ª Inhibición de sustrato:

La ecuación se simplifica a

$$r = \frac{k_s S + k_{s2} S^2}{1 + K_s S + K_{s2} S^2} e_o \quad [5.62]$$

y la ecuación integrada a

$$y = \alpha_3 P_T x + \mu \ln \frac{1}{1-x} + \delta_1 \ln \frac{1}{1 - \frac{x}{1 + \frac{\beta}{P_T} \frac{1}{2}}} \quad [5.63]$$

donde

$$\alpha_3 = \frac{K_{s2}}{2k_{s2}} \Rightarrow K_{s2} = 2 \frac{\alpha_3}{\mu\beta} \quad [5.64]$$

$$\delta_1 = \frac{K_s}{k_{S2}} - \frac{1}{k_s} - \frac{K_{S2}k_s}{k_{S2}^2} \quad \rightarrow \quad K_s = \frac{\delta_1 + \mu + 2\beta\alpha_3}{\mu\beta} \quad [5.65]$$

En el caso de que el complejo triple ES_2 no fuera útil para la formación de producto se obtendrá

$$y = \alpha_2 P_T x + \mu \ln \frac{1}{1-x} + v P_T^2 x (2-x) \quad [5.66]$$

5ª Ecuación de Michaelis- Menten:

Que corresponde a la máxima simplificación de la ecuación [5.14]

$$r = \frac{k_s S}{1 + K_s S} e_o \quad [5.67]$$

y conduce a la ecuación integrada

$$y = \alpha_2 P_T x + \mu \ln \frac{1}{1-x} \quad [5.68]$$

A modo de resumen en la tabla 5.1 se recogen los números de las ecuaciones que corresponden a cada uno de los casos considerados y a cada una de las relaciones entre los parámetros cinéticos y los coeficientes que se obtendrían por regresión múltiple, así como las condiciones que estos deben cumplir para que todos los parámetros cinéticos tengan un valor positivo.

TABLA 5.1 Resumen de las ecuaciones y condiciones a considerar según el modelo cinético

| Tipo de inhibición | Ecu. | k_s | k_{s2} | k_{sp} | K_s | K_{s2} | K_p | K_{sp} | K_{p2} | Condiciones |
|---|------|-------|----------|----------|-------|----------|-------|----------|----------|--|
| General | 22 | 32 | 33 | 34 | 39 | 38 | 36 | 37 | 35 | $D_1 > 0, m_4 > 0, D_3(D_1-2) > 0, (m_3 + D_1 m_4) > 0$ $(m_2 + D_1 m_3) > 0,$ $(m_6[D_3(D_1-2)-2] + 4m_4 + m_1) > 0,$ $((m_1 + 2m_6)[D_3(D_1-2)-2] + 2(2m_4 + m_1)) > 0$ $((m_5 + 2m_6)[D_3(D_1-2)-2] + 8m_4 + m_1(D_1 + 2)) > 0$ |
| Prod. mix. y sust. ES ₂ útil | 41 | 43 | 47 | -- | 45 | 42 | 44 | 46 | -- | $\mu > 0, \gamma > 0, \beta > 0, (\epsilon + \gamma) > 0, (\alpha + \gamma + \epsilon) > 0$ $[\delta + \mu + 2\beta(\gamma + \alpha)] > 0$ |
| Prod. y sust. | 49 | 43 | -- | -- | 50 | 52 | 44 | 51 | -- | $\mu > 0, \gamma > 0, (\alpha_1 + \gamma) > 0, \rho > 0, (\rho + 2\Phi) > 0$ |
| Prod. acomp. y sust. | 53 | 43 | -- | -- | 54 | 52 | -- | 51 | -- | $\mu > 0, \gamma > 0, \alpha_2 > 0, \rho > 0, (\rho + 2\Phi) > 0$ |
| Prod. comp. y sust. | 55 | 43 | -- | -- | 50 | 56 | 44 | -- | -- | $\mu > 0, \gamma > 0, v > 0, (\alpha_1 + \gamma) > 0$ |
| Prod. mixta | 58 | 43 | -- | -- | 50 | -- | 44 | 59 | -- | $\mu > 0, \gamma > 0, \Phi_1 > 0, (\alpha_1 + \gamma) > 0$ |
| Prod. competitiva | 60 | 43 | -- | -- | 50 | -- | 44 | -- | -- | $\mu > 0, \gamma > 0, (\alpha_1 + \gamma) > 0$ |
| Prod. acompetitiva | 61 | 43 | -- | -- | 50 | -- | -- | 59 | -- | $\mu > 0, \Phi_1 > 0, \alpha_2 > 0$ |
| Sust. ES ₂ útil | 63 | 43 | 47 | -- | 65 | 64 | -- | -- | -- | $\alpha_3 > 0, \mu > 0, \beta > 0, [\delta_1 + \mu + 2\beta\alpha_3] > 0$ |
| Sust. | 66 | 43 | -- | -- | 54 | 56 | -- | -- | -- | $\mu > 0, \alpha_2 > 0, v > 0$ |
| Michaelis-Menten | 68 | 43 | - | -- | 54 | - | - | -- | -- | $\alpha_2 > 0, \mu > 0$ |

De acuerdo con lo deducido en el apartado anterior, por aplicación del método de las velocidades iniciales, los resultados experimentales se ajustan aceptablemente sin considerar la existencia de inhibición por sustrato por lo que solo se han considerado las simplificaciones 3ª Inhibición de producto y 5ª Ecuación de Michaelis-Menten de entre las desarrolladas anteriormente, aunque cabe resaltar que la aplicación de las ecuaciones [5.49], [5.53] y [5.55] correspondientes a la simplificación 2º, inhibición de producto y de sustrato, conduce, para todos los pH y temperaturas ensayados, al no cumplimiento de de las condiciones especificadas en la tabla 5.1, es decir, a la obtención de valores negativos para algunos de los parámetros cinéticos.

Los resultados obtenidos con las ecuaciones ensayadas se resumen en la tabla 5.2 en la que se observa que sólomente la ecuación de Michaelis-Menten es aplicable a las cinco series de resultados experimentales obtenidos a distintos valores del pH y la temperatura, la consideración de inhibición acompetitiva a cuatro de las series y la de las inhibiciones competitiva y mixta únicamente a tres de las series. Los valores de los parámetros cinéticos se han obtenido a partir de los coeficientes obtenidos por regresión múltiple con la hoja de cálculo Microsoft Excel, que además proporciona los valores del coeficiente de determinación r^2 , del error típico para los coeficientes y de la F de Snedecor experimental. Se observa que los valores de r^2 son aceptables aunque, lógicamente por el menor número de coeficientes implicados, es la ecuación de Michaelis-Menten la que determina valores ligeramente inferiores para r^2 .

Con los valores obtenidos en la aplicación de la ecuación de Michaelis-Menten se ha efectuado los test de la t de Student para los coeficientes de la regresión múltiple y de la F de Snedecor sobre la aleatoriedad de los resultados obtenidos, comprobándose la utilidad de los coeficientes y de la ecuación para la estimación de "y" con unas probabilidades de error inferiores al 0.5 y al 1% respectivamente. Para visualizar los ajustes que se consiguen de los valores de "y" en cada una de las series experimentales, en las figuras 5.11 a 5.15 se han representado los valores del cociente entre los valores de "y" experimental, e_{0,t_e} , y de "y" teórico, y_t , frente a los valores experimentales, observándose que se agrupan aceptablemente en torno a la línea horizontal de valor unidad, aunque se observa una ligera tendencia de sobreestimación

de "y" a valores reducidos que podría atribuirse parcialmente a los errores inherentes a la determinación del tiempo de parada de reacción que se efectuó en el apartado anterior.

Tabla 5.2

| 40°C pH = 4.9 | | | | | | |
|--------------------|---------|-------|-------|----------|--------|------|
| Ecuación | k_s | K_s | K_p | K_{SP} | r^2 | F |
| Michaelis-Menten | 0.00633 | 1.38 | - | - | 0.9805 | 4070 |
| Prod. competitiva | 0.12 | 21.6 | 80.3 | - | 0.9889 | 4783 |
| Prod. acompetitiva | 0.00288 | 0.54 | - | 0.0166 | 0.9857 | 3714 |
| Prod. mixta | 0.114 | 20.6 | 76.3 | 0.00102 | 0.9889 | 3565 |
| 50°C pH = 4.9 | | | | | | |
| Ecuación | k_s | K_s | K_p | K_{SP} | r^2 | F |
| Michaelis-Menten | 0.00715 | 0.86 | - | - | 0.9909 | 4638 |
| Prod. competitiva | 0.124 | 1.37 | 1.63 | - | 0.993 | 3991 |
| Prod. acompetitiva | 0.00661 | 0.78 | - | 0.0026 | 0.991 | 3104 |
| 60°C pH = 4.9 | | | | | | |
| Ecuación | k_s | K_s | K_p | K_{SP} | r^2 | F |
| Michaelis-Menten | 0.01035 | 0.87 | - | - | 0.985 | 3056 |
| Prod. competitiva | 0.68 | 47.6 | 92.5 | - | 0.993 | 4481 |
| Prod. acompetitiva | 0.00655 | 0.46 | - | 0.0094 | 0.99 | 3118 |
| Prod. mixta | 0.022 | 1.45 | 2.37 | 0.0142 | 0.994 | 3758 |
| 50°C pH = 3.9 | | | | | | |
| Ecuación | k_s | K_s | K_p | K_{SP} | r^2 | F |
| Michaelis-Menten | 0.00257 | 0.25 | - | - | 0.9779 | 1728 |
| 50°C pH = 5.9 | | | | | | |
| Ecuación | k_s | K_s | K_p | K_{SP} | r^2 | F |
| Michaelis-Menten | 0.00381 | 0.84 | - | - | 0.959 | 918 |
| Prod. acompetitiva | 0.00184 | 0.28 | - | 0.034 | 0.976 | 1080 |
| Prod. mixta | 0.01159 | 1.48 | 16.7 | 0.119 | 0.987 | 1427 |

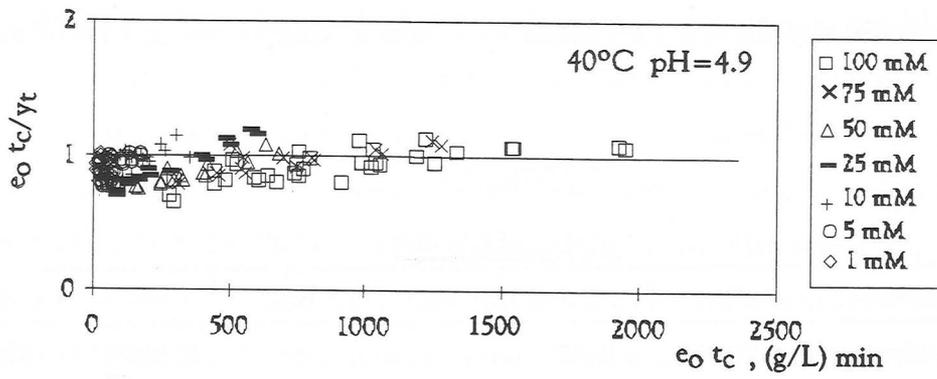


Figura 5.11

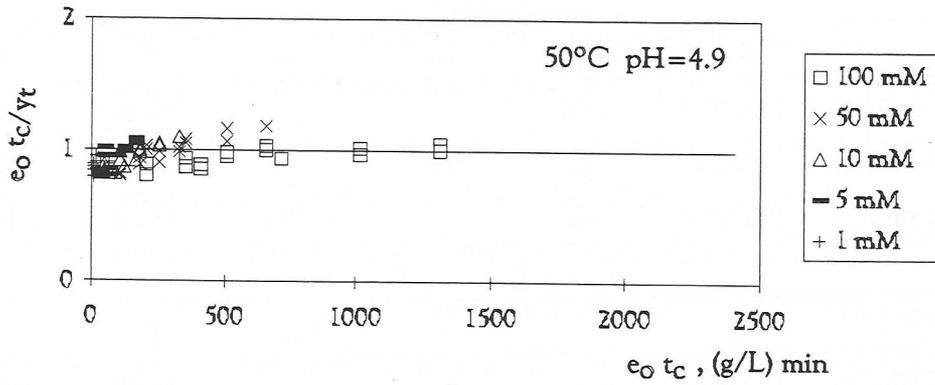


Figura 5.12

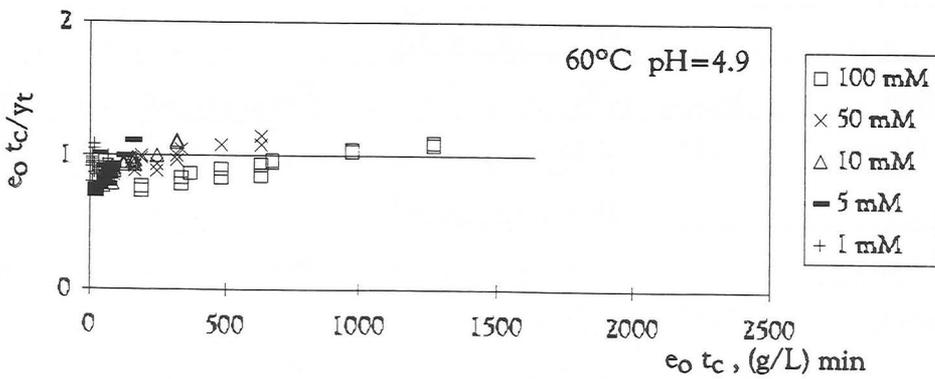


Figura 5.13

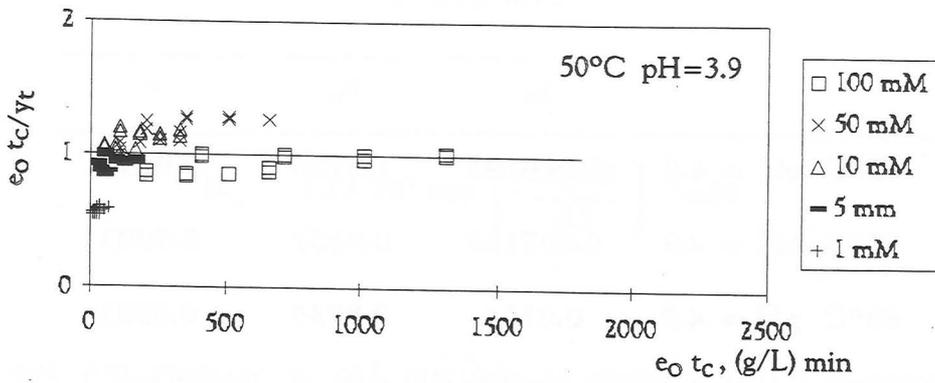


Figura 5.14

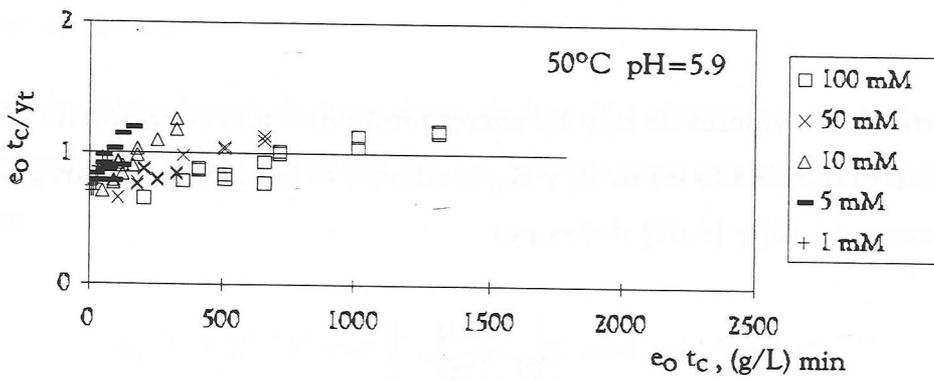


Figura 5.15

Para comprobar los valores de los parámetros k_s y K_s obtenidos con la hoja de cálculo Microsoft Excel, se ha ensayado también la de SigmaPlot para la ecuación de Michaelis-Menten; los valores obtenidos, tabla 5.3, son prácticamente coincidentes con los reseñados en la tabla 5.2.

Tabla 5.3

| | k_s | K_s | r^2 |
|---------------|----------|--------|--------|
| 40°C pH = 4.9 | 0.006295 | 1.3720 | 0.9997 |
| 50°C pH = 4.9 | 0.007155 | 0.8607 | 0.9983 |
| 60°C pH = 4.9 | 0.0104 | 0.8735 | 0.9983 |
| 50°C pH = 3.9 | 0.002567 | 0.2514 | 0.991 |
| 50°C pH = 5.9 | 0.003809 | 0.8351 | 0.9984 |

A partir de los valores de k_s y K_s correspondientes a la ecuación de Michaelis-Menten se han determinado los de k_a y K_M mediante la relación entre los parámetros de las ecuaciones [5.10] y [5.67] dadas por

$$K_M = \frac{1}{K_s} \quad [5.69]$$

$$k_a = \frac{k_s}{K_s} \quad [5.70]$$

Los valores obtenidos se encuentran representados en la figura 5.10 del apartado anterior, para compararlos con los obtenidos mediante el método de las velocidades iniciales, se observa que existe una coincidencia aceptable entre los valores obtenidos por ambos métodos para todas las series de pH y temperatura realizadas. Los valores obtenidos mediante el método integral permiten deducir la siguiente relación de los parámetros cinéticos con la temperatura:

$$k_a = 3.56 \cdot 10^4 \exp \left(-\frac{41200}{RT} \right), \text{ mM min}^{-1}(\text{g/L})^{-1} \quad [5.71]$$

$$K_M = 2.13 \cdot 10^3 \exp \left(-\frac{20300}{RT} \right), \text{ mM} \quad [5.72]$$

mientras que con respecto al pH también se deduce que k_a presenta valores prácticamente coincidentes a los pH de 3.9 y 4.9, valor medio $0.0093 \text{ mM min}^{-1}(\text{g/L})^{-1}$, para disminuir un 50% a pH igual a 5.9 y la constante de Michaelis es prácticamente coincidente a los pH de 4.9 y 5.9, valor medio de 1.40 mM, para aumentar un 283% al reducirse el pH a 3.9.

Dada la coincidencia de los valores de k_a y K_M obtenidos por ambos métodos se ha efectuado un ajuste conjunto de los valores con respecto a la temperatura, resultando:

$$k_a = 3.15 \cdot 10^4 \exp \left(-\frac{40700}{RT} \right), \text{ mM min}^{-1}(\text{g/L})^{-1} \quad [5.73]$$

$$K_M = 8.68 \cdot 10^3 \exp \left(-\frac{24100}{RT} \right), \text{ mM} \quad [5.74]$$

que ponen de manifiesto un valor de 40.7 kJ/mol para la energía de activación de la constante k_a y de 24.1 kJ/mol para la variación de la constante de Michaelis con la temperatura. Mientras que el valor medio de k_a para pH entre 3.9 y 4.9 es de $0.00935 \text{ mM min}^{-1}(\text{g/L})^{-1}$, para disminuir a 0.00505 a pH igual a 5.9 y la constante de Michaelis presenta un valor medio de 1.27 mM para pH entre 4.9 y 5.9 aumentando hasta 3.54 para pH igual a 3.9.

5.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CMC.

El estudio de la hidrólisis de CMC con Celluclast se llevó a cabo mediante dos series iniciales de experimentos para establecer la hidrólisis total y la influencia de la intensidad de tratamiento, mientras que para las series planteadas a diferentes valores de la temperatura y del pH se desarrolla un modelo cinético que permita justificar los resultados obtenidos considerando una productividad en glucosa y una productividad global.

5.2.1 HIDRÓLISIS TOTAL.

Para expresar la concentración inicial de sustrato como glucosa o celobiosa potencial, se ha realizado la hidrólisis total de carboximetilcelulosa con Celluclast; los resultados experimentales se muestran en las tablas D.4.1 a D.4.4 y se representan en las figuras 5.16 y 5.17. En ellas se observa que los cocientes entre las concentraciones, tanto de glucosa como de celobiosa, y de CMC, permanecen prácticamente constantes para tiempos de hidrólisis iguales o superiores a 100 horas, con independencia de la concentración inicial de CMC, 1 ó 2 g/L, de la temperatura, 40, 45 o 50°C, y de la concentración inicial de enzima, 0.328 o 0.5 g/L, aunque se observan ligeras tendencias de disminución de C_f y de aumento de G_f a lo largo del tiempo.

Tomando la media aritmética de los resultados experimentales obtenidos a partir de 100 horas, se obtiene que en la hidrólisis total los cocientes entre las concentraciones, tanto de glucosa como de celobiosa, e inicial de CMC tienden a los siguientes valores:

$$\frac{G_f}{S_0} = 0.556, \text{ mmol glucosa/g CMC} \quad [5.75]$$

$$\frac{C_f}{S_0} = 0.5245, \text{ mmol celobiosa/g CMC} \quad [5.76]$$

En base a la definición del producto total de la hidrólisis, celobiosa más glucosa, expresado como glucosa equivalente,

$$P = 2C + G \quad [5.77]$$

se puede definir el producto total correspondiente a la hidrólisis total,

$$P_f = 2C_f + G_f \quad [5.78]$$

de forma que a su cociente con la concentración inicial de CMC, P_f / S_0 , también le corresponderá un valor constante. En la figura 5.18 se representa frente al tiempo los valores de dicho cociente, incluyendo los datos de la tabla D.4.5 correspondientes a la hidrólisis de CMC con mezclas de 0.5 g/L de Celluclast y de Novozym, Omar (1997), no observándose ninguna tendencia de variación a tiempos elevados por lo que se determina un valor constante de

$$\frac{P_f}{S_0} = 1.593, \text{ mmol glucosaequivalente/g CMC} \quad [5.79]$$

Utilizando el producto total correspondiente a la hidrólisis total, P_f , máximo alcanzable a tiempos elevados, se pueden definir para la hidrólisis de CMC una productividad en glucosa

$$x_c = \frac{G}{P_f} \quad [5.80]$$

cuyo valor máximo, hidrólisis total, vendrá dado por el cociente G_f/P_f , al que corresponderá un valor de 0.349, y una productividad global referido al producto total de la hidrólisis de CMC, celobiosa más glucosa, expresado como glucosa equivalente,

$$x_p = \frac{P}{P_f} = \frac{2C + G}{2C_f + G_f} \quad [5.81]$$

cuyo valor máximo, hidrólisis total, será la unidad. Estas productividades se utilizarán posteriormente en el desarrollo del modelo cinético.

