

T-UES  
1506  
F175  
199A  
E. 2

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA  
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA



"PRUEBAS DE ESCALAMIENTO DEL PROCESO DE PRODUCCION DE ACIDO ACETICO A PARTIR DE ALCOHOL ETILICO INDUSTRIAL EN UN REACTOR DE CELULAS DE Acetobacter sp. INMOVILIZADAS SOBRE PIEDRA POMEZ."



TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

JOSE EDUARDO FIGUEROA GARCIA  
GUADALUPE CONCEPCION ORTIZ MEJIA  
TANIA TORRES RIVERA

15100992/15100992

PARA OPTAR AL TITULO DE:  
INGENIERO QUIMICO

JUNIO DE 1994

SAN SALVADOR EL SALVADOR CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA  
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA

TRABAJO DE GRADUACION PREVIO A LA OPCION AL TITULO DE

INGENIERO QUIMICO

"PRUEBAS DE ESCALAMIENTO DEL PROCESO DE PRODUCCION DE ACIDO  
ACETICO A PARTIR DE ALCOHOL ETILICO INDUSTRIAL EN UN REACTOR DE  
CELULAS DE Acetobacter sp. INMOVILIZADAS SOBRE PIEDRA POMEZ".


PRESENTADO POR:

JOSE EDUARDO FIGUEROA GARCIA

GUADALUPE CONCEPCION ORTIZ MEJIA

TANIA TORRES RIVERA

TRABAJO DE GRADUACION APROBADO POR:



*Elvia Berenice Huez de Oliva*  
Dra. ELVIA BERENICE HUEZO DE OLIVA

*Delmy Del Carmen Rico Pena*  
ASESORA: M. Sc. DELMY DEL CARMEN RICO PENA

SAN SALVADOR, JUNIO DE 1994

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR



RECTOR : DR. FABIO CASTILLO FIGUEROA

SECRETARIO GENERAL : LIC. MIRNA ANTONIETA PERLA DE ANAYA

FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA

DECANO : ING. JOAQUIN ALBERTO VANEGAS AGUILAR

SECRETARIO : ING. JOSE RIGOBERTO MURILLO CAMPOS

ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA



DIRECTORA

M. Sc. DELMY DEL CARMEN RICO PEÑA

## AGRADECIMIENTOS

Con sinceridad expresamos nuestros agradecimientos a todas las personas que de una u otra forma han colaborado para hacer posible el presente trabajo de graduación.

DRA. ELVIA BERENICE HUEZO DE OLIVA Y M. Sc. DELMY DEL CARMEN RICO PEÑA. Coordinadora y Asesora del Trabajo de Graduación.

LIC. VICTOR MANUEL SEGURA LEMUS e ING. EUGENIA S. GAMERO. Catedráticos de la Universidad de El Salvador.

ING. LUIS AGUILAR. Gerente de Producción de Destilería Salvadoreña.

ING. RODOLFO TREMINIO. Jefe del Departamento de Producción de Destilería Salvadoreña.

ING. LUIS PORTILLO. Jefe del Centro de Investigaciones y Aplicaciones Nucleares de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura.

ING. ANTONIO MATUS. Catedrático del Centro Investigaciones y Aplicaciones Nucleares de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura.

FAMILIA GARCIA PAREDES.

ING. ITALO ANDRES CORDOVA. Catedrático de la Universidad de El Salvador.

A nuestros familiares muy especialmente.

A todos los compañeros y amigos de la Escuela de Ingeniería Química.

## DEDICATORIA

- A DIOS TODOPODEROSO : Porque la meta alcanzada es para su gloria, por su paciencia y proporcionarme serenidad en todo momento.
- A MIS PADRES : Rafael y Gloria Alicia, por su comprensión, amor y sacrificio brindados en todo momento.
- A MIS HERMANOS : Rafael, Patricia y Luis, por su cariño y apoyo.
- A MIS COMPAÑERAS : Guadalupe y Tania, por aguantar hasta el final de este tormento.
- A MIS AMIGOS : A los antiguos y a los nuevos que aparecieron durante el tiempo que llevó realizar este trabajo,  
GRACIAS.

JOSE EDUARDO FIGUEROA

## DEDICATORIA

*"Acuérdate de tu creador en los días de tu juventud".*

*Ec 12:1*

- A DIOS TODOPODEROSO** : Quien siempre está presente en cada momento de mi vida y me da lo necesario para llevar a buen fin, como en esta ocasión, cada empresa. Bendito por siempre Señor.
- A MIS ABUELOS** : Gonzalo, que en paz descance, y a mi lolita, con igual amor al que ella me ha dado durante tanto tiempo. Una super abuela.
- A MIS PADRES** : Luis Alonso y a Josefa en especial, porque es debido en gran parte a su esfuerzo, sacrificio y amor de madre que he logrado esta meta. **TE QUIERO MUCHO.**
- A MIS HERMANOS** : Tita, Nena, Benjamin y Chalo, por el amor y el aguante que me tienen. Ustedes son muy importantes en mi vida.