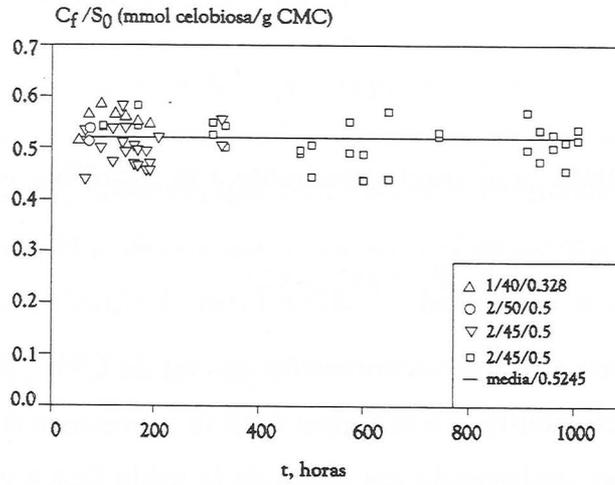


Figura 5.16

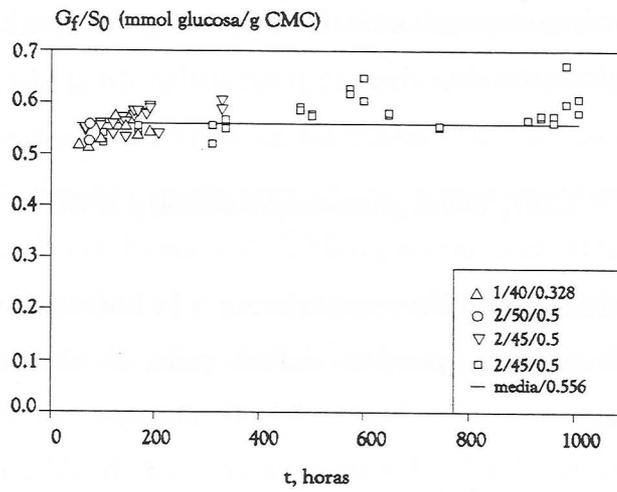


Figura 5.17

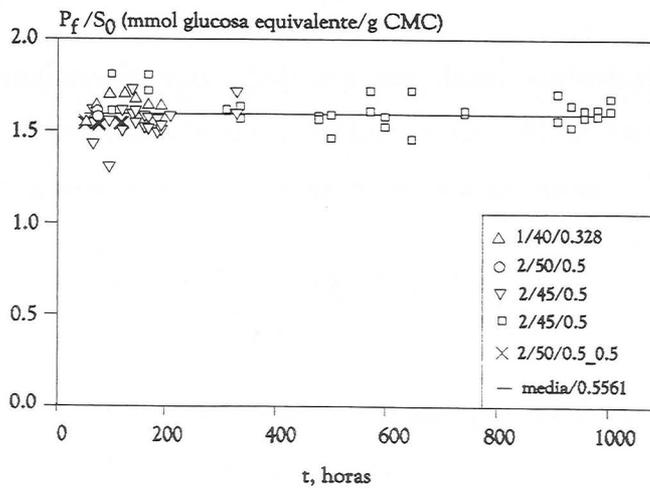


Figura 5.18

5.2.2 INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD DE TRATAMIENTO.

En el apartado 3.4 se ha comprobado, mediante los experimentos realizados con celobiosa y modificando el tiempo previo, que es posible aceptar que no existe desactivación significativa de la enzima, lo que en general determina que se puede utilizar el producto e_0t como variable apropiada para establecer la intensidad del tratamiento enzimático. Sin embargo, en la actuación de Celluclast sobre CMC se ha señalado, Wood y McCrae (1979), Mandels (1981) y Camacho y col. (1987), un efecto sinérgico entre las endocelulasas, E_1 , y las exoglucanasas, E_2 , detectable por una disminución de la conversión global con el tiempo en experimentos realizados a una concentración inicial de CMC fija y manteniendo constante la intensidad de tratamiento, e_0t . Además, dicha disminución resulta más acentuada a tiempos reducidos y al aumentar la concentración de enzima.

A partir de los resultados experimentales de las tablas E.4.1 a E.4.4 del apartado 4.2, correspondientes a series de experimentos realizados a distintos valores de S_0 y de e_0t , se han determinado las variaciones de las productividades en glucosa y global con el tiempo, figuras 5.19 a) y b) y 5.20 a) y b).

Se observa que a la mayor intensidad de tratamiento ensayada, 3 min g/L, tanto x_p como x_c presentan una disminución apreciable con el tiempo, lo que se justificaría por la existencia de un efecto sinérgico a tiempos reducidos, sin embargo, a la menor intensidad de tratamiento ensayada, 0.375 min g/L, apenas se aprecia la influencia de un efecto sinérgico.

Con objeto de cuantificar la importancia del efecto sinérgico y dado que en el apartado 5.1 se ha determinado que en la hidrólisis de celobiosa con Celluclast existe un tiempo de parada de reacción significativo, se realizaron los experimentos recogidos en las tablas E.4.1 a E.4.8, programados para comparar experimentos en los que se ha mantenido constante el producto $e_0(t+t_p)$, que sería la intensidad de tratamiento adecuada para incorporar el efecto del tiempo de parada de reacción. En las figuras 5.19 c) y d) y 5.20 c) y d), se ha representado las variaciones con el tiempo de x_p y x_c . Se observa que la consideración del tiempo de parada de reacción amortigua

de forma significativa las disminuciones de x_p y x_c con el tiempo por lo que el posible efecto sinérgico sería muy reducido y es aceptable su no consideración, líneas horizontales en las figuras 5.19 c) y d) y 5.20 c) y d) para los distintos experimentos del producto $e_o t_c$ constante, sobre todo si se tiene en cuenta que se está utilizando el tiempo de parada de reacción determinado en los experimentos realizados de hidrólisis de celobiosa con Celluclast; en consecuencia en la discusión posterior de los resultados obtenidos de la hidrólisis de CMC con Celluclast se utilizará el producto $e_o t_c$, igual a "y", como variable apropiada para establecer la intensidad del tratamiento enzimático.

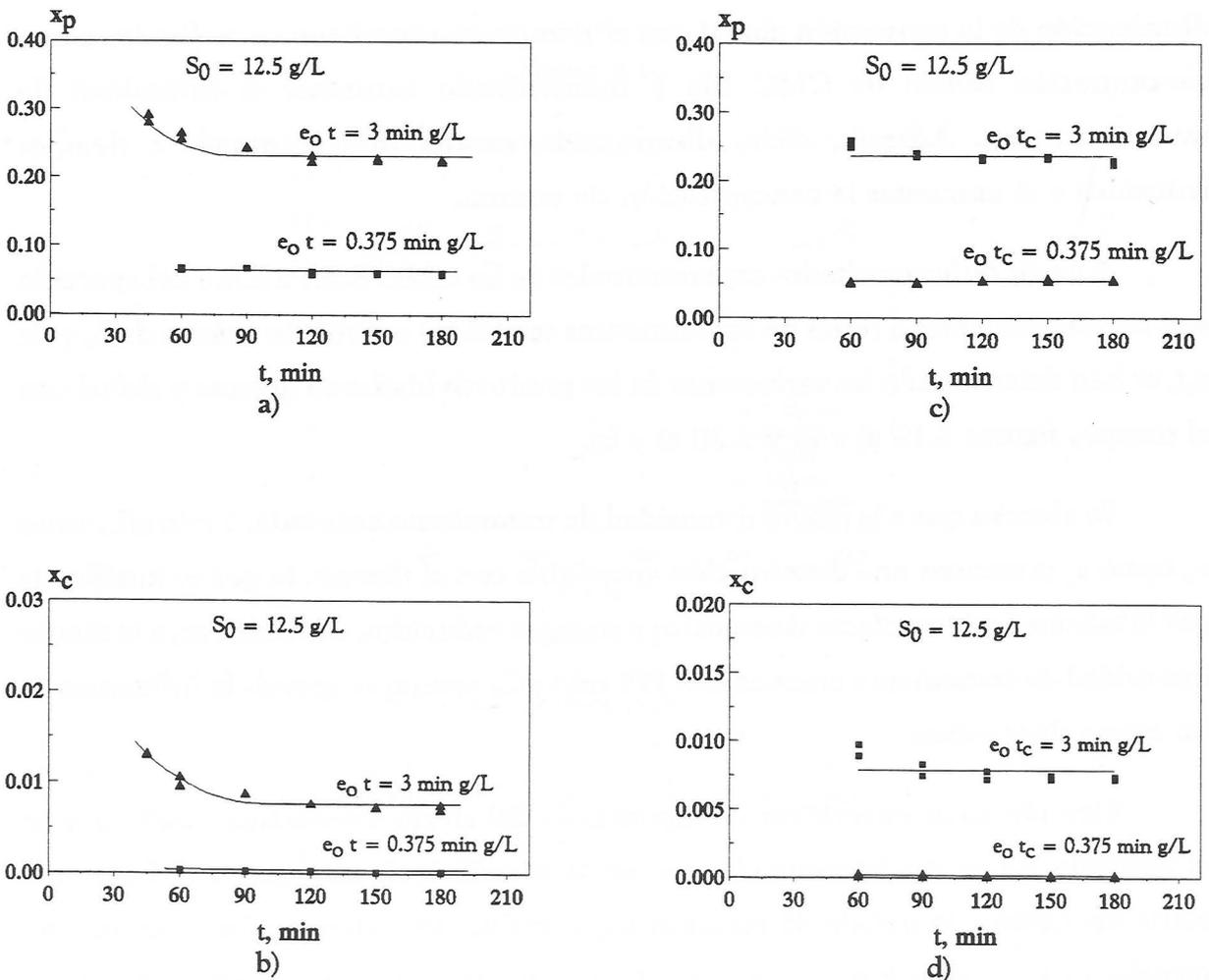


Figura 5.19

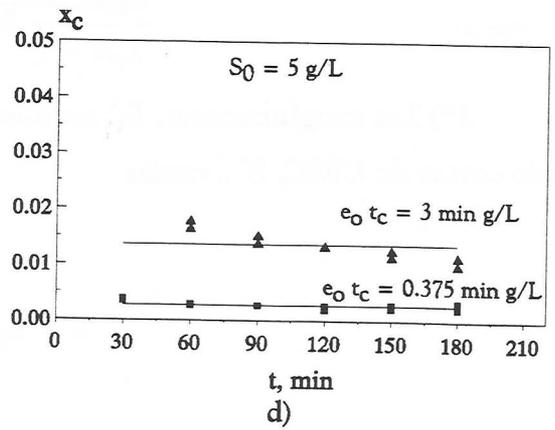
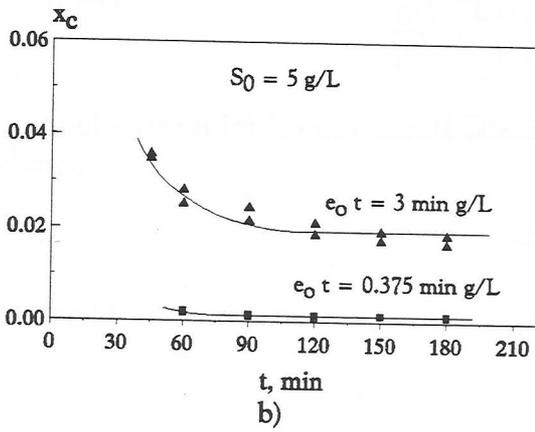
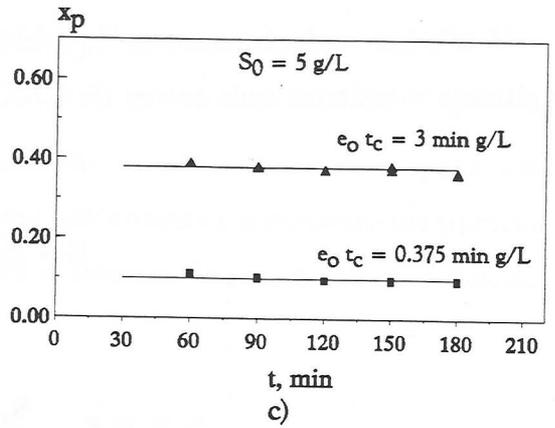
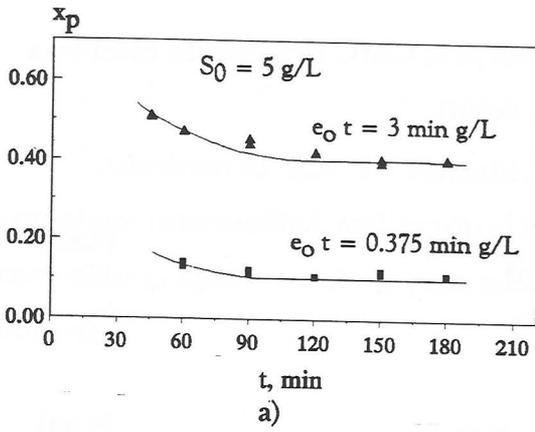


Figura 5.20

5.2.3 MODELO CINÉTICO.

Para la hidrólisis de CMC con Celluclast se puede considerar inicialmente un mecanismo sin inhibición y con una actuación diferenciada de las tres enzimas fundamentales del complejo enzimático.

1°) Las endoglucanasas, E_1 , hidrolizan al azar a la CMC originando celobiosa y glucosa y cadenas más cortas de CMC, S' ó S'' , según



2°) Las exoglucanasas, E_2 , actúan sobre la CMC liberando celobiosa y cadenas más cortas de CMC, S' , según



3°) Las β -1,4-glucosidasas, E_3 , hidrolizan la celobiosa a glucosa, según



Admitiendo que es aplicable la hipótesis de estado estacionario para los complejos intermedios, realizando el balance para cada enzima y utilizando un tiempo corregido t_c , igual a t más t_p , para tener en cuenta el tiempo de parada de reacción, se obtiene

$$\frac{dC}{dt_c} = \frac{K_1 E_1 S}{1 + K_2 S} + \frac{K_3 E_2 S}{1 + K_4 S} - \frac{K_5 E_3 C}{1 + K_6 C} \quad [5.89]$$

$$\frac{dG}{dt_c} = \frac{K'_1 E_1 S}{1 + K_2 S} + 2 \frac{K_5 E_3 C}{1 + K_6 C} \quad [5.90]$$

donde

$$K_1 = \frac{k_1 k_2}{k'_1 + k_2 + k_3} \quad [5.91]$$

$$K'_1 = \frac{k_1 k_3}{k'_1 + k_2 + k_3} \quad [5.92]$$

$$K_2 = \frac{k_1}{k'_1 + k_2 + k_3} \quad [5.93]$$

$$K_3 = \frac{k_4 k_5}{k'_4 + k_5} \quad [5.94]$$

$$K_4 = \frac{k_4}{k'_4 + k_5} \quad [5.95]$$

$$K_5 = \frac{k_6 k_7}{k'_6 + k_7} \quad [5.96]$$

$$K_6 = \frac{k_6}{k'_6 + k_7} \quad [5.97]$$

Las ecuaciones [5.89] y [5.90] se pueden combinar en base a la definición del producto total de la hidrólisis, P, ecuación [5.77], resultando

$$\frac{dP}{dt_c} = 2 \frac{dC}{dt_c} + \frac{dG}{dt_c} = \frac{(2K_1 + K'_1)E_1 S}{1 + K_2 S} + \frac{2K_3 E_2 S}{1 + K_4 S} \quad [5.98]$$

con lo que el modelo cinético se reduce a las ecuaciones [5.90] y [5.98]. Las concentraciones de cada una de las enzimas se pueden relacionar con la de enzima total utilizada, e_0 , definiendo por α_1 , α_2 y α_3 las fracciones correspondientes a las endoglucanasas, las exoglucanasas y las β -1,4-glucosidasas, por lo que

$$E_1 = \alpha_1 e_0 \quad [5.99]$$

$$E_2 = \alpha_2 e_0 \quad [5.100]$$

$$E_3 = \alpha_3 e_0 \quad [5.101]$$

Teniendo en cuenta que el sustrato susceptible de hidrólisis en cada momento viene dado por la diferencia entre la glucosa equivalente obtenida en la hidrólisis total y la conseguida hasta ese momento

$$S = P_f - P \quad [5.102]$$

se puede transformar las ecuaciones [5.90] y [5.98] en base a las productividades en glucosa y global, ecuaciones [5.80] y [5.81], a las fracciones de cada enzima, ecuaciones [5.99] a [5.101], y a la definición de intensidad de tratamiento, $y = e_0 t_c$, establecida en el apartado anterior, resultando

$$\frac{dx_c}{dy} = \frac{K'_1 \alpha_1 (1 - x_p)}{1 + K_2 P_f (1 - x_p)} + \frac{K_5 \alpha_3 (x_p - x_c)}{1 + K_6 \frac{P_f}{2} (x_p - x_c)} \quad [5.103]$$

$$\frac{dx_p}{dy} = \frac{(2K_1 \alpha_1 + K'_1 \alpha_1) (1 - x_p)}{1 + K_2 P_f (1 - x_p)} + \frac{2K_3 \alpha_2 (1 - x_p)}{1 + K_4 P_f (1 - x_p)} \quad [5.104]$$

donde se ha tenido en cuenta que al no existir desactivación enzimática dy resulta igual a $e_0 dt_c$.

Las dos ecuaciones anteriores constituyen el modelo cinético sin inhibición que habrá de modificarse en el caso de que las endo o las exoglucanasas presenten algún tipo de inhibición, ya que con respecto a las β -1,4-glucosidasas, se ha determinado en el estudio de la hidrólisis de celobiosa, apartado 5.1, que los resultados se ajustan aceptablemente mediante la ecuación de Michaelis-Menten, además los parámetros allí

obtenidos, k_s y K_s , se identifican con los incluidos en la ecuación [5.103], $K_{5\alpha_3}$ y K_6 , respectivamente.

La resolución de las ecuaciones [5.103] y [5.104] ha de realizarse simultáneamente y, en general, por métodos numéricos por lo que en los siguientes apartados se considera el estudio individualizado de las productividades en glucosa y global.

5.2.4 PRODUCTIVIDAD EN GLUCOSA.

Para abordar el estudio de la productividad en glucosa se han representado los valores de la concentración de glucosa, tablas F, G y H del apartado 4.2, frente a la intensidad de tratamiento "y". A título de ejemplo en la figura 5.21 se muestra dicha representación para cuatro de las concentraciones iniciales de CMC ensayadas a 50°C y pH igual a 4.9. Se observa, al igual que ocurre con las restantes concentraciones iniciales de CMC, pH y temperaturas, que los valores experimentales se pueden ajustar aceptablemente mediante líneas rectas que pasan por el origen, líneas continuas de la figura, es decir, según una relación de proporcionalidad directa entre la concentración de glucosa y la intensidad de tratamiento, dentro de los intervalos experimentales ensayados.

Con objeto de establecer la importancia relativa de la producción de glucosa mediante las endoglucanasas, de forma directa a partir de CMC, ecuación [5.84], y mediante la β -1,4-glucosidasas, a partir de la celobiosa formada, ecuación [5.88]; en la figura 5.21 se ha incluido, línea punteada, la producción de glucosa que correspondería a la actuación de las β -1,4-glucosidasas sobre celobiosa ecuación [5.68] considerando los parámetros establecidos en las [5.43] y [5.54] y la definición de conversión utilizada en la hidrólisis de celobiosa, ecuación [5.6].

$$y = \frac{K_s}{2k_s} G + \frac{1}{k_s} \ln \frac{1}{1 - \frac{G}{2C}} \quad [5.105]$$

para cuya aplicación se han utilizado los valores K_s y k_s obtenidos en la hidrólisis de celobiosa, tabla 5.3, y los valores de C e y correspondientes a la hidrólisis de CMC.

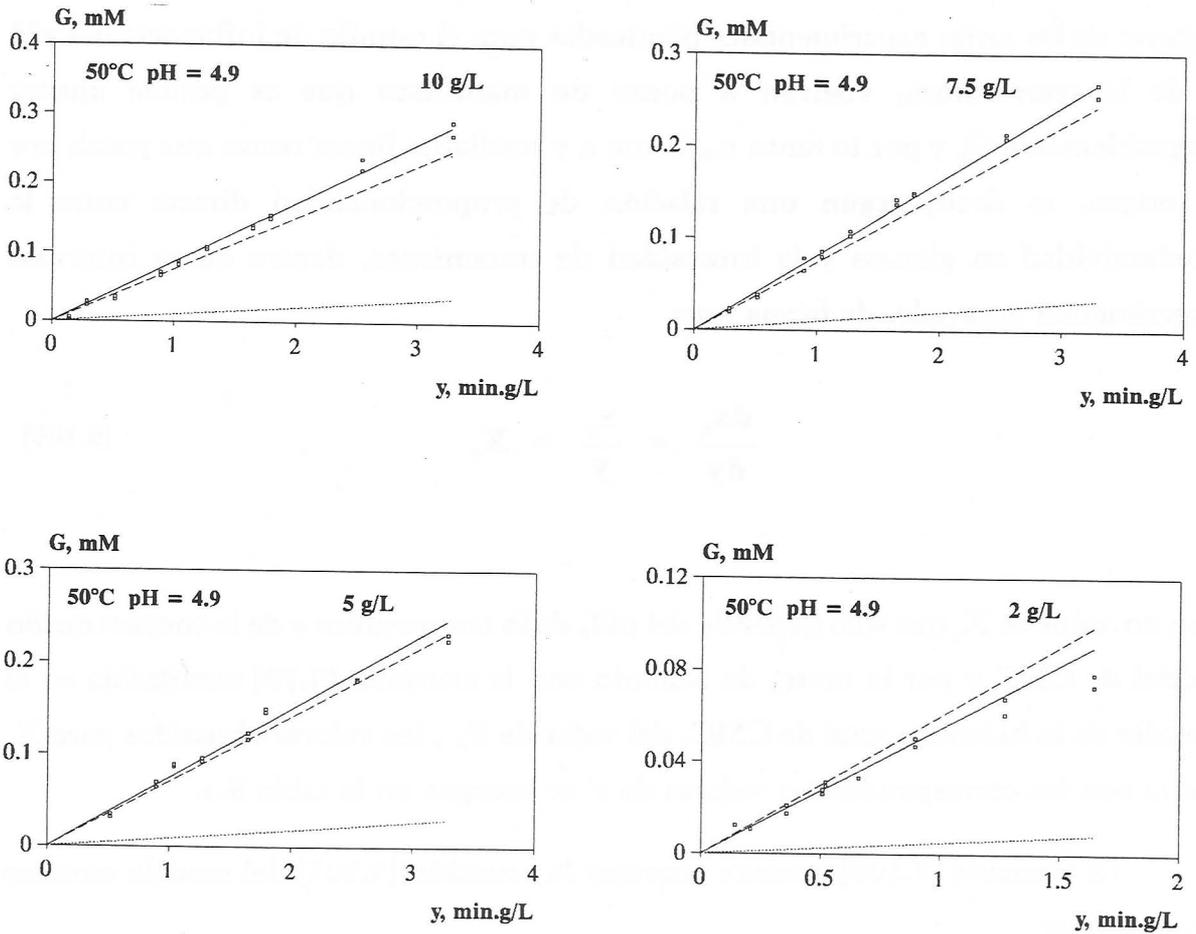


Figura 5.21

Se observa en la figura 5.21 que la producción de glucosa a partir de la celobiosa existente es mucho menor que la obtenida experimentalmente en la hidrólisis de CMC, por lo que la producción directa de glucosa a partir de CMC por la acción de las endoglucanasas es muy significativa y de acuerdo en el modelo

cinético planteado, ecuación [5.103], para establecer la productividad en glucosa es necesario, de no existir inhibición apreciable de las endoglucanasas, evaluar los parámetros K_1 , α_1 y K_2 ya que los parámetros K_3 , α_3 y K_6 se identifican con los k_s y K_s establecidos en la hidrólisis de celobiosa con Celluclast.

Con tal objetivo a partir de los valores de la concentración de glucosa, tablas F, G y H del apartado 4.2, se han calculado, mediante las ecuaciones [5.79] y [5.80], los de x_c . Las representaciones de x_c frente a la intensidad de tratamiento, de las que a título de ejemplo en las figuras 5.22 y 5.23 se incluyen las correspondientes a algunas de las series experimentales planteadas para el estudio de influencia del pH y de la temperatura, vuelven a poner de manifiesto que es posible ajustar aceptablemente G, y por lo tanto x_c , frente a y mediante líneas rectas que pasan por el origen, es decir, según una relación de proporcionalidad directa entre la productividad en glucosa y la intensidad de tratamiento, dentro de su intervalo experimental ensayado, de forma que:

$$\frac{dx_c}{dy} = \frac{x_c}{y} = X_c \quad [5.106]$$

con un valor de X_c que sólo depende del pH, de la temperatura y de la concentración inicial de CMC y por lo tanto, de acuerdo con la ecuación [5.79] establecida en el estudio de la hidrólisis total de CMC, del valor de P_0 , los valores obtenidos para X_c junto con los correspondientes valores de r^2 se recogen en la tabla 5.4.

La ecuación [5.106] permite expresar la ecuación [5.103] del modelo cinético en la forma:

$$Y = X_c - \frac{k_s (x_p - x_c)}{1 + K_s \frac{P_f}{2} (x_p - x_c)} = \frac{K_1 \alpha_1 (1 - x_p)}{1 + K_2 P_f (1 - x_p)} \quad [5.107]$$

válida de no existir ningún tipo de inhibición sobre las endoglucanasas y donde ya se han sustituido los parámetros $K_5\alpha_3$ y K_6 por k_s y K_s obtenidos en la hidrólisis de celobiosa con Celluclast.

Tabla 5.4

40°C pH = 4.9

| S_{O_2} g/L | P_{O_2} mM | X_{O_2} min ⁻¹ (g/L) ⁻¹ | r^2 |
|---------------|--------------|---|-------|
| 10 | 15.926 | 0.0031 | 0.965 |
| 7.5 | 11.9445 | 0.0041 | 0.962 |
| 5 | 7.963 | 0.0061 | 0.935 |
| 2 | 3.1852 | 0.0139 | 0.876 |
| 1 | 1.5926 | 0.0222 | 0.863 |

50°C pH = 4.9

| S_{O_2} g/L | P_{O_2} mM | X_{O_2} min ⁻¹ (g/L) ⁻¹ | r^2 |
|---------------|--------------|---|-------|
| 12.5 | 19.9075 | 0.0039 | 0.998 |
| 10 | 15.926 | 0.0054 | 0.989 |
| 7.5 | 11.9445 | 0.0068 | 0.993 |
| 5 | 7.963 | 0.0091 | 0.976 |
| 2 | 3.1852 | 0.0156 | 0.969 |
| 1 | 1.5926 | 0.0252 | 0.650 |

60°C pH = 4.9

| S_{O_2} g/L | P_{O_2} mM | X_{O_2} min ⁻¹ (g/L) ⁻¹ | r^2 |
|---------------|--------------|---|-------|
| 10 | 15.926 | 0.0061 | 0.963 |
| 7.5 | 11.9445 | 0.0079 | 0.933 |
| 5 | 7.963 | 0.0107 | 0.303 |
| 2 | 3.1852 | 0.0183 | 0.682 |
| 1 | 1.5926 | 0.0246 | 0.710 |

50°C pH = 3.9

| S_{O_2} g/L | P_{O_2} mM | X_{O_2} min ⁻¹ (g/L) ⁻¹ | r^2 |
|---------------|--------------|---|-------|
| 10 | 15.926 | 0.0035 | 0.988 |
| 7.5 | 11.9445 | 0.0041 | 0.996 |
| 5 | 7.963 | 0.0061 | 0.993 |
| 1 | 1.5926 | 0.0216 | 0.966 |

50°C pH = 5.9

| S_{O_2} g/L | P_{O_2} mM | X_{O_2} min ⁻¹ (g/L) ⁻¹ | r^2 |
|---------------|--------------|---|-------|
| 10 | 15.926 | 0.0036 | 0.737 |
| 7.5 | 11.9445 | 0.0039 | 0.920 |
| 5 | 7.963 | 0.005 | 0.811 |
| 1 | 1.5926 | 0.0117 | 0.341 |

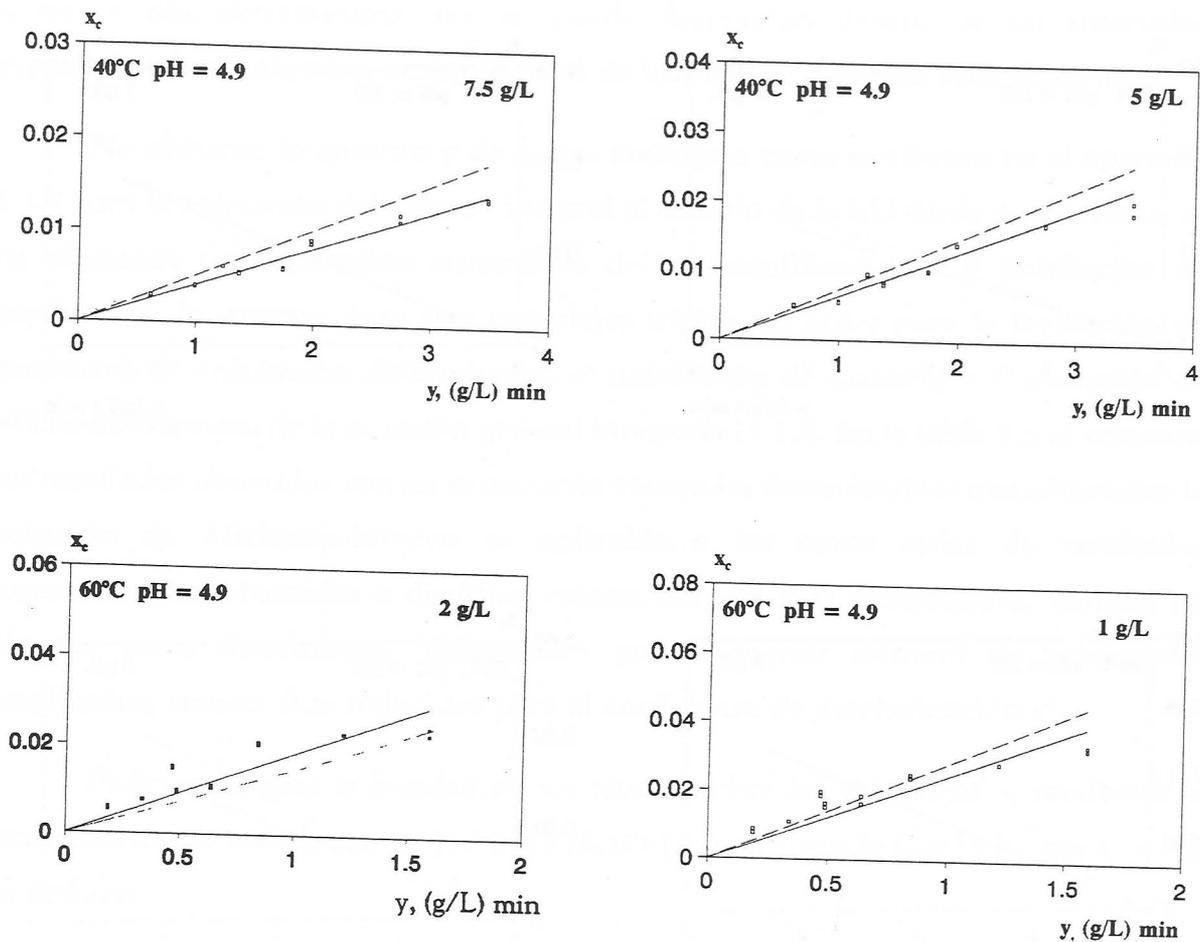


Figura 5.22

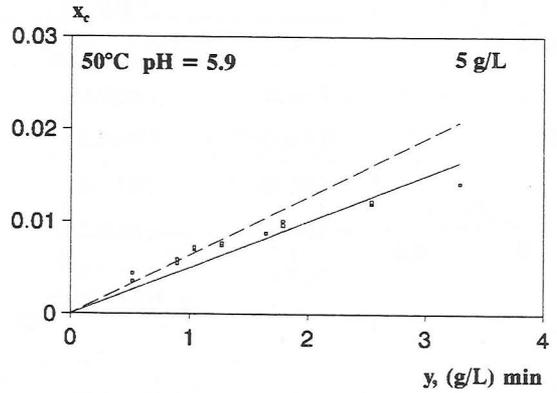
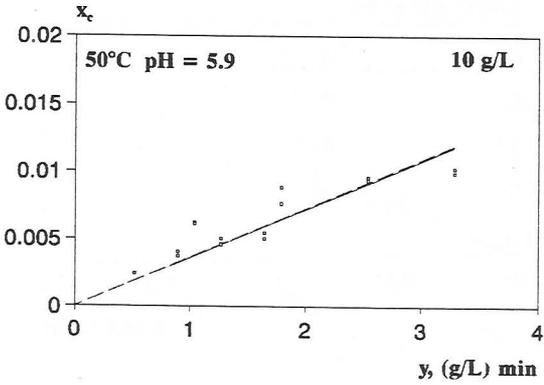
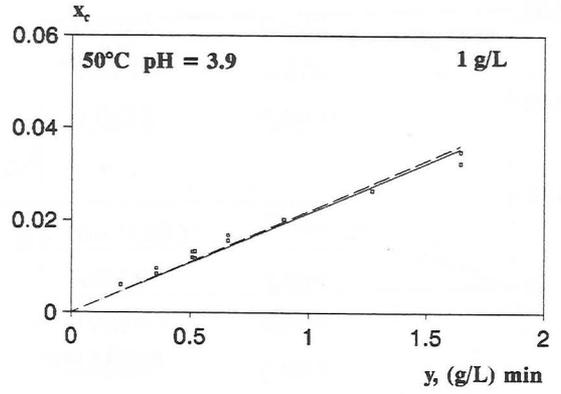
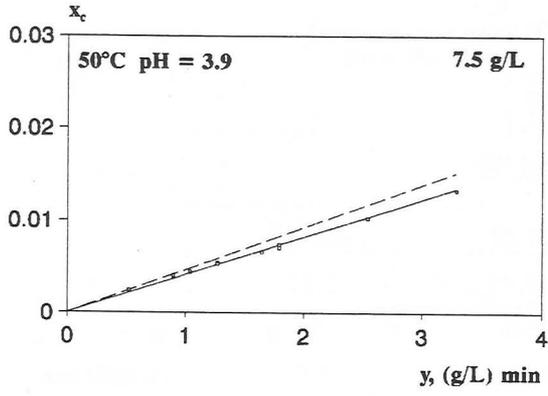


Figura 5.23

En la figura 5.24 se representan, para cada pareja de pH y temperatura ensayada, los valores del cociente $(1-x_p)/Y$ frente a los correspondientes al producto $P_f(1-x_p)$, es decir, la representación de una forma linealizada de la ecuación [5.107]. Se observa que en todos los casos los valores se pueden ajustar aceptablemente a líneas rectas lo que determinaría que se puede despreciar, dentro de los intervalos experimentales ensayados, cualquier tipo de inhibición sobre las endoglucanasas.

No obstante lo anterior y de forma análoga a como se efectuó en el apartado 5.1.2 para la aplicación del método integral al estudio de la hidrólisis de celobiosa, se ha efectuado una aplicación sistemática de las simplificaciones 2ª (inhibición de producto y de sustrato pero con complejos triples no útiles para la formación de producto), 3ª (inhibición de producto), 4ª (inhibición de sustrato) y 5ª (ecuación de Michaelis-Menten) de la ecuación general integrada [5.17]. En la tabla 5.5 se resumen los resultados obtenidos con las ecuaciones ensayadas deduciéndose que sólo la ecuación de Michaelis-Menten es aplicable a las cinco series de resultados experimentales obtenidos a distintos valores del pH y la temperatura, aunque en algunos casos determinan, lógicamente por el menor número de parámetros implicados, valores más reducidos para el coeficiente de determinación r^2 .

Para comprobar la bondad de los ajustes sobre los valores de x_c mediante la combinación de las ecuaciones [5.103] y [5.106] y sustituyendo $K_5\alpha_3$ y K_6 por k_s y K_s , se deduce:

$$\frac{x_c}{y} = \frac{K_1 \alpha_1 (1 - x_p)}{1 + K_2 P_f (1 - x_p)} + \frac{k_s (x_p - x_c)}{1 + K_s \frac{P_f}{2} (x_p - x_c)} \quad [5.108]$$

ecuación de segundo grado con respecto a x_c y que permite su determinación para cada pareja de valores experimentales x_p e y y de cada una de las series en que se ha mantenido constante el valor de P_f , utilizando los valores para los parámetros cinéticos recogidos en la tabla 5.5. De esta forma se han calculado los valores de x_c que permiten trazar las líneas discontinuas de las figuras 5.21 a 5.23, en las que se observa

que existe una reproducción aceptable de los valores experimentales de G en la figura 5.21 o de x_c en las 5.22 y 5.23.

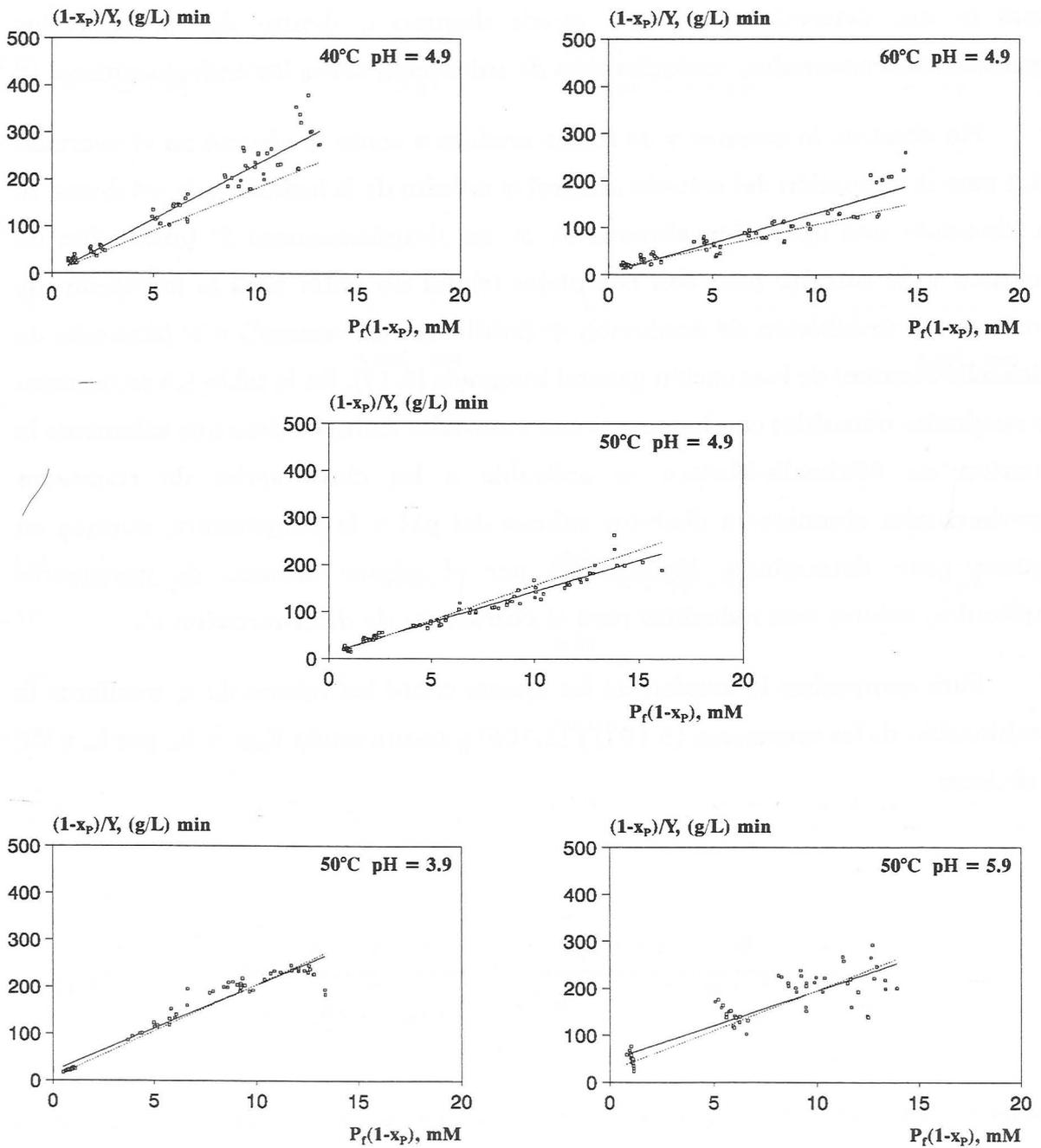


Figura 5.24

Tabla 5.5

40°C pH = 4.9

| Ecuación | K' ₁ | K ₂ | K _P | K _{SP} | K _{S2} | r ² |
|----------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Michaelis-Menten | 0.1223 | 2.209 | - | - | - | 0.986 |
| Prod. competitiva | 0.4317 | 6.569 | 12.66 | - | - | 0.998 |
| Prod. acompetitiva | 0.0786 | 0.8678 | - | 0.6778 | - | 0.898 |
| Prod. mixta | 0.1798 | 2.369 | 4.009 | 0.5723 | - | 0.917 |
| Prod. comp. y sustr. | 0.155 | 1.776 | 10.42 | - | 0.1071 | 0.898 |

50°C pH = 4.9

| Ecuación | K' ₁ | K ₂ | K _{SP} | r ² |
|--------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| Michaelis-Menten | 0.1734 | 2.62 | - | 0.987 |
| Prod. acompetitiva | 0.1644 | 2.387 | 0.1064 | 0.898 |

60°C pH = 4.9

| Ecuación | K' ₁ | K ₂ | K _P | K _{SP} | K _{S2} | r ² |
|-----------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Michaelis-Menten | 0.09 | 0.856 | - | - | - | 0.921 |
| Prod. competitiva | 0.1563 | 1.075 | 2.902 | - | - | 0.971 |
| Prod. acompetitiva | 0.0752 | 0.4667 | - | 0.1944 | - | 0.877 |
| Prod. comp. y sustr. | 0.1205 | 0.5785 | 2.224 | - | 0.0343 | 0.893 |
| Prod. acomp. y sustr. | 0.0731 | 0.4289 | - | 0.1686 | 0.0074 | 0.889 |
| Sustrato | 0.0782 | 0.5866 | - | - | 0.0237 | 0.887 |

50°C pH = 3.9

| Ecuación | K' ₁ | K ₂ | K _P | K _{SP} | K _{S2} | r ² |
|--------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Michaelis-Menten | 0.158 | 3.135 | - | - | - | 0.988 |
| Prod. competitiva | 0.4243 | 8.323 | 4.729 | - | - | 0.997 |
| Prod. acompetitiva | 0.1182 | 1.891 | - | 0.4023 | - | 0.875 |
| Sustrato | 0.1185 | 1.993 | - | - | 0.0564 | 0.875 |

50°C pH = 5.9

| Ecuación | K' ₁ | K ₂ | K _{S2} | r ² |
|------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| Michaelis-Menten | 0.0397 | 0.6759 | - | 0.90 |
| Sustrato | 0.0386 | 0.6268 | 0.0034 | 0.963 |

Por otra parte, la ecuación [5.103] se puede expresar en la forma habitual de Michaelis-Menten.

$$\frac{dx_c}{dy} = \frac{k_{a,en} (1 - x_p)}{K_{M,en} + P_f (1 - x_p)} + \frac{k_a (x_p - x_c)}{K_M + \frac{P_f}{2} (x_p - x_c)} \quad [5.109]$$

existiendo entre los parámetros de esta ecuación y la [5.108] las relaciones expresadas por las ecuaciones [5.69] y [5.70] con respecto a la hidrólisis de celobiosa a glucosa y las siguientes:

$$K_{M,en} = \frac{1}{K_2} \quad [5.110]$$

$$k_{a,en} = \frac{K'_1 \alpha_1}{K_2} \quad [5.111]$$

con respecto a la producción de glucosa por la acción de las endoglucanasas sobre CMC.