**A MIS SOBRINOS** : Andrea, Dámaris y Adolfo; pedacitos de enorme ternura que hacen la vida tan alegre. Son mi mayor encanto.

**A LA FAMILIA**

**RIVERA MEJIA** : Por el apoyo y cariño que me brindan. Muchas gracias.

**A MIS AMIGAS** : Sarita y Beatriz, por la amistad tan especial que cultivamos, que será para siempre y que me ha ayudado a superar tantos obstáculos. Las admiro.

**A MIS COMPAÑEROS** : Tania y Eduardo, por todos los momentos compartidos que nos hicieron preocuparnos, desvelarnos y también divertirnos. Los aprecio mucho.

**A LA FAMILIA**

**GARCIA PAREDES** : Por todas las amabilidades que nos dispensaron a los tres y por el acogimiento que he tenido entre ustedes. Dios les bendiga.

**A LAS ASESORAS** : Dra. Elvia Berenice Huevo de Oliva e Ing. Delmy del Carmen Rico Peña, quienes con sus conocimientos nos impulsaron a esforzarnos hasta el último momento para alcanzar el final de esta meta. Mis respetos.

**A LA MARA DE LA PLANTA PILOTO** : En especial Alicia y Giovy, y a todos los que fueron parte de este esfuerzo, con quienes hemos compartido tantos años de estudios, diversión, desvelos, diversión, trabajo, diversión.....

**A LOS AMIGOS DE SIEMPRE** : Sonia, Ceci, Julio y Edwin; con cariño.

Y a todos los que no han sido mencionados por falta de espacio, gracias hasta por el más mínimo detalle.

*Fíate del Señor de todo tu corazón, y no te apoyes de tu propia prudencia. Reconócelo en todos tus caminos y El enderezará todas tus veredas.*

*Prov. 3:5-6*

**Guadalupe C. Ortiz M.**



## DEDICATORIA

"MIRA QUE TE MANDO QUE TE ESFUERCES Y SEAS VALIENTE; NO TEMAS NI DESMAYES, PORQUE JEHOVA TU DIOS ESTARA CONTIGO DONDE QUIERA QUE TU VAYAS"

JOSUE, 1:9

"MAS TU, JEHOVA, ERES ESCUDO ALREDEDOR DE MI; MI GLORIA Y EL QUE LEVANTA MI CABEZA. COM MI VOZ CLAME A JEHOVA, Y EL ME RESPONDIO DESDE SU MONTE SANTO"

SALMOS, 3:3-4

Sería una pesadilla mencionar a tantas personas en mi dedicatoria y cometer la torpeza de olvidar a alguien, así que para evitar errores de esta naturaleza.....

Quiero dedicar este trabajo a todas las personas que Dios ha puesto en mi camino para que me brinden la energía y la alegría de vivir através de amor, comprensión, apoyo, amistad, alegrías, enseñanzas y grandes experiencias.

A todos gracias, y elevo oraciones para que Dios los bendiga durante todo su camino.

TIB.

## RESUMEN

El desarrollo de procesos biotecnológicos con la aplicación de sistemas de células inmovilizadas, como es el caso de esta investigación, referida a la producción de ácido acético a partir de alcohol etílico industrial en un lecho de piedra pómez con células inmovilizadas de *Acetobacter sp.*, constituyen alternativas que ameritan ser investigadas para el desarrollo tecnológico de El Salvador.

Este proyecto se enfocó a la realización de pruebas de escalamiento del proceso de producción de ácido acético que fué iniciado en esta escuela por Díaz y Díaz en 1991; para lo cual se construyó un acetador con capacidad total de 23 litros; usando como material de soporte piedra pómez de 2.54 a 3.81 cm de diámetro, previamente tratada con ácido clorhídrico para eliminar sustancias inhibitoras de la bacteria acética tales como cobre, hierro y zinc.

Se trabajó con dos cepas productoras de ácido acético: *Acetobacter sp.* con acostumbramientos hasta la concentración de 12% v/v de etanol, y *Acetobacter pasteurianum* con acostumbramientos a la concentración máxima de 9% v/v de etanol. La cepa de *Acetobacter sp.* fue aislada del medio ambiente