Los valores obtenidos para $k_{a,en}$ y $K_{M,en}$ a pH igual a 5.9 se representan en coordenadas semilogarítmicas frente al inverso de la temperatura absoluta, figura 5.25, observándose ajustes aceptables a ecuaciones tipo Arrhenius, lo que permite deducir las expresiones:

$$k_{a,en} = 2.17 \cdot 10^3 \exp \left(-\frac{27700}{RT} \right), \text{ mM min}^{-1}(\text{g/L})^{-1} \quad [5.112]$$

$$K_{M,en} = 2.09 \cdot 10^6 \exp \left(-\frac{40500}{RT} \right), \text{ mM} \quad [5.113]$$

que ponen de manifiesto un valor de 27.7 kJ/mol para la energía de activación de la constante k_a y de 40.5 kJ/mol para la variación con la temperatura de la constante de Michaelis correspondiente a las endoglucanasas.

Con respecto al pH en la figura 5.25 se observa que a la temperatura de 50°C la constante de velocidad $k_{a, en}$ presenta valores prácticamente coincidentes a los pH de 4.9 y 5.9, valor medio 0.0624, mientras que disminuye aproximadamente un 19% a pH igual a 3.9, en cambio la constante de Michaelis $K_{M, en}$ es prácticamente coincidente a los pH de 3.9 y 4.9, valor medio 0.35 para aumentar aproximadamente cuatro veces al aumentar el pH a 5.9. Con todo ello se deduce que el pH cinéticamente más favorable de los ensayos con respecto a la producción de glucosa a partir de CMC mediante las endoglucanasas es el de 4.9, valor que es coincidente con el obtenido en el apartado 5.1 para la producción de glucosa a partir de celobiosa mediante las β -1.4-glucosidasas, ya que en ambos casos a pH igual a 4.9 resultan los mayores valores de la constante cinética y los menores de la constante de Michaelis.

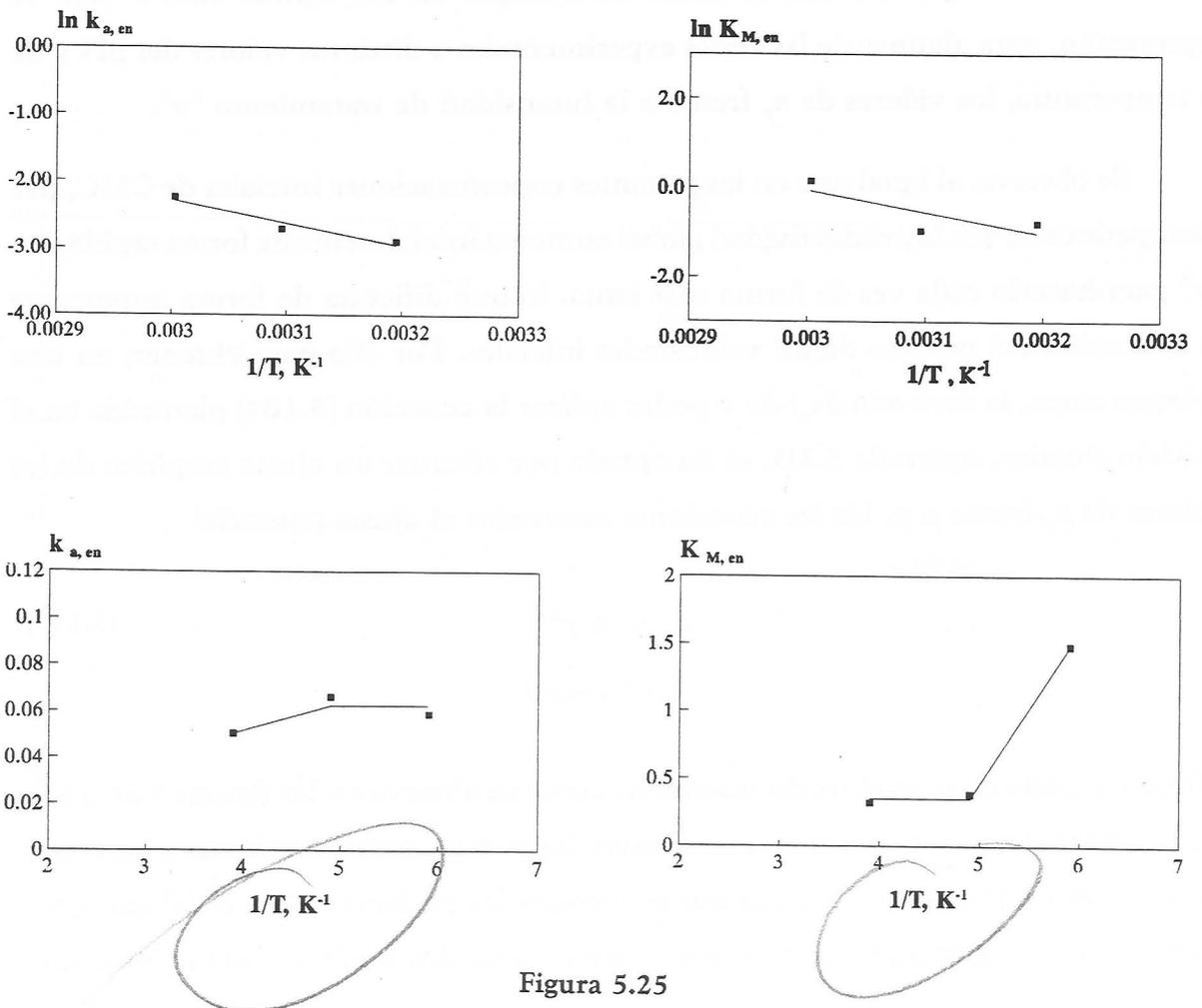


Figura 5.25

5.2.5 PRODUCTIVIDAD GLOBAL.

Para abordar el estudio de la productividad global referida al producto total de la hidrólisis de CMC, celobiosa más glucosa, expresado como glucosa equivalente, definida mediante la ecuación [5.81] del apartado 5.2.1,

$$x_p = \frac{2C + G}{P_f} \quad [5.114]$$

se han calculado sus valores a partir de las concentraciones de glucosa y celobiosa de las tablas F, G y H del apartado 4.2 y del valor de P_f , ecuación [5.79], correspondiente a cada serie de experimentos. A título de ejemplo en las figuras 5.26 a 5.28 se representan, para algunas de las series experimentales a distintos valores del pH y de la temperatura, los valores de x_p frente a la intensidad de tratamiento "y".

Se observa, al igual que en las restantes concentraciones iniciales de CMC, pH y temperaturas, que la productividad global aumenta inicialmente de forma rápida con "y" para hacerlo cada vez de forma más lenta, lo que dificulta de forma importante la aplicación del método de las velocidades iniciales. Por ello para obtener, en una primera etapa, la derivada dx_p/dy y poder aplicar la ecuación [5.104] planteada en el modelo cinético, apartado 5.2.3, se ha optado por efectuar un ajuste empírico de los valores de x_p frente a y. De las ecuaciones ensayadas el ajuste potencial

$$x_p = a y^b \quad [5.115]$$

ofrece un grado de reproducción aceptable, como se observa en las figuras 5.26 a 5.28 en las que las líneas discontinuas representan las curvas correspondientes a los ajustes potenciales y en la tabla 5.6, en la que se recogen los parámetros a y b del ajuste y el coeficiente de regresión para los experimentos realizados a 50°C y pH igual a 4.9.

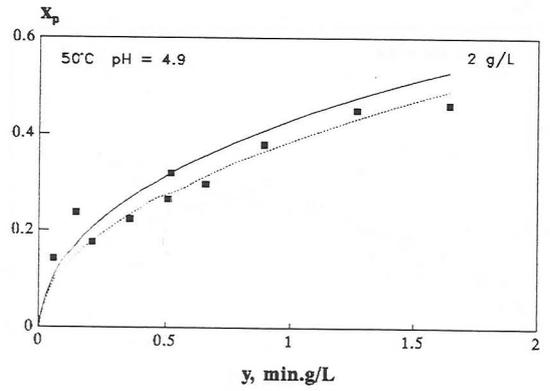
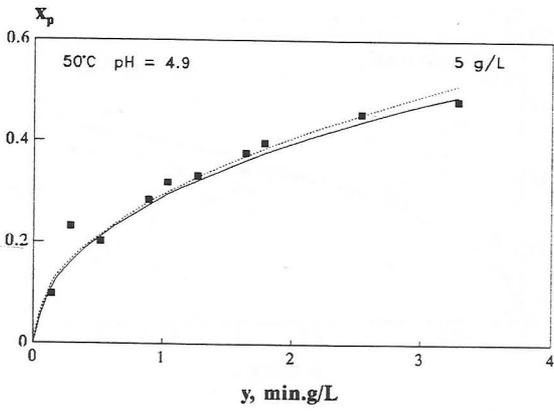
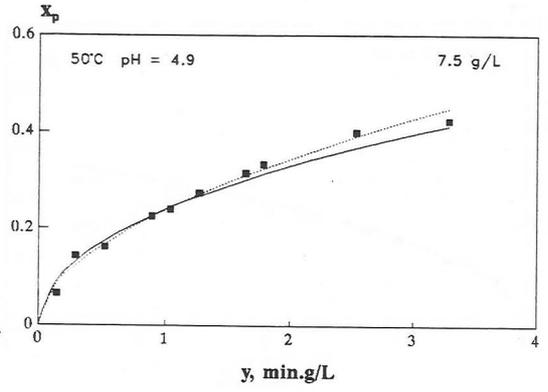
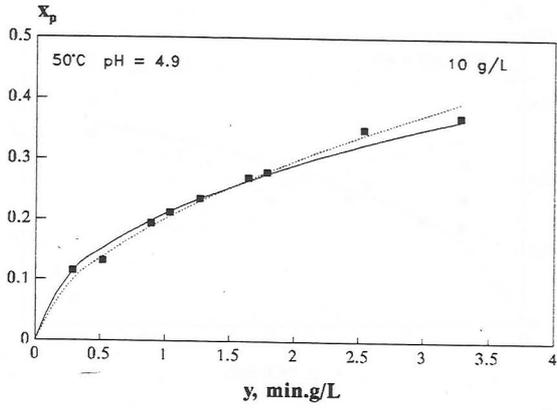


Figura 5.26

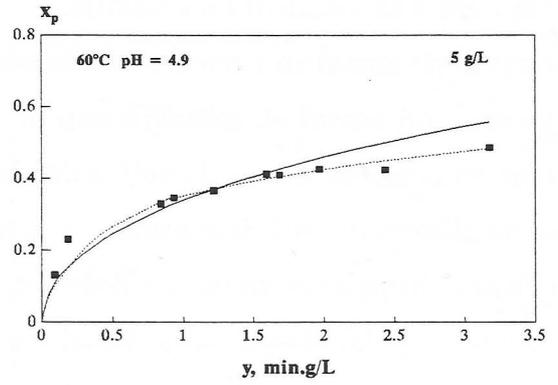
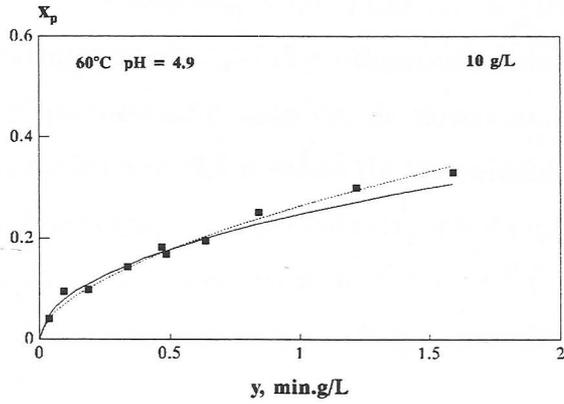
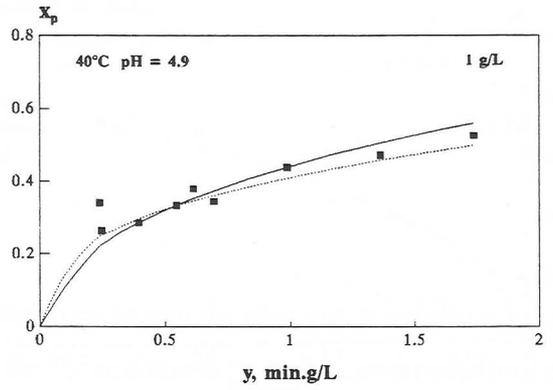
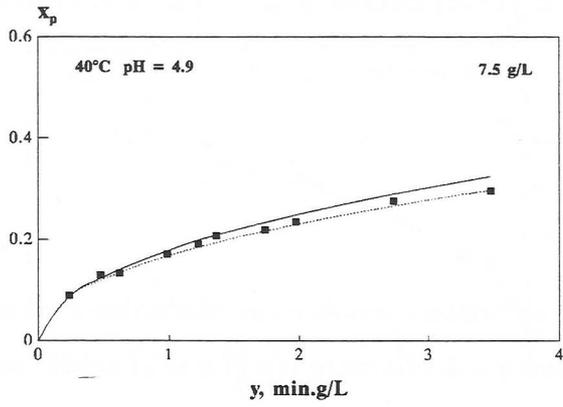


Figura 5.27

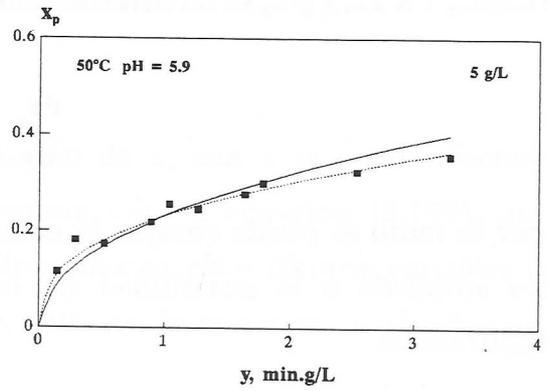
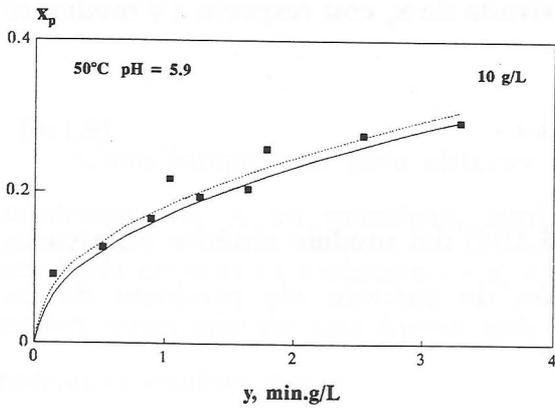
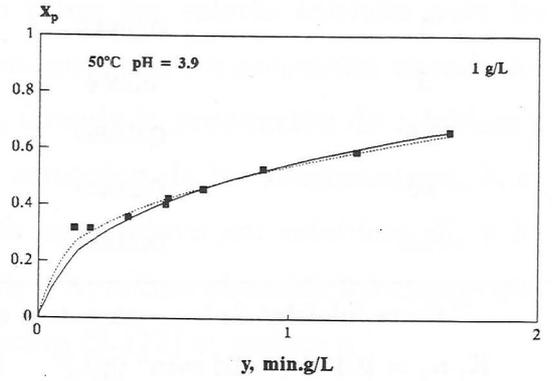
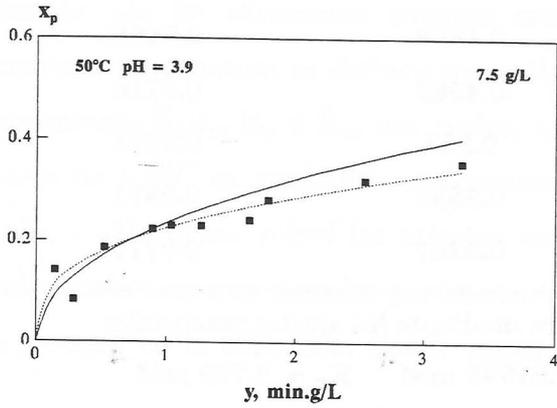


Figura 5.28

Tabla 5.6
Ajustes potenciales para 50°C pH = 4.9

| S ₀ , g/L | a | b | r ² |
|----------------------|--------|--------|----------------|
| 1 | 0.4806 | 0.2541 | 0.9559 |
| 2 | 0.3848 | 0.4888 | 0.9566 |
| 5 | 0.294 | 0.4662 | 0.9716 |
| 7.5 | 0.2386 | 0.533 | 0.9872 |
| 10 | 0.2009 | 0.5636 | 0.9871 |
| 12.5 | 0.1685 | 0.5267 | 0.9717 |

Valores iniciales de los parámetros obtenidos mediante los ajustes potenciales
 $K_3 \alpha_2 = 0.4181, \text{ min}^{-1} (\text{g/L})^{-1} \quad K_4 = 0.01995 \text{ mM}^{-1} \quad K_7 = 3.729 \text{ mM}^{-1}$

Para este conjunto de experimentos, seleccionados por ser las condiciones de pH y temperatura a las que se efectuó una mayor variación de la concentración inicial de CMC, 1 a 12.5 g/L, se ha determinado la derivada de x_p con respecto a y mediante

$$\frac{dx_p}{dy} = ab y^{b-1} \quad [5.116]$$

y por lo tanto se puede ensayar la ecuación [5.104] del modelo cinético planteado, pero ampliada a la posibilidad de inhibición de sustrato y/o producto de las exoglucanasas

$$\frac{dx_p}{dy} = \frac{(2K_1 \alpha_1 + K'_1 \alpha_1)(1 - x_p)}{1 + K_2 P_f(1 - x_p)} \quad [5.117]$$

$$+ \frac{2K_3 \alpha_2(1 - x_p)}{1 + K_4 P_f(1 - x_p) + K_7 \frac{P_f}{2}(x_p - x_c) + K_8 \frac{P_f^2}{2}(x_p - x_c)(1 - x_p) + K_9 P_f^2(1 - x_p)^2}$$

Puesto que para cada valor de la concentración inicial de CMC y por tanto de P_f , ecuación [5.79], se dispone de los valores de y , x_p y x_c y por tanto de dx_p/dy , ecuación [5.116], es posible obtener por regresión no lineal los parámetros cinéticos de la ecuación [5.117], aunque los valores de dos de ellos, $K'_1\alpha_1$ y K_2 , se pueden imponer por haberse establecido en el apartado anterior sobre la productividad en glucosa. De los diferentes ensayos realizados sobre los valores iniciales para los restantes parámetros se deduce que sólo se consiguen ajustes aceptables cuando los parámetros $K_1\alpha_1$, K_8 y K_9 , son nulos, es decir, cuando la producción de celobiosa a partir de CMC es atribuible únicamente a la actuación de las exoglucanasas, $K_1\alpha_1$ nulo, y sólo existe sobre las mismas inhibición competitiva por celobiosa, K_8 y K_9 nulos, mientras que para los parámetros $K_3\alpha_2$, K_4 y K_7 se han obtenido los valores que se recogen en la tabla 5.6. Por lo tanto la ecuación [5.117] se reduce a

$$\frac{dx_p}{dy} = \frac{K'_1\alpha_1(1-x_p)}{1+K_2P_f(1-x_p)} + \frac{2K_3\alpha_2(1-x_p)}{1+K_4P_f(1-x_p)+K_7\frac{P_f}{2}(x_p-x_c)} \quad [5.118]$$

Cuya integración para obtener la variación de x_p con y se puede efectuar numéricamente y, en principio, simultáneamente con la ecuación [5.103], que permitiría obtener la variación de x_c con y . Sin embargo, estas últimas variables se pueden relacionar de una forma más simple, pues en base a que en el apartado anterior se estableció que

$$x_c = X_C \quad y \quad [5.119]$$

con valores de X_C que sólo dependen del pH, de la temperatura y de la concentración inicial de CMC, la ecuación [5.118] quedaría en la forma

$$\frac{dx_p}{dy} = \frac{K_1 \alpha_1 (1 - x_p)}{1 + K_2 P_f (1 - x_p)} + \frac{2K_3 \alpha_2 (1 - x_p)}{1 + K_4 P_f (1 - x_p) + K_7 \frac{P_f}{2} (x_p - X_c y)} \quad [5.120]$$

que ya se puede resolver por integración numérica. Para ello se ha utilizado el método de Runge-Kutta de cuarto orden que permite obtener, utilizando los valores de $K_3\alpha_2$, K_4 y K_7 de la tabla 5.6, las curvas de trazo discontinuo que se muestran en la figura 5.29 para las concentraciones iniciales de CMC ensayadas a 50°C y pH igual a 4.9.

Se observa que a las concentraciones iniciales de CMC más reducidas no se consigue una reproducción aceptable de los valores experimentales obtenidos a 50°C y pH igual a 4.9, por lo que se aplicó una optimización, mediante el método simplex, de los tres parámetros correspondientes a las exoglucanasas, $K_3\alpha_2$, K_4 y K_7 , obteniéndose los valores que se recogen en la tabla 5.7 y que permiten obtener por integración numérica las líneas continuas que se representan tanto en la figura 5.29 como en la 5.26, en las que se observa que ya se consiguen reproducciones aceptables de los valores experimentales.

Tabla 5.7

| T, °C | pH | $K_3\alpha_2$, min ⁻¹ (g/L) ⁻¹ | K_4 , mM ⁻¹ | K_7 , mM ⁻¹ |
|-------|-----|---|--------------------------|--------------------------|
| 40 | 4.9 | 4.083 | 0.0814 | 75.27 |
| 50 | 4.9 | 7.701 | 0.1163 | 76.47 |
| 60 | 4.9 | 7.958 | 0.0382 | 55.69 |
| 50 | 3.9 | 4.535 | 0.0113 | 46.71 |
| 50 | 5.9 | 4.448 | 0.0544 | 71.8 |

A los restantes pH y temperaturas se aplicó directamente la optimización por el método simplex de los tres parámetros implicados en la resolución numérica por el

método de Runge-Kutta de la ecuación [5.120], obteniéndose los valores para los mismos que también se recogen en la tabla 5.7 y que permiten trazar las líneas continuas que se representan en las figuras 5.27 y 5.28, en las que se observa una reproducción aceptable de los valores experimentales. No obstante y para detectar la posible existencia de tendencias en los ajustes efectuados, en la figura 5.30 se representa, incluyendo todos los experimentos realizados, el cociente entre los valores de x_p calculado y experimental frente a la intensidad de tratamiento, no observándose ninguna tendencia definida con respecto a la concentración inicial de CMC o la intensidad de tratamiento para las distintas parejas de pH y temperatura ensayadas, aunque lógicamente la mayor dispersión coincide con la menor intensidad de tratamiento, en la que los errores experimentales pueden ser mayores y mayor también la influencia de los errores inherentes a los tiempos de parada de reacción utilizados.

Por otra parte, la ecuación [5.118] se puede expresar en la forma habitual de Michaelis-Menten

$$\frac{dx_p}{dy} = \frac{k_{a,en}(1-x_p)}{K_{M,en} + P_f(1-x_p)} + \frac{2k_{a,ex}(1-x_p)}{K_{M,ex} + P_f(1-x_p) + K_{ICP,ex} \frac{P_f}{2}(x_p - x_c)} \quad [5.121]$$

existiendo entre los parámetros de esta ecuación y los de la [5.118] las siguientes relaciones

$$k_{a,ex} = \frac{K_3 \alpha_2}{K_4} \quad [5.122]$$

$$K_{M,ex} = \frac{1}{K_4} \quad [5.123]$$

$$K_{ICP,ex} = \frac{K_7}{K_4} \quad [5.124]$$

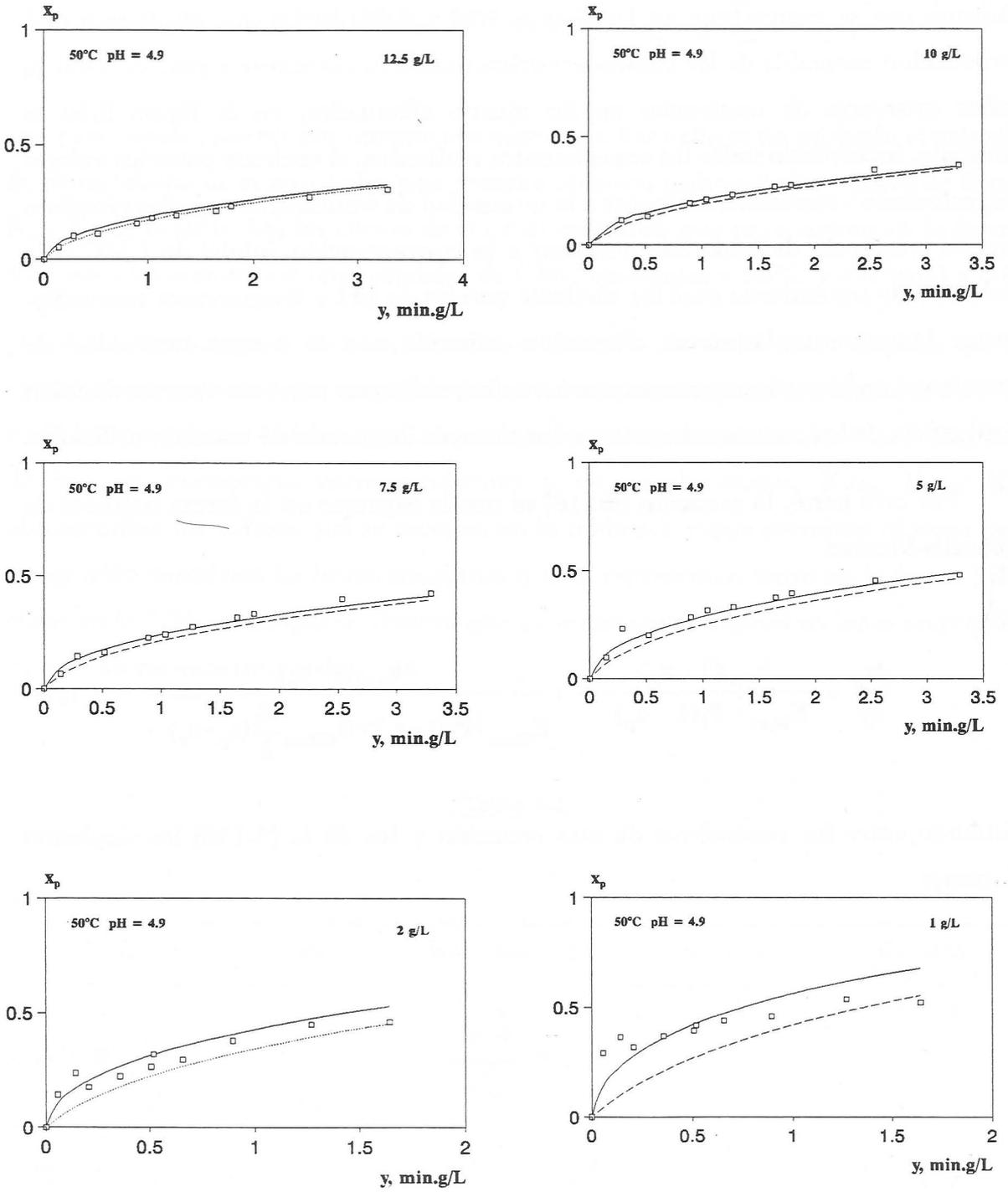


Figura 5.29

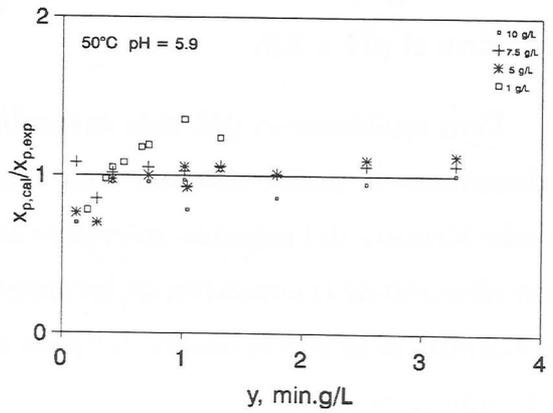
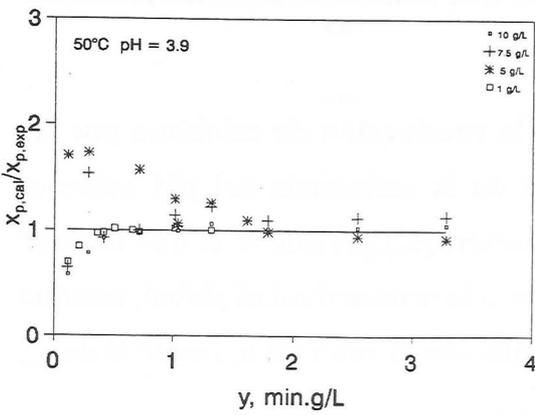
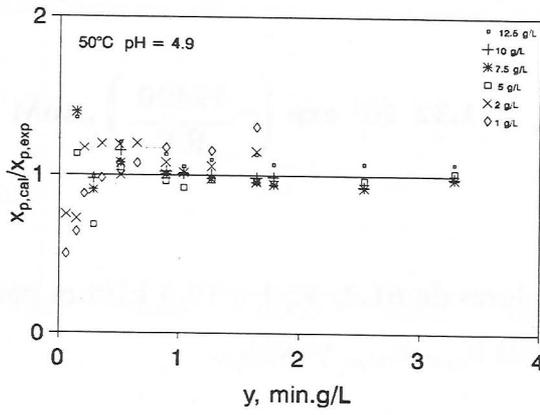
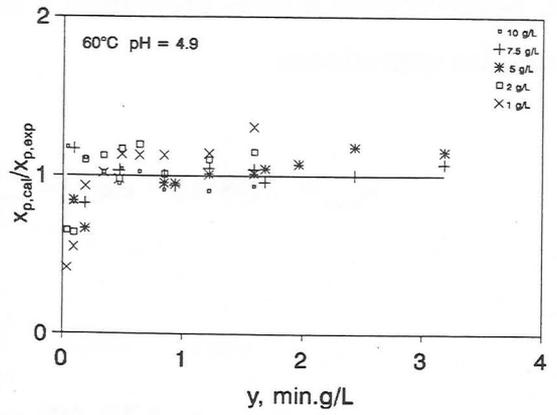
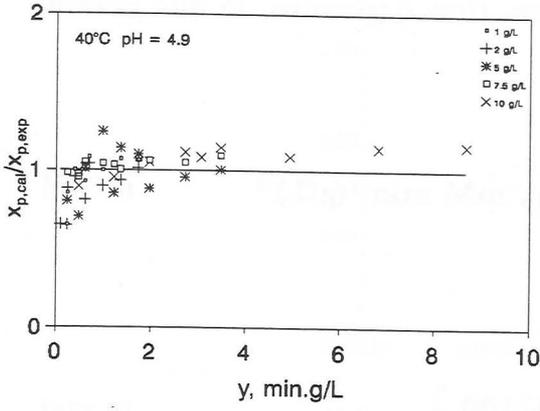


Figura 5.30

Los valores obtenidos para estos tres parámetros a pH igual a 5.9 se representan en coordenadas semilogarítmicas frente al inverso de la temperatura absoluta, figura 5.31, observandose ajustes aceptables a ecuaciones tipo Arrhenius, lo que permite deducir las expresiones

$$k_{a,ex} = 7.38 \cdot 10^{11} \exp\left(-\frac{61300}{RT}\right), \text{ mM min}^{-1}(\text{g/L})^{-1} \quad [5.125]$$

$$K_{M,ex} = 2.23 \cdot 10^6 \exp\left(-\frac{32100}{RT}\right), \text{ mM} \quad [5.126]$$

$$K_{ICP,ex} = 1.32 \cdot 10^6 \exp\left(-\frac{19400}{RT}\right) \quad [5.127]$$

que ponen de manifiesto valores de 61.3, 32.1 y 19.4 kJ/mol para la variación con la temperatura de las constantes $k_{a,ex}$, $K_{M,ex}$ y $K_{ICP,ex}$.

Con respecto al pH en la figura 5.32 se observa que a la temperatura de 50°C las tres constantes presentan valores semejantes a los pH de 4.9 y 5.9, valores medios 74 $\text{mM min}^{-1}(\text{g/L})^{-1}$, 13.5 mM y 989 , mientras que aumentan significativamente al reducirse el pH a 3.9.

Para establecer el pH más favorable para la producción de celobiosa por las exoglucanasas se puede efectuar una simulación de la influencia del pH sobre el segundo término del segundo miembro de la ecuación [5.121] que es el que incluye la contribución de la actuación de las exoglucanasas a la productividad global, aunque para simplificar se puede despreciar para esta simulación el valor de x_c frente al de x_p , con lo que se deduce

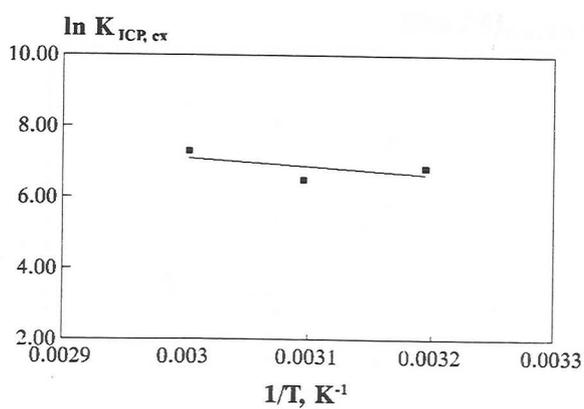
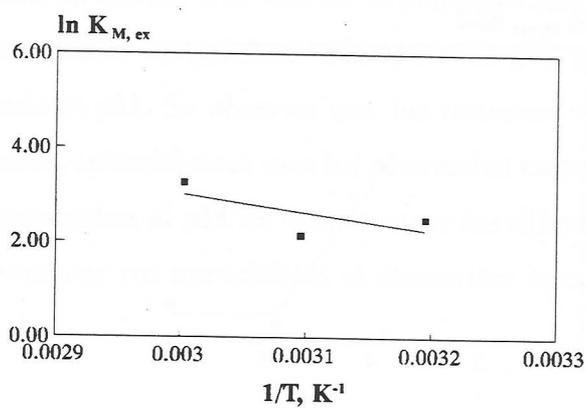
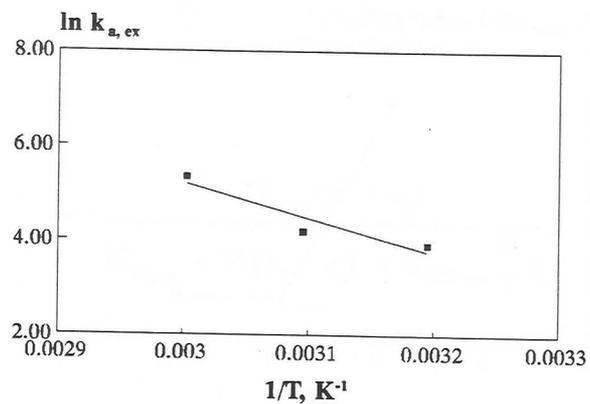


Figura 5.31

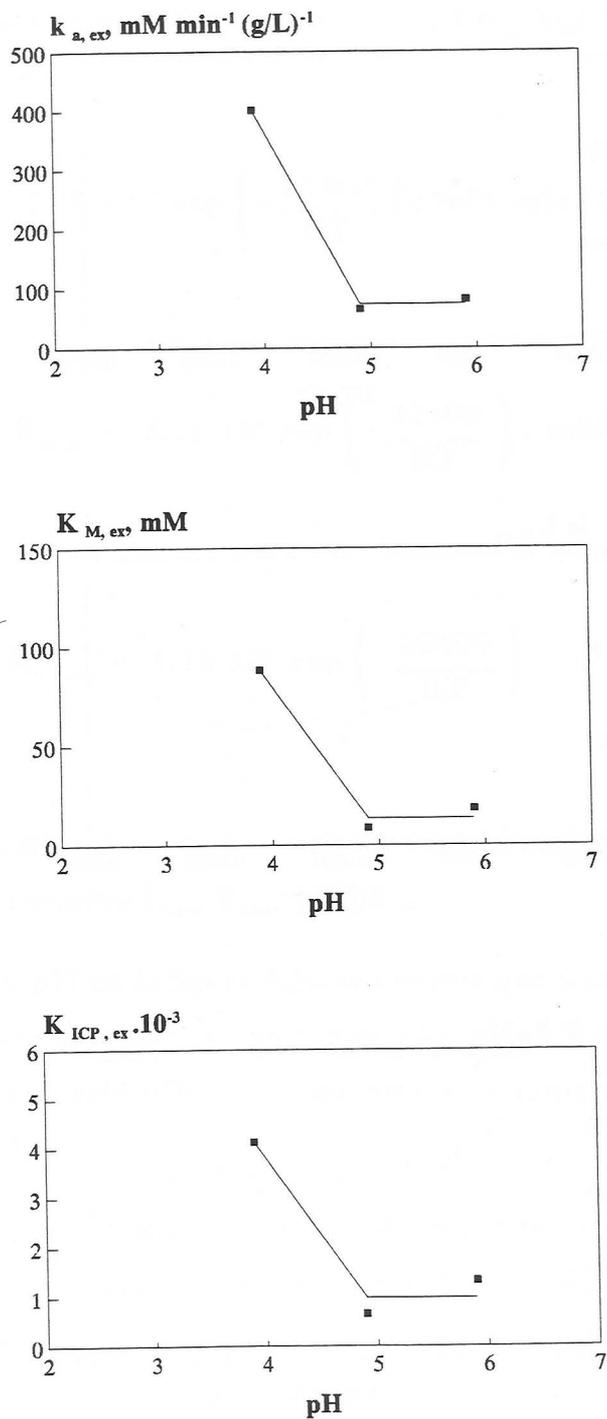


Figura 5.32

$$\begin{aligned}
 X_{p,ex} &= \frac{dx_p}{dy} - \frac{k_{a,en}(1-x_p)}{K_{M,en} + P_f(1-x_p)} \\
 &= \frac{2k_{a,ex}(1-x_p)}{K_{M,ex} + P_f(1-x_p) + K_{ICP,ex} \frac{P_f}{2} x_p} \quad [5.128]
 \end{aligned}$$

En la figura 5.33 se han representado frente a x_p los valores aproximados de $X_{p,ex}$ obtenidos mediante la última fracción de la ecuación [5.128] y utilizando tres de los valores de la concentración inicial de CMC, 1, 5 y 10 g/L, comunes a las tres series en que se ha modificado el pH. Se observa que los mayores valores para $X_{p,ex}$ en los intervalos de x_p utilizados, coincidentes con los obtenidos experimentalmente en cada una de las series, corresponden al pH de 4.9, aunque las diferencias con el de 3.9 son muy escasas y prácticamente no apreciables al aumentar la concentración de CMC.

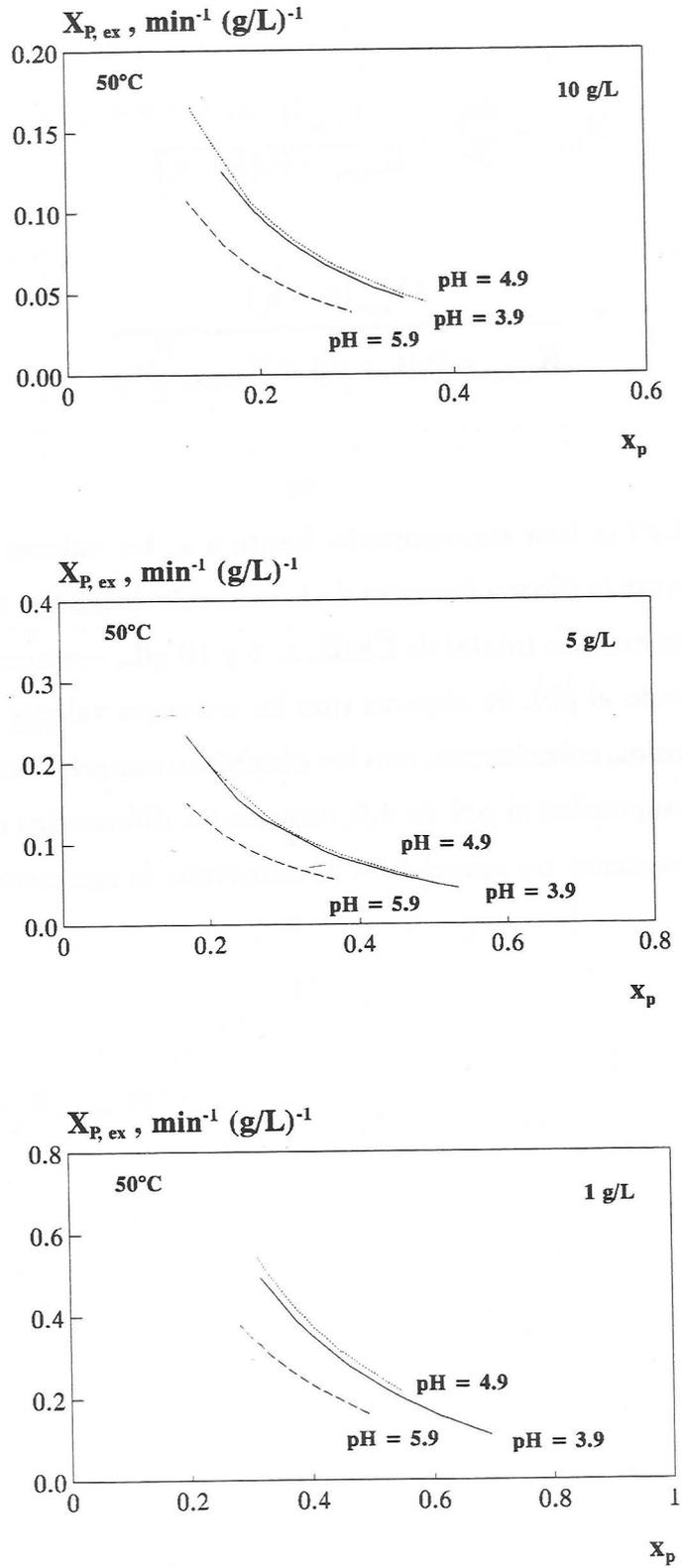


Figura 5.33

5.3 INFLUENCIA DEL pH Y DE LA TEMPERATURA EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CELOBIOSA Y DE CARBOXIMETILCELULOSA.

En las tablas 5.8 y 5.9 se recogen los valores obtenidos para los parámetros cinéticos correspondientes a las tres enzimas fundamentales del complejo enzimático de celulasas: β -1,4-glucosidasas (k_a y K_M), endoglucanasas ($k_{a,en}$ y $K_{M,en}$) y exoglucanasas ($k_{a,ex}$, $K_{M,ex}$ y $K_{ICP,ex}$). Se deduce que sólo las constantes de velocidad k_a aumentan regularmente con la temperatura, mientras que las constantes de Michaelis y la de inhibición de las exoglucanasas por celobiosa, a pesar de que se pueden ajustar a ecuaciones tipo Arrhenius, no presentan variaciones tan regulares de aumento con la temperatura, aunque también se han recogido en la tabla 5.8 las energías de activación aparentes de las diferentes constantes, E_a , deduciéndose que los valores están comprendidos aproximadamente entre 20 y 60 kJ/mol. Con respecto al pH y como se ha ido deduciendo en los apartados anteriores el pH más favorable para la actuación de las tres enzimas es el de 4.9 aunque el de 3.9 también es favorable para la actuación de las exoglucanasas.

Por otra parte, aunque se ha establecido la influencia del pH y de la temperatura sobre los parámetros cinéticos correspondientes a la hidrólisis de celobiosa y de carboximetilcelulosa es de interés el evaluar la repercusión directa sobre la producción de glucosa en la hidrólisis de celobiosa y sobre las productividades en glucosa y global en la hidrólisis de CMC, con tal objetivo y utilizando los parámetros cinéticos de las tablas 5.8 y 5.9, se ha efectuado una simulación sobre sus variaciones con la intensidad de tratamiento.

Para la hidrólisis de celobiosa, a partir de la ecuación [5.8] y teniendo en cuenta que no hay desactivación enzimática y que los resultados se ajustan a la ecuación de Michaelis-Menten, se deduce

$$X = \frac{dx}{dy} = \frac{k_a (1 - x)}{K_M + S_0 (1 - x)} \quad [5.129]$$

Tabla 5.8

pH = 4.9

| T °C | k_a mM min ⁻¹ (g/L) ⁻¹ | $k_{a,en}$ mM min ⁻¹ (g/L) ⁻¹ | $k_{a,ex}$ mM min ⁻¹ (g/L) ⁻¹ | K_M mM | $K_{M,en}$ mM | $K_{M,ex}$ mM | $K_{ICP,ex}$ |
|----------------|---|--|--|-------------|------------------|------------------|--------------|
| 40 | 0.00485 | 0.0554 | 50.1 | 0.740 | 0.453 | 12.28 | 924 |
| 50 | 0.00862 | 0.0662 | 66.2 | 1.312 | 0.382 | 8.60 | 658 |
| 60 | 0.01240 | 0.1051 | 208.3 | 1.294 | 1.168 | 26.18 | 1463 |
| E_a , kJ/mol | 40.7 | 27.7 | 61.3 | 24.1 | 40.5 | 32.1 | 19.4 |

Tabla 5.9

T = 50°C

| pH | k_a mM min ⁻¹ (g/L) ⁻¹ | $k_{a,en}$ mM min ⁻¹ (g/L) ⁻¹ | $k_{a,ex}$ mM min ⁻¹ (g/L) ⁻¹ | K_M mM | $K_{M,en}$ mM | $K_{M,ex}$ mM | $K_{ICP,ex}$ |
|-----|---|--|--|-------------|------------------|------------------|--------------|
| 3.9 | 0.01010 | 0.0504 | 401.3 | 3.354 | 0.319 | 88.50 | 4134 |
| 4.9 | 0.00862 | 0.0662 | 66.2 | 1.321 | 0.382 | 8.60 | 658 |
| 5.9 | 0.00503 | 0.0587 | 81.8 | 1.214 | 1.480 | 18.38 | 1320 |

para cuya aplicación se han utilizado tres niveles de concentración inicial de celobiosa y los correspondientes rangos de x obtenidos experimentalmente, determinándose las líneas que se muestran en las figuras 5.34 y 5.35. Se observa que la variación de la conversión con la intensidad de tratamiento, X , a los tres niveles de concentración inicial de celobiosa, alcanza sus mayores niveles a la temperatura de 60°C y al pH de 4.9, que serían por lo tanto las condiciones más favorables dentro de las ensayadas, aunque el pH de 3.9 llega a ser algo más favorable que el de 4.9 al aumentar la concentración inicial de celobiosa.

Para la simulación de la hidrólisis de carboximetilcelulosa, de acuerdo con los resultados obtenidos en los apartados 5.2.4 y 5.2.5, se ha utilizado la ecuación [5.109] para la variación de la productividad en glucosa con la intensidad de tratamiento.

$$X_C = \frac{dx_c}{dy} = \frac{k_{a,en} (1 - x)}{K_{M,en} + P_f (1 - x)} + \frac{k_a (x_p - x_c)}{K_M + \frac{P_f}{2} (x_p - x_c)} \quad [5.130]$$

y la [5.121] para la variación de la productividad global con la intensidad de tratamiento

$$X_p = \frac{dx_p}{dy} = \frac{k_{a,en} (1 - x)}{K_{M,en} + P_f (1 - x)} + \frac{2 k_{a,ex} (1 - x_p)}{K_{M,ex} + P_f (1 - x_p) + K_{ICP,ex} \frac{P_f}{2} (x_p - x_c)} \quad [5.131]$$

en ambos casos para su aplicación se han utilizado los parámetros cinéticos de las tablas 5.8 y 5.9 y las parejas x_p y x_c correspondientes a los experimentos realizados.

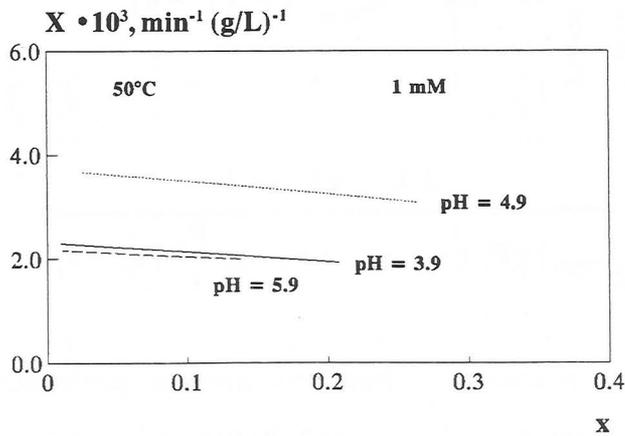
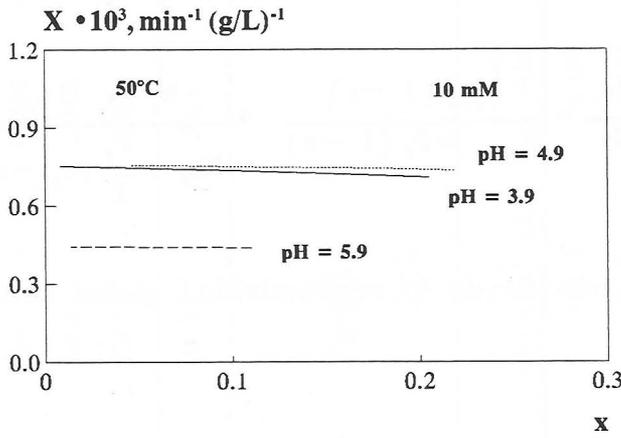
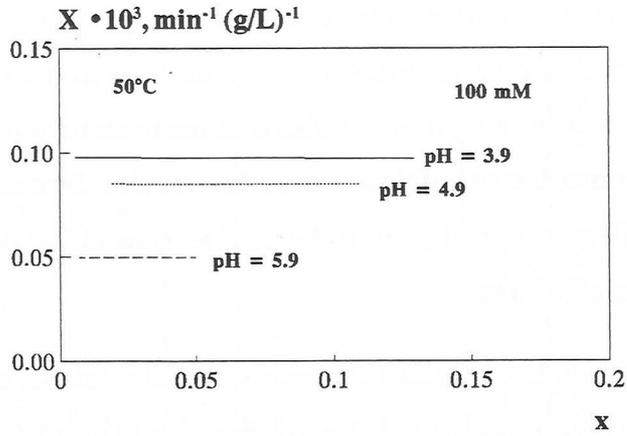


Figura 5.34

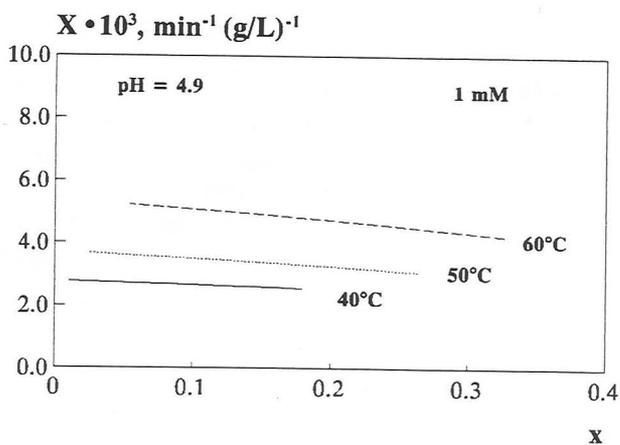
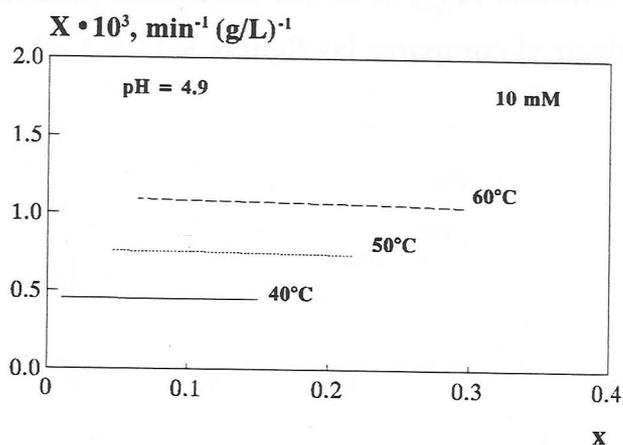
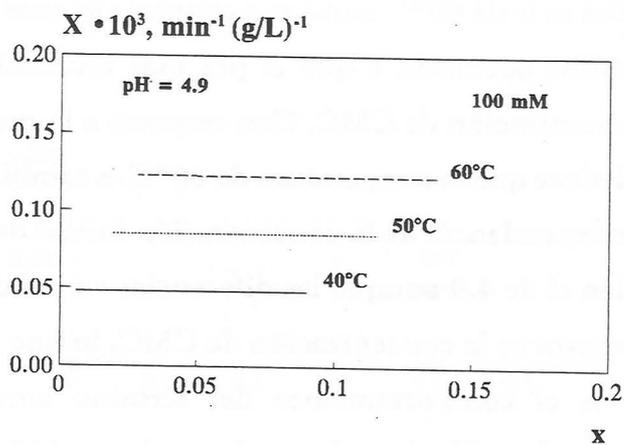


Figura 5.35

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 5.36 a 5.39, con respecto a la productividad en glucosa, figuras 5.36 y 5.37, se deduce que la temperatura más favorable de las ensayadas es la de 60°C aunque a concentraciones reducidas de CMC la de 50°C también resulta adecuada y que el pH más favorable es el de 4.9 con independencia de la concentración de CMC. Con respecto a la productividad global, figuras 5.38 y 5.39, se deduce que la temperatura de 60°C es también la más favorable de las ensayadas, con independencia de la concentración inicial de CMC y que el pH más favorable es también el de 4.9 aunque las diferencias con el de 3.9 son escasas y tanto menores cuanto mayor es la concentración de CMC, lo que fundamentalmente es debido a que ese es el comportamiento del término correspondiente a las exoglucanasas y dicho término, $X_{p,ex}$, es el que determina prácticamente el valor de X_p , como se puede deducir al comparar las figuras 5.33 y 5.39.

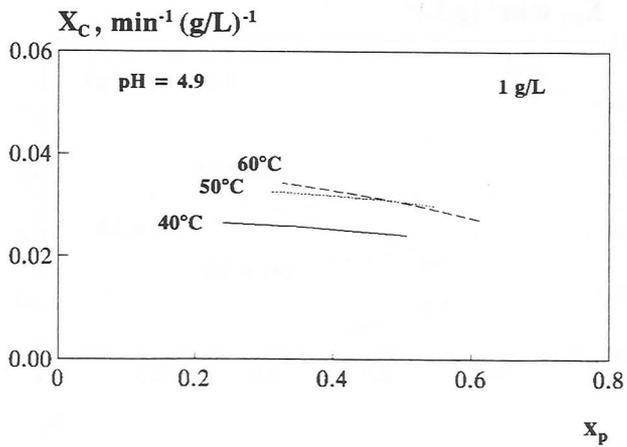
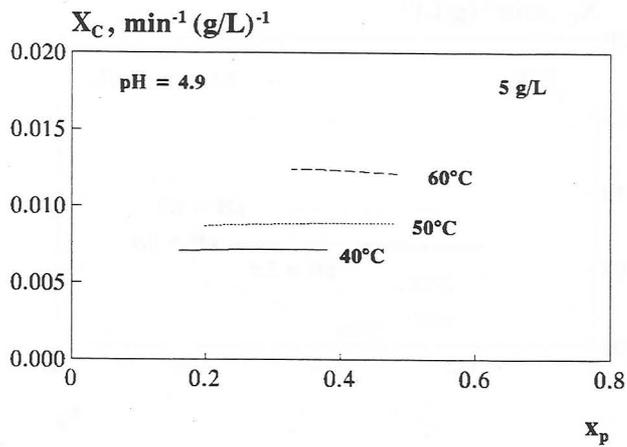
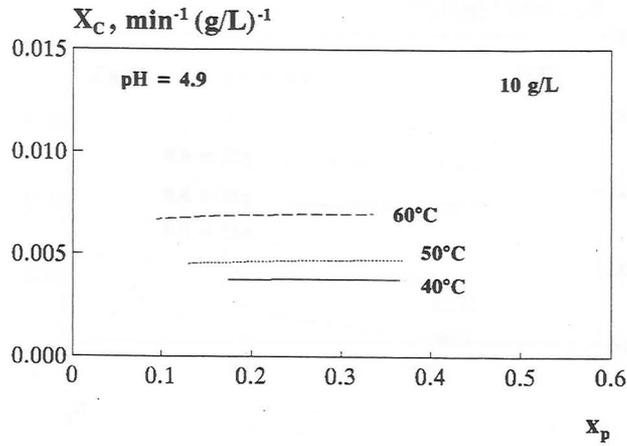


Figura 5.36

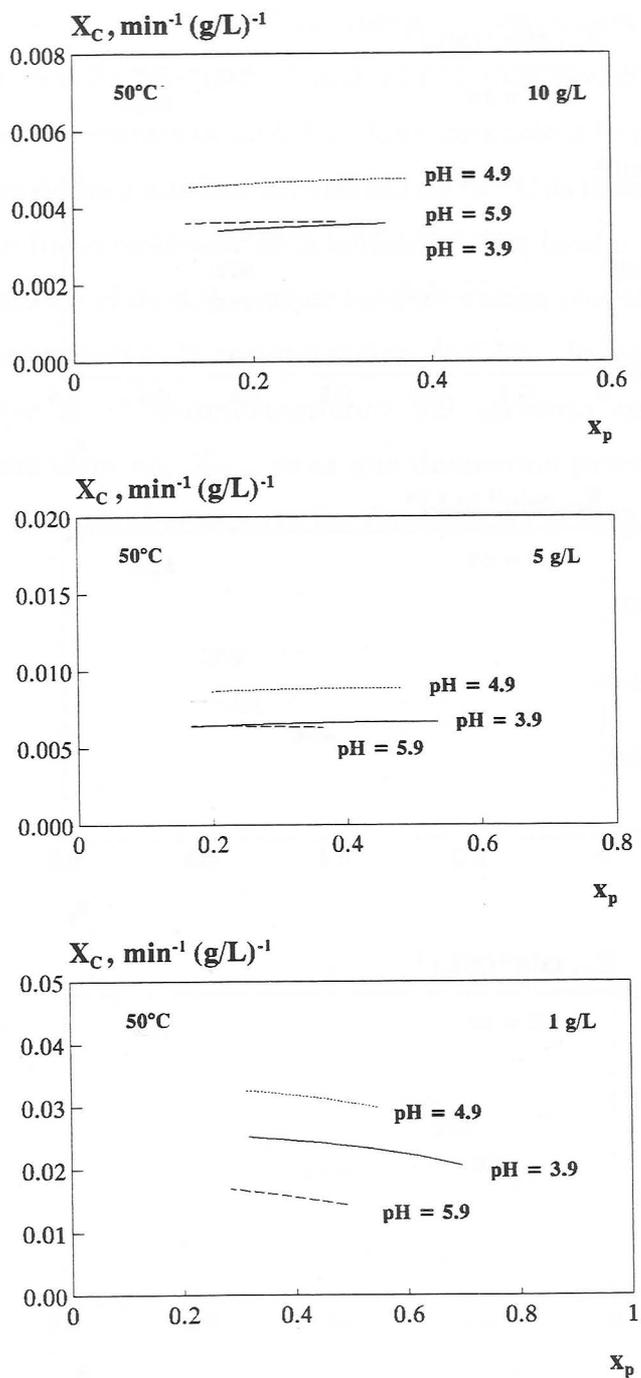


Figura 5.37

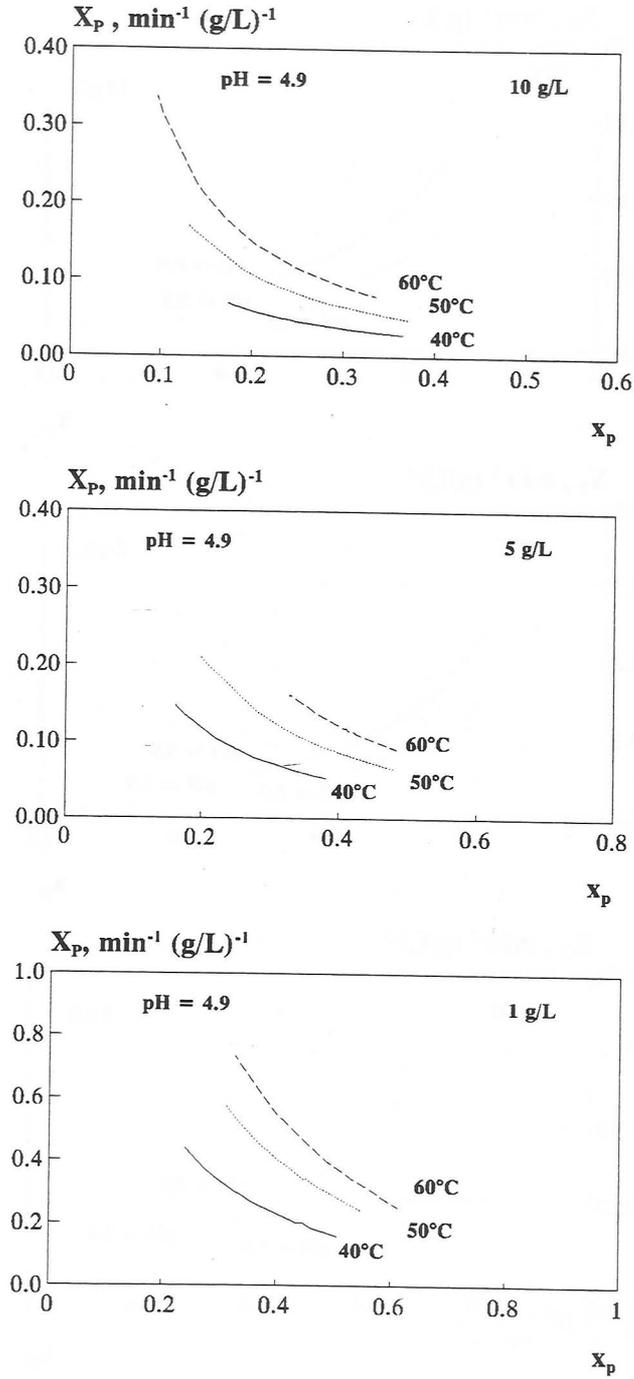


Figura 5.38

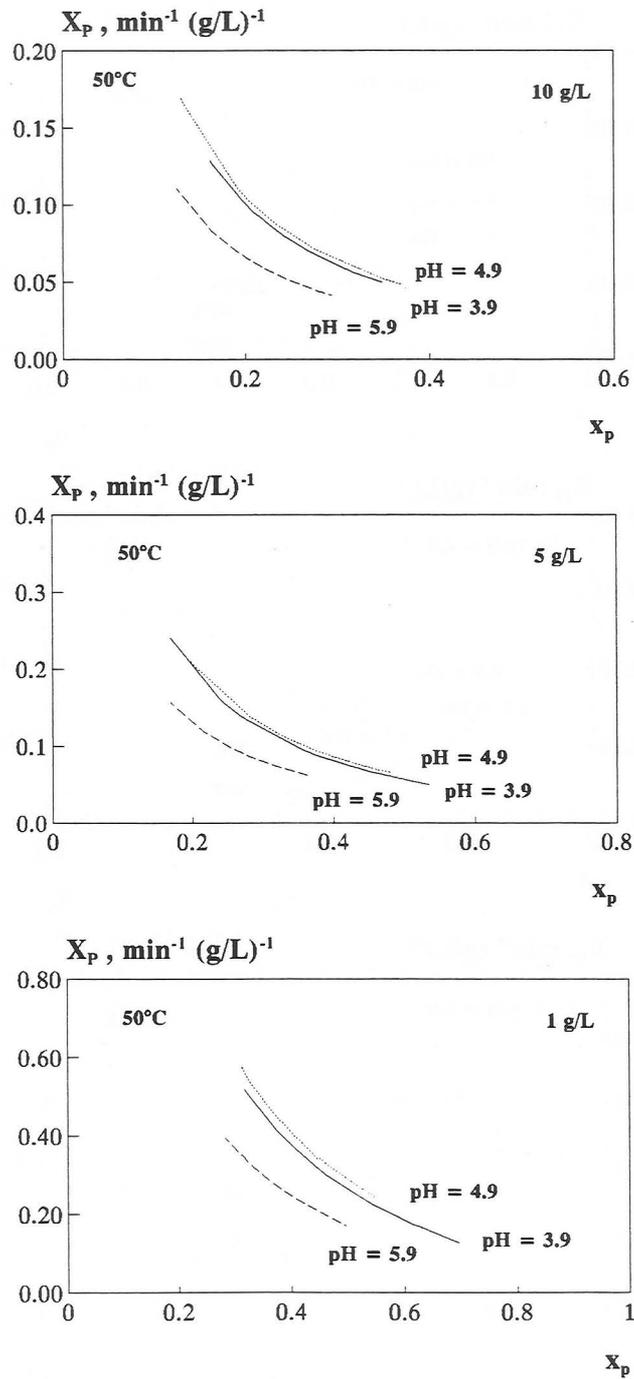


Figura 5.39

CONCLUSIONES

Como resultado del trabajo realizado se ha llegado a las siguientes conclusiones:

HIDRÓLISIS DE CELOBIOSA CON CELLUCLAST

- 1^a Mediante experimentos en los que se ha mantenido hasta cuatro horas y a temperatura constante, 40, 50 y 60°C, una disolución de la enzima se ha determinado que no existe una desactivación significativa.
- 2^a La obtención de conversiones apreciables en experimentos realizados a tiempo de reacción nulo pone de manifiesto la existencia de un tiempo de parada de la reacción, que resulta dependiente de la temperatura de operación y que se ha incorporado en el tratamiento de los datos cinéticos por el método de las velocidades iniciales.
- 3^a Se ha desarrollado un procedimiento sistemático para establecer la ecuación de velocidad mediante el método integral de tratamiento de datos cinéticos, considerando las posibilidades de inhibición de sustrato y/o producto en reacciones enzimáticas irreversibles de un sustrato.
- 4^a Utilizando los métodos indicados en las dos conclusiones anteriores se ha comprobado que en la hidrólisis de celobiosa con Celluclast los resultados experimentales se ajustan aceptablemente mediante una ecuación simple de Michaelis-Menten.

5ª Los parámetros cinéticos, constantes de velocidad y de Michaelis de la hidrólisis de celobiosa con Celluclast se han correlacionado con la temperatura mediante las expresiones:

$$k_a = 3.15 \cdot 10^4 \exp\left(-\frac{40700}{RT}\right), \text{ mM min}^{-1} (\text{g/L})^{-1}$$

$$K_M = 8.68 \cdot 10^3 \exp\left(-\frac{24100}{RT}\right), \text{ mM}$$

que indican un valor de 40.7 kJ/mol para la energía de activación de la constante k_a y de 24.1 kJ/mol para la variación de K_M con la temperatura.

6ª También se ha establecido la influencia del pH sobre los parámetros cinéticos de la hidrólisis de celobiosa con Celluclast, existiendo un valor medio para k_a de 0.00935 $\text{mM min}^{-1} (\text{g/L})^{-1}$ para pH 3.9 y 4.9 que disminuye a 0.00505 a pH igual a 5.9 y un valor medio para K_M de 1.27 mM para pH 4.9 y 5.9 que aumenta hasta 3.54 a pH igual a 3.9, en consecuencia el pH más favorable de los ensayados es 4.9, aunque el de 3.9 llega a ser algo más favorable a concentraciones elevadas de celobiosa.

HIDRÓLISIS DE CARBOXIMETILCELULOSA (CMC) CON CELLUCLAST

7ª Mediante experimentos de hidrólisis total de CMC con Celluclast se han determinado las relaciones entre las concentraciones máximas de glucosa y celobiosa (G_f y C_f) y la inicial de CMC (S_0).

$$\frac{G_f}{S_0} = 0.556 \frac{\text{mmol glucosa}}{\text{g CMC}}$$

$$\frac{C_f}{S_0} = 0.5245 \frac{\text{mmol celobiosa}}{\text{g CMC}}$$

lo que permite establecer el producto total, P_f , expresado como glucosa equivalente, y por lo tanto definir productividades tanto en glucosa, x_c igual a G/P_f , como global, x_p igual a P/P_f .

8ª Se ha comprobado que, en las condiciones de operación utilizadas, el posible efecto sinérgico entre las endo y las exoglucanasas resulta prácticamente despreciable y que para establecer la intensidad de tratamiento se puede utilizar el producto de la concentración inicial de enzima por la suma de los tiempos de reacción y de parada de la misma, $e_0 (t + t_p)$

9ª Se ha determinado que la producción directa de glucosa a partir de CMC mediante las endoglucanasas es superior a la correspondiente a la hidrólisis de celobiosa por las β -1.4-glucosidasas y que se puede ajustar considerando una ecuación simple de Michaelis-Menten.

10ª Los parámetros cinéticos, constantes de velocidad y de Michaelis de la producción directa de glucosa mediante las endoglucanasas se han correlacionado con la temperatura según las expresiones:

$$k_{a, \text{en}} = 2.17 \cdot 10^3 \exp \left(- \frac{27700}{RT} \right), \text{ mM min}^{-1} (\text{g/L})^{-1}$$

$$K_{M, \text{en}} = 2.09 \cdot 10^6 \exp \left(- \frac{40500}{RT} \right), \text{ mM}$$

que indican un valor de 27.7 kJ/mol para la energía de activación de la constante $k_{a, \text{en}}$ y de 40.5 kJ/mol para la variación de $K_{M, \text{en}}$ con la temperatura.

11^a También se ha establecido la influencia del pH sobre los parámetros cinéticos de la producción directa de glucosa mediante las endoglucanasas, existiendo un valor medio para $k_{a, \text{en}}$ de 0.0624 para pH 4.9 y 5.9 que disminuye a 0.0504 a pH igual 3.9 y un valor medio para $K_{M, \text{en}}$ de 0.35 para pH 3.9 y 4.9 que aumenta hasta 1.48 a pH igual a 5.9, en consecuencia el pH más favorable de los ensayados es 4.9.

12^a Se ha determinado que toda la producción de celobiosa a partir de CMC es prácticamente atribuible a las exoglucanasas y que se puede ajustar a una ecuación cinética de Michaelis-Menten con inhibición competitiva de producto.

13^a Los parámetros cinéticos, constantes de velocidad, de Michaelis y de inhibición competitiva de la producción de celobiosa a partir de CMC mediante las exoglucanasas se han correlacionado con la temperatura según las expresiones:

$$k_{a, \text{ex}} = 7.38 \cdot 10^{11} \exp \left(- \frac{61300}{RT} \right), \text{ mM min}^{-1} (\text{g/L})^{-1}$$

$$K_{M,ex} = 2.23 \cdot 10^6 \exp\left(-\frac{32100}{RT}\right), \text{ mM}$$

$$K_{ICP,ex} = 1.32 \cdot 10^6 \exp\left(-\frac{19400}{RT}\right)$$

que indican un valor de 61.3 kJ/mol para la energía de activación de la constante $k_{a,ex}$ y de 32.1 kJ/mol y de 19.4 kJ/mol para las variaciones de $K_{M,ex}$ y $K_{ICP,ex}$ con la temperatura.

14^a También se ha determinado la influencia del pH sobre los parámetros cinéticos de la producción de celobiosa a partir de CMC mediante las exoglucanasas, existiendo para $k_{a,ex}$, $K_{M,ex}$ y $K_{ICP,ex}$ valores prácticamente coincidentes para pH 4.9 y 5.9, mientras que los tres parámetros aumentan significativamente al reducirse el pH a 3.9. La simulación de la correspondiente ecuación de velocidad pone de manifiesto que el pH más favorable es el de 4.9, aunque con escasa diferencia respecto al de 3.9. Este resultado junto con el de las conclusiones 6^a y 11^a permite deducir que el pH más favorable para la hidrólisis de CMC con Celluclast es el de 4.9.

NOMENCLATURA

Aunque las variables se han ido definiendo a lo largo del texto a medida que se han introducido se recoge la nomenclatura para aquellas más utilizadas.

- C Concentración de celobiosa, mM.
- C_f Concentración de celobiosa en la hidrólisis total, mM.
- e Concentración de enzima, g/L.
- g Concentración de glucosa, mg/L.
- G Concentración de glucosa, mM
- G_f Concentración de glucosa en la hidrólisis total, mM.
- k y K Parámetros cinéticos.
- k_a Constante de velocidad, $\text{mM min}^{-1} (\text{g/L})^{-1}$.
- K_M Constante de Michaelis, mM.
- K_{ICP} Constante de inhibición competitiva por producto.
- P Concentración de producto total equivalente en la hidrólisis de CMC, mM, expresada como glucosa equivalente, o de glucosa en la hidrólisis de celobiosa, mM.
- P_f Concentración de producto total correspondiente en la hidrólisis total de CMC, mM, expresada como glucosa equivalente.
- P_T Concentración de producto total equivalente en la hidrólisis de celobiosa, mM.
- r Velocidad de reacción, mM (min)^{-1} .
- S Concentración de carboximetilcelulosa, g/L, o de celobiosa, mol/L.

| | |
|------------|--|
| t | Tiempo de reacción, min. |
| T | Temperatura absoluta, K. |
| t_c | Tiempo de reacción corregido, min. |
| t_p | Tiempo de parada de reacción, min. |
| x | Conversión. |
| x_c | Productividad en glucosa. |
| X_C | Derivada de la productividad en glucosa con respecto a la intensidad de tratamiento, $\text{min}^{-1} (\text{g/L})^{-1}$. |
| x_p | Productividad global, expresada como glucosa equivalente. |
| X_p | Derivada de la productividad global con respecto a la intensidad de tratamiento, $\text{min}^{-1} (\text{g/L})^{-1}$. |
| y | Intensidad del tratamiento, min g/L . |
| α_1 | Fracción másica de endoglucanasas en el complejo enzimático. |
| α_2 | Fracción másica de exoglucanasas en el complejo enzimático. |
| α_3 | Fracción másica de β -1,4-glucosidasas en el complejo enzimático. |

Subíndices

| | |
|----|----------------|
| 0 | Valor inicial. |
| en | Endoglucanasa. |
| ex | Exoglucanasa. |

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMI, A., CAVAZZONI, V., TREZZI, M. y CRAVERI, R.; "Cellobiose Hydrolysis by *Trichosporon pullulans* Cells Immobilized in Calcium Alginate"; *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 391-395 (1988).
- AGUADO, J., ROMERO, M. D., RODRIGUEZ, L. y CALLES, J. A.; "Thermal Deactivation of Free and Immobilized β -glucosidase from *Penicillium-funiculosum*"; *Biotechnol. Prog.*, **11**, 104-106 (1995).
- AIT, N., CREUZET, N. y CATTANES, N.; "Characterization and Purification of Thermoestable β -glucosidase from *Clostridium thermocellum*"; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 537 (1979).
- ALFANI, F., CANTARELLA, L., GALLIFUOCO, A., PEZZULO, L., SCARDI, V. y CANTARELLA, M.; "Characterization of the β -glucosidase Activity Associated with Immobilized cellulase of *Aspergillus niger*"; *Ann N.Y. Acad. Scien.* (1987).
- ARIAS ERGUETA, P. L., LEGARRETA FERNANDEZ, J. A., GUTIERREZ-CAÑAS MATEO, C. y MINGUITO SALABARRIA, J. J.; "Procesos técnicos para la obtención de gas combustible a partir de biomasa"; VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias. Murcia. Octubre (1985).
- BARNETT, S. M., CLARK, J. P. y NYSTROM, J. M.; "Biochemical Engineering Renewable Ressources and New Foods"; (Editores): *AICHe Symposium Serie*, 158(72) (1976).
- BELTRAME, P. L., CARNITTI, P., MARZITTI, A. y SARTO, V.; "Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials"; *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1233 (1984).
- BEN-BASSAT, A., LAMED, R. y ZEIKUS, J.; "Ethanol Production by Thermophilic bacteria: Metabolic Control of end Product Formation in *Thermoanaerobium brockii*"; *Bacteriol.*, **146**(1), 192-129 (1981).
- BEN-GHEDALIA, D. y MIRON, J.; "The Effect of Combined Chemical and Enzyme Treatments on the Saccharification and *in vitro* Digestion Rate of Wheat Straw"; *Biotechnol. Bioeng.*, **23**(4), 823-831 (1981).
- BHANDARI, N., MACDONALD, D. G. y BAKHSHI, N. N.; "Kinetic Studies of Corn Stoner Saccharification Using Sulphuric Acid"; *Biotechnol. Bioeng.*, **26**(4), 320-327 (1984).

BILBAO DUÑABEITIA, R., ARAUZO PEREZ, J., MILLERA PERALTA, A. y LEZAUN NAVARRO, J.; "Pirólisis de biomásas lignocelulósicas"; VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias. Murcia (1985).

BINDER, A. y GHOSE, T. K.; "Adsorption of Cellulose by *Trichoderma viride*"; Biotechnol. Bioeng., **20(8)**, 1187-1199 (1978).

BISSETT, F. y STERNBERG, D.; "Immobilization of *Aspergillus* β -glucosidase on Chitosan"; Appl. and Environ. Microbiol., **35**, 750-755 (1978).

BOOMAN, K. A. y NIEMANN, C.; "The Evaluation of the Kinetic Constants of Enzyme-Catalyzed Reactions by Procedures Based upon Integrated Rate Equation II"; J. Am. Chem. Soc., **78**, 3642-3646 (1956).

BRAVO RODRIGUEZ, V., CAMACHO RUBIO, F., PAEZ DUEÑAS, M. P. y REYES REQUENA, A.; "Pérdida de la Actividad β -1,4-glucosidasa en las Celulasas de *T. reesei*"; An. Quím., **86(2)**, 208-212 (1990).

BRAVO RODRIGUEZ, V., CAMACHO RUBIO, F., PAEZ DUEÑAS, M. P. y REYES REQUENA, A.; "Ensayos de Actividad β -1,4-glucosidasa en Celulasas de *T. reesei* Considerando la Desactivación de la Enzima"; Afinidad **48(432)**, 110-114 Marzo-Abril (1991).

BUENO CORDERO, J., ESTEVEZ-SANCHEZ, A. M., FERNANDEZ TENA, A., MARTIN SANCHEZ, J. L. y RAMOS CASTELLANOS, F.; "Aprovechamiento de la paja de cereales mediante procesos termoquímicos"; VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias. Murcia. Octubre (1985).

CAMACHO RUBIO, F., BRAVO RODRIGUEZ, V., PAEZ DUEÑAS, M. P. y MARTINEZ COBO, T.; "Hidrólisis de Celobiosa con β -1,4-glucosidasa Procedente de Almendras"; Anales de Química, Serie A, **83(1)**, 71-77 (1987).

CAMACHO RUBIO, F., GONZALEZ TELLO, P., JURADO ALAMEDA, E. y ROBLES MEDINA, A.; "Hidrólisis Enzimática de Carboximetilcelulosa. II Modelo de dos Reacciones en Serie con Inhibición Competitiva por Producto"; An. Quím. **83(1)**, 83-90 (1987).

CAMACHO RUBIO, F., GONZALEZ TELLO, P., JURADO ALAMEDA, E. y ROBLES MEDINA, A.; "Hidrólisis enzimática de CMC. I. Efecto sinérgico de endo y exoglucanasas"; An. Quím. **83**, 78 (1987).

CAMACHO RUBIO, F., BRAVO RODRIGUEZ, V., y PAEZ DUEÑAS, M. P.; "Tratamiento de los Datos de Cinética Enzimática"; *Afinidad*, **45(417)**, 422-424 (1988).

CAMACHO RUBIO, F., BRAVO RODRIGUEZ, V., y PAEZ DUEÑAS, M. P.; "Influencia de la Desnaturalización de la Enzima en la Cinética Enzimática"; *Afinidad*, **45(418)**, 506-508 (1988).

CAMACHO RUBIO, F., GONZALEZ TELLO, P., JURADO ALAMEDA, E. y ROBLES MEDINA, A.; "Influencia de distintos pretratamientos químicos sobre la hidrólisis enzimática de celulosa microcristalina"; *An. Quím.* **84**, 236 (1988).

CAMINAL, G., LOPEZ-SANTIN, J. y SOLA, C.; "Kinetic Modeling of the Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Cellulose"; *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1282-1290 (1985).

CASTANON, M. y WILKE, C. R.; "Adsorption and Recovery of Cellulases During Hydrolysis of Newspaper"; *Biotechnol. Bioeng.*, **22(5)**, 1037-1053 (1980).

CASTANON, M. y WILKE, C. R.; "Effets of the Surfactant Tween 80 on Enzymatic Hydrolysis of New Paper"; *Biotechnol. Bioeng.*, **23(6)**, 1365-1372 (1981).

CHEN, H., HAYN, M. y ESTERBAUER, H.; "Purification and Characterization of Two Extracellular β -glucosidases from *Trichoderma reesei*"; *Bioch. Biophys. Acta*, **1121**, 54-60 (1992).

CHURCH, J. A. y WOOLDRIDGE, D.; "Continuous High-Solids Acid Hydrolysis of Biomass in a 1½ - in. Plug flow Reactor"; *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **20(2)**, 371-378 (1981).

CLARKE, A. E. y STONE, B. A.; "Properties of a β -1,4-glucan Hydrolase from *Aspergillus niger*"; *Biotechnol. J.*; **96**, 802-807 (1965).

CLARKE, A. J.; "Chemical modification of a β -1,4-glucosidase from *Schizophyllum commune*: evidence for essential carboxyl groups"; *Bioch. Biophys. Acta*, **1040**, 145-152 (1990).

CORELLA TUDANCA, J., VALENCIA GARETA, M., ADANEZ ELORZA, J. y AZNAR VILLACAMPA, M. P.; "La fluidización de biomasa con vistas a su aprovechamiento energético"; VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias. Murcia. Octubre (1985).

DEKKER ROBERT, F. H.; "Kinetic, Inhibition, and Stability Properties of a Commercial β -D-Glucosidase (Cellobiase) Preparation from *Aspergillus niger* and Its Suitability in the Hydrolysis of Lignocellulose"; *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1438-1442 (1986).

DESROCHERS, M., JURASEK, L. y PAICE, M. G.; "High Production of β -glucosidase in *Schizophyllum commune*: Isolation of the Enzyme and Effect of the Culture Filtrate on Cellulose Hydrolysis"; *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**(1), 222-228 (1981).

DETROY, R. W., LINDENFELSER, L. A., SOMMER, S. y OTRON, W. L.; "Bioconversion of Wheat Straw to Ethanol: Chemical Modification, Enzymic Hydrolysis and Fermentation"; *Biotechnol. Bioeng.*, **23**(7), 1527 (1981).

DETROY, R. W., CUNNINGHAM, R. L., BOTHAST, R. J., BAGBY, M. O. y HERMAN, A.; "Bioconversion of Wheat Straw Cellulose/Hemicellulose to Ethanol by *Saccharomyces uvarum* and *Pachysolen tannophilus*"; *Biotechnol. Bioeng.*, **24**(5), 1105-1113 (1982).

DIXON, M. y WEBB, E. C.; "Enzyme", 3ª edición, pag. 47-206. Longman (1979).

ESTRADA, P., MATA, I., DOMINGUEZ, J. M., CASTILLON, M. P. y ACEBAL, C.; "Kinetic Mechanism of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* QM9414"; *Biochem. biophys. Acta*, **1033**, 298-304 (1990).

FAN, L. T., GHARPURAY, M. M. y LEE, YONG-HYUN; "Evaluation of Pretreatments for Enzymic conversion agricultural Residues"; *Biotechnol. Symp.*, **11**, 29-45 (1981).

FERDINAND, W.; "The Interpretation of Hyperbolic Rate Curves for Two-Substrate Enzyme. A Possible Mechanism for Phosphofructokinase"; *Biochem. J.*, **98**(1), 278-283 (1966).

FERNANDEZ GONZALEZ, J., DIAZ RODRIGUEZ, F. y BAO IGLESIAS, M.; "Grado de Mezcla en un Reactor de Lecho Fluidizado - Técnicas Estimulo Respuesta"; *Ingeniería Química*, **12**, 209-212 (1980).

FONT MONTESINOS, R., MARCILLA GOMIS, A., VERDU SANCHEZ, E. y DEVESA MARTINEZ, J.; " Pirólisis flash de cáscara de almendra en lecho fluidizado. I. Influencia de la temperatura"; VI Congreso Nacional de Química. Energías Básicas y Complementarias. Murcia. Octubre (1985).

- FUJII, M. y SHIMIZU, M.; "Synergism of Endoenzyme and Exoenzyme on Hydrolysis of Soluble Cellulose Derivatives"; *Biotechnol. Bioeng.*, **28(6)**, 878-882 (1986).
- GABELSBERGER, J., LIEBL, W. y SCHLEIFER, K.; "Purification and Properties of Recombinant β -glucosidase of the Hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*"; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 44-52 (1993).
- GARCIA MARTINEZ, D. V., SHINMYO, A., MADIA, A. y DEMAIN, A. L.; "Studies on Cellulase Production by *Clostridium thermocellum*"; *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **9(3)**, 189-197 (1980).
- GHOSE, T. K., ROYCHOUDHURY, O. K. y GHOSH, P.; "Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of Lignocellulosics to Ethanol Under vacuum Cycling and Step Feeding"; *Biotechnol. Bioeng.*, **26(4)**, 377-381 (1984).
- GONG, C., LADISH, M. R. y TSAO, G. T.; "Cellobiase from *T. viride*: Purification, Properties, Kinetics and Mechanism"; *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 959-981 (1977).
- GOULD, J. M.; "Alkaline Peroxide Delignification of Agricultural Residues Enhance Enzymatic Saccharification"; *Biotechnol. Bioeng.*, **26(1)**, 46-52 (1984).
- GROLEAU, D. y FORSBERG, C. W.; "Cellulolytic Activity of the Rumen bacterium *Bacterioides Succinogenes*"; *Can. J. Microbiol.*, **27**, 517 (1981).
- GROUS, W., CONVERSE, A., GRETHLEIN, H. y LYND, L.; "Kinetics of Cellobiose Hydrolysis Using Cellobiase Composites from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*"; *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 463-470 (1985).
- HAN, Y. W., TIMPA, J., CIEGLER, A., COURTNEY, J., CURRY, W. F. y LAMBREMONT, E. N.; " γ -Ray-induced Degradation of Lignocellulosic Materials"; *Biotechnol. Bioeng.*, **23(11)**, 2525-2535 (1981).
- HARDT, H. y LAMPORT, D. T. A.; "Hydrogen Fluoride Saccharification of wood: Lignin Fluoride Content, Isolation of α -D-Glycopyranosyl Fluoride and Posthydrolysis of Reversion Products"; *Biotechnol. Bioeng.*, **24(4)**, 903-918 (1982).
- HERRERO, A. A. y GOMEZ, R. F.; "Development of Ethanol Tolerance in *Clostridium thermocellum*: Effect of Growth Temperature"; *Appl. and environ. Microbiol.*, **40(3)**, 571-577 (1980).

HIJAZI, N. H. y LAIDLER, K. J.; "Kinetic Equation for Consecutive reversible Reactions with Special Reference to Protein Denaturations"; J. Chem. Soc. Faraday Trans. I, **68**(7), 1235-1242 (1972).

HOLTZAPPLE, M.T., CARAM, H. S. y HUMPHREY, A. E.; "A comparison of two empirical models for the enzymatic hydrolysis of pretreated poplar wood"; Biotechnol. Bioeng., **26**, 936-941 (1984).

HOLTZAPPLE, M.T., CARAM, H. S. y HUMPHREY, A. E.; "Determining the inhibition constants in the HCH-1. Model of cellulose hydrolysis"; Biotechnol. Bioeng., **26**, 753-757 (1984).

HOLTZAPPLE, M.T., CARAM, H. S. y HUMPHREY, A. E.; "The HCH-1 model of enzymatic cellulose hydrolysis"; Biotechnol. Bioeng., **26**, 775-780 (1984).

HOLTZAPPLE, M.T. y HUMPHREY, A. E.; "The effect of organosolv pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar"; Biotechnol. Bioeng., **26**, 670-676 (1984).

HOLTZAPPLE, M., COGNATA, M., SHU, Y., y HENDRICKSON, CH.; "Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents"; Biotechnol. Bioeng. **36**, 275-287 (1990).

HONG, J., LADISCH, M. R., GONG, CH., WANKAT, P. C. y TSAO, G. T.; "Combined Product and Substrate Inhibition Equation for Cellobiase"; Biotechnol. Bioeng., **23**, 2779-2788 (1981).

HORTON, G. L., RIVERS, D. B., EMERT, G. H.; "Preparation of Cellulosics for Enzymic Conversion"; Ind. Eng. Chem. Res. Dev. **19**(3), 422-429 (1980).

HOWELL, J. A. y MANGAT, M.; "Enzyme Deactivation during Cellulose Hydrolysis"; Biotechnol. Bioeng., **20**, 847-863 (1978).

HOWELL, J. A. y STUCK, J. D.; "Kinetics of Solka Floc Cellulose Hydrolysis by *Trichoderma viride* Cellulase"; Biotechnol. Bioeng., **17**, 873-893 (1975).

HUANG, A. A.; "Insoluble Cellulose-Cellulase System"; Biotechnol. Bioeng., **17**(10), 1421-1433 (1975).

IKAI, A. y TANFORD, C.; "Kinetic Evidence for Incorrectly Folded Intermediate States in the Refolding of Denatured Proteins"; Nature, **230**, 100-102 (1971).

INGLIN, M. FEINBERG, B. A. y LOEWENBERG, J. R.; "Partial Purification and Characterization of a New Intercellular β -glucosidase of *T. reesei*"; *Biochem. J.* **185**, 515-519 (1980).

JAIN, P. y WILKINS, E. S.; "Cellulase Immobilized on Modified Nylon for Saccharification of Cellulose"; *Biotechnol. Bioeng.*, **30(9)**, 1057-1062 (1987).

JAIN, D. y GHOSE, T. K.; "Cellobiose Hydrolysis Using *Pichia etchellsii* Cells Immobilized in Calcium Alginate"; *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 340-346 (1984).

JOGLEKAR, R., CLERMAN, R. J., DUEKLETTE, R. P. y CHEREMISINOFF, P. N.; *Biotechnology. Selected Applications and Unit Operations*. Ed. Ann. Arbor. Science Publishers. Collingwood. Michigan (1983).

KAMAKURA, M. y KAETSU, I.; "Radiatio Degradation and the Subsequent Enzymatic Hydrolysis of Waste Papers"; *Biotechnol. Bioeng.*, **24(4)**, 991-997 (1982).

KAPLAN, N. G.; "Methods Enzymology", 3. Academic Press (1957).

KARUBE, I., TANAKA, S., SHIRAI, T. y SUZUKI, S.; "Hydrolysis of Cellulose in a Cellulose-Bead Fluized Bed Reactor"; *Biotechnol. Bioeng.*, **19(8)**, 1183-1191 (1977).

KIM, CH.; "Characterization and Substrate-Specificity of an Endo- β -1,4-D-Glucanase-I (Avicelase-I) from an Extracellular Multienzyme Complex of *Bacillus-Circulans*"; *Appl. and Environ. Microbiol.*, **61(3)**, 959-965 (1995).

KING, E. L. y ALTMAN, C.; "A Schematic Method of Deriving the Rate Laws for Emzyme-Catalyzed Reactions"; *J. Phys. Chem.*, **60**, 1375-1378 (1956).

KOICHIRO, K., KOEI, K., FUMIHIDE, S., KEIICHI, K. y MAYUMI, K.; "A Kinetic Expression for Hydrolysis of Soluble Starsh by Glucoamylase"; *Biotechnol. Bioeng.*, **24(2)**, 347-354 (1982).

LAIDLER, K. J. y BUNTING, P. S.; "The Chemical Kinetics of Enzyme Action", Clarendon Press, 2ª edición (1973).

LAMED, R. y ZEIKUS, J. G.; "Ethanol Production by Thermophilic bacteria: Relationship Between Fermentation Product Yields of and Catabolic Enzyme Activities in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobium brockii*"; *J. Bacteriol.*, **144(2)**, 569-578 (1980).

- LEE, S. E., ARMIGER, W. B., WATTEEUW, C. M. y HUMPHREY, A. E.; "A Theoretical Model for Enzymic Hydrolysis for Cellulose"; *Biotechnol. Bioeng.*, **20(1)**, 141-144 (1978).
- LEE, S. B., SHIN, H. S. y RYU, D. D.; "Adsorption of Cellulase on Cellulose: Effect of Physicochemical Properties of Cellulose on Adsorption and Rate of Hydrolysis"; *Biotechnol. Bioeng.*, **24(10)**, 2137-2153 (1982).
- LI, X. y CALZA, R. E.; "Kinetic Study of a Cellobiase Purified from *Neocallimastix frontalis* EB 188"; *Biochem. Biophys. Acta* **1080**, 148-154 (1991).
- LIM, H. C.; "On Kinetic Behavior at High Enzyme Concentrations"; *AIChE Journal*, **19(3)**, 659-661 (1973).
- LIN, C. C. y SEGEL, L. A.; "Mathematics Applied to Deterministic Problems in the Natural Sciences", Macmillan Publishing Co. (1974).
- MANDELS, M., HONTZ, L. y NYSTROM, J.; "Enzymic Hydrolysis of Waste Cellulose"; *Biotechnol. Bioeng.*, **16(11)**, 1471-1493 (1974).
- MANDELS, M., MEDEIROS, J. E., ANDREOTTI, R. E. y BISSETT, F. H.; "Enzymic Hydrolysis of Cellulose: Evaluation of Cellulase Culture Filtrates Under Use Conditions"; *Biotechnol. Bioeng.*, **23(9)**, 2009-2026 (1981).
- MANDELS, M.; "Cellulases"; *Annual Reports on Fermentation Processes*. 5, 35 (1982).
- MANDENIUS, C. F., NILSSON, B., PERSSON, I. y TJERNELD, F.; "Kinetic Models for Enzymic Cellulose Degradation in Aqueous Two-Phase Systems"; *Biotechnol. Bioeng.*, **31(3)**, 203-207 (1988).
- MARTIN, C., NEGRO, M. J., ALFONSEL, M. y SAEZ, R.; "Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass from *Onopordum nervosum*"; *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 341-344 (1988).
- McGINNIS, G. D., WILSON, W. W. y MULLEN, C. E.; "Biomass Pretreatment With Water and High-Pressure Oxygen. The Wet-Oxidation Process"; *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **22(2)**, 352-357 (1983).

McGINNIS, G. D., WILSON, W. W., PRINCE, S. E. y CHYI-CHENG-CHEN; "Conversion of Biomass into Chemicals With High-Temperature Wet-Oxidation"; *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **22(4)**, 633-636 (1983).

MEYER, H. P. y HUMPHREY, A. E.; "Cellulase Production by a Wild and a New Mutant Strain of *Thermomonospora sp.*"; *Biotechnol. Bioeng.*, **24(8)**, 1901-1904 (1982).

MILLER, G. L.; "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar"; *Anal. Chem.* **31(3)**, 426-428 (1959).

MILLETT, M. A., BAKER, A. J. y SATTER, L. D.; "Pretreatment to Enhance Chemical Enzymic and Microbiological Attack of Cellulosic Materials"; *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **6**, 125 (1976).

MISHRA, C., RAO, M., SEETA, R., SRINIVASAN, M. C. y DESHPANDE, V.; "Hydrolysis of Lignocelluloses by *Penicillin funiculosum* Cellulase"; *Biotechnol. Bioeng.*, **26(4)**, 370-373 (1984).

MITCHELL, R. W., HAHN-HAGERDAL, B., FERCHAK, J. D. y PYE, E. K.; "Characterization of β -1,4-glucosidase Activity in *Thermoanaerobacter ethanolicus*"; *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **12**, 461-467 (1982).

MIYAIRI, S. y SUGIURA, M.; "Properties of β -glucosidase Immobilized in Sericin Membrane"; *J. Ferment. Technol.* **56(4)**, 303-8 (1978).

MOO-HOUNG, M., CHAHAL, D. S., SWAN, J. E. y ROBINSON, C. W.; "SCP Production by *Chaetomium cellulolyticum*, a New Thermotolerant Cellulolytic Fungus"; *Biotechnol. Bioeng.*, **19(4)**, 527-538 (1977).

MOO-YOUNG, M., MOREIRA, A. R. y DAUGULIS, A. J.; "Economics of Fermentation Processes for SCP Production from Agricultural Wastes"; *Can. J. Chem. Eng.*, **57**, 741-749 (1979).

MOREIRA, A. R., PHILLIPS, J. A. y HUMPHREY, A. E.; "Utilization of Carbohydrates by *Thermomonospora sp.* Grown on Glucose, Cellobiose and Cellulose"; *Biotechnol. Bioeng.*, **23(6)**, 1325-1338 (1981).

MORGAN, C. R., WARNER, J. P. y YURCHAK, S.; "Gasoline from Alcohols"; *Ind. Eng. Chem. Prod. Dev.*, **20(1)**, 185-190 (1981).

- NEELY, W. C.; "Factors Affecting the Pretreatment of Biomass With Gaseous Ozone"; *Biotechnol. Bioeng.*, **26(1)**, 59-65 (1984).
- NEILSON, M. J., KELSEY, R. G. y SHAFIZADEH, F.; "Enhancement of Enzymatic Hydrolysis by Simultaneous Attrition of Cellulosic Substrates"; *Biotechnol. Bioeng.*, **24(2)**, 293-304 (1982).
- OKAZAKI, M. y MOO-YOUNG, M.; "Kinetics of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Analytical Description of a Mechanistic Model"; *Biotechnol. Bioeng.*, **20(5)**, 637-663 (1978).
- OMAR, M'Hammed Aoulad El-Hadj Ben. Comunicación interna del Departamento de Ingeniería Química. Granada. (1997).
- PEITERSEN, N., MEDEIROS, J. y MANDELS, M.; "Adsorption of *Trichoderma* Cellulase on Cellulose"; *Biotechnol. Bioeng.*, **19(7)**, 1091-1094 (1977).
- PEMBERTON, M. S., BROWN, R. D. Jr. y EMERT, G. H.; "The Role of β -glucosidase in the Bioconversion of Cellulose to Ethanol"; *Can. J. Chem. Eng.*, **58**, 723-729 (1980).
- PERALTA, R. M., TEREZI, H. F. y JORGE, J. A.; " β -D-Glycosidase Activities of *Hemicola grisea*: Biochemical and Kinetic Characterization of Multifunctional Enzyme"; *Biochem. Biophys. Acta*, **1033**, 243-249 (1990).
- PIZZICHINI, M., FABIANI, C., ADAMI, A. y CAVAZZONI, V.; "Performance of a Membrane Reactor for Cellobiose Hydrolysis"; *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 955-962 (1989).
- POULSEN, O. M. y PETERSEN, L. W.; "A Standard Formula for the Determination of the Initial Rate of Hydrolysis of Carboxymethylcellulose"; *Biotechnol. Bioeng.*, **27(4)**, 409-414 (1985).
- RAO, M., DESPHAPANDE, V. y MISHRA, CH.; "Immobilization and Reuse of β -glucosidase from *Penicillium*"; *Biotechnol. Lett.*, **5(2)**, 75-78 (1983).
- REESE, E. T. y MANDELS, M.; "Stability of the Cellulase of *Trichoderma reesei* Under Use Conditions"; *Biotechnol. Bioeng.*, **22(2)**, 323-335 (1980).
- ROBERTS, D. V.; "Enzyme Kinetics", Cambridge University Press (1977).

- RUDICK, M. J. y ELBEIN, A. D.; "Glycoprotein Enzymes Secreted to *A. fumigatus*. Purification and Properties of β -glucosidase"; *J. Bacteriol.*, **124**, 534 (1975).
- RYU, D., LEE, S. B., TASSINARI, T. y MACY, C.; "Effect of Compression Milling on Cellulose Structure and on Enzymatic hydrolysis Kinetics"; *Biotechnol. Bioeng.*, **24(5)**, 1047-1067 (1982).
- SADANA, J. C., LACHKE, A. H. y SCHEWALE, J. C.; "Biochemistry of Cellulose Degradation and Cellulose Utilization for Feeds and for Protein"; *J. Sci. and Ind. Res.*, **38(8)**, 442-453 (1979).
- SADDLER, J. C., BROWNELL, H. H., CLERMONT, L. P. y LEVITIN, N.; "Enzymatic Hydrolysis of Cellulose and Various Pretreated Wood Fractions"; *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1389-1402 (1982).
- SAHA, B. C. y BOTHAST, R. J.; "Glucose Tolerant and Thermophilic β -glucosidases from Yeasts"; *Biotechnology Letters*, **18(2)**, 155-158 (1996).
- SARKANEN, K. V. y TILLMAN, D. A. (editores): "Progress in Biomass Conversion. vol. 1, Academic. Press (1979).
- SARKAR, J. M. y BURNS, A. G.; Immobilization of β -glucosidase and β -D-glucosidase-phenolic Complexes"; *Biotechnol. Lett.*, **5(9)**, 519-524 (1983).
- SCHMID, G. y WANDREY, CH.; "Purification and Partial Characterization of a Cellodextrin Glucohydrolase (β -Glucosidase) from *Trichoderma reesei* Strain QM 9414"; *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 571-585 (1987).
- SELKE, S. M., HAWLEY, M. C., HARDT, H., LAMPORT, D. T. A., SMITH, G. y SMITH, J.; "Chemicals from Wood Via HF"; *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **21(1)**, 11-16 (1982).
- SENGUPTA, S., GHOSH, A. K. y SENGUPTA, S.; "Purification and Characterization of β -Glucosidase (Cellobiase) from a Mushroom *Termitomyces-Clypeatus*"; *Biochem. Biophys. Acta*, **1076(2)**, 215-220 (1991).
- SING, A., AGRAWAL, A. K., ABIDI, A. B. y DARMWAL, N. S.; "Properties of Cellobiase from *Aspergillus niger*"; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 356-358 (1990).
- STERNBERG, D.; " β -glucosidase of Trichoderma: Its Biosynthesis and Role in Saccharification of Cellulose"; *Appl. Environ. Microbiol.* **31(5)**, 648-654 (1976).

STERNBERG, D., VIJAYAKUMAR, P. y REESE, E. T.; " β -glucosidase: Microbial Production and Effect on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose"; *Can. J. Microbiol.* **23**, 139-147 (1977).

SUGA, K., VAN DEDEM, G. y MOO-YOUNG, M.; "Enzymic Breakdown of Water Insoluble Substrates"; *Biotechnol. Bioeng.*, **17(2)**, 185-201 (1975).

SUGA, K., VAN DEDEM, G. y MOO-YOUNG, M.; "Degradation of Polysaccharides by Endo and Exoenzymes. Theoretical Analysis"; *Biotechnol. Bioeng.*, **17(3)**, 433-439 (1975).

SUNDSTROM, D. W., KLEI, H. E., COUGHLIN, R. W., BEIDERMAN, G. J. y BROUWER, C. A.; "Enzymatic Hydrolysis of Cellulose to Glucose Using Immobilized β -glucosidase"; *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 473-485 (1981).

TASSINARI, T. H., MACY, C. F. y SPANO, L. A.; "Technology Advances for Continuous Compression Milling Pretreatment of Lignocellulosics for Enzymatic Hydrolysis"; *Biotechnol. Bioeng.*, **24(7)**, 1495-1505 (1982).

TSAO, T. G., LADISCH, M., LADISCH, C., HSU, T. A., DALE, B. y CHOU, T.; *Annual Reports on Fermentation Processes*. Perlman, Ed. Academic Press. 2, 1 (1978).

VENARDOS, D. y KLEI, H. E.; "Conversion of Cellobiose to Glucose Using Immobilized β -glucosidase Reactors"; *Enzyme Microb. Technol.*, **2(2)**, 112-116 (1980).

WALD, S., WILKE, C. R. y BLANCH, H. W.; "Kinetics of the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose"; *Biotechnol. Bioeng.*, **26(3)**, 221-230 (1984).

WENTWORTH, W. E.; "Rigorous Least Squares Adjustment-Application to Some Non-linear Equations"; *J. Chem Ed.*, **42**, 96-103, 162-167 (1965).

WERNER, W., REY, G. y WIELINGER, H.; Z. (En ficha técnica del reactivo de glucosa de la casa Boehringer Mannheim) *Analyt. Chem.* **252**, 224 (1970).

WHEATLEY, M. A. y MOO-YOUNG, M.; "Degradation of Polysaccharides by End- and Exoenzymes: Dextran-dextranase Model Systems"; *Biotechnol. Bioeng.*; **19(2)**, 219-233 (1977).

WILKE, C. R., MAIORELLA, B., SCIAMANNAN, A., TANGU, R., WILEY, D. y WONG, H.; *Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*. Noye Data Corporation. Park Ridge. N. Jersey (1983).

WOOD, T. M. y McCRAE, S. I.; "The Mechanism of Cellulose Action With Particular Reference to the C₁ Component"; A. in Chemistry series, **181**, 181 (1979).

WOODWARD, J. y ARNOLD, S.; "The Inhibition of β -glucosidase Activity in *Trichoderma reesei* C30 Cellulose by Derivatives and Isomers of Glucose"; Biotechnol. Bioeng., **23(7)**, 1553-1562 (1981).

WOODWARD, J. y WISEMAN, A.; "Fungal and Other β -D-glucosidases-Their Properties and Applications"; Enzyme Microb. Technol., **4**, 73-79 (1982).

XIMENES FERREIRA, E.; "Purification and Characterization of a β -Glucosidase from Solid-State Cultures of *Humicola grisea* Var *Thermoidea*"; Can. J. Microbiol. **42**, 1-5 (1996).

YU, J. y MILLER, S. F.; "Utilization of Cellulosic Feed Stock in the Production of Fuel Grade Ethanol"; Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., **19(2)**, 237-241 (1980).

ZERTUCHE, L. y ZALL, R. R.; "A Study of Producing Ethanol from Cellulose Using *Clostridium thermocellum*"; Biotechnol. Bioeng., **24(1)**, 57-68 (1982).



Biblioteca Universitaria de Granada



01052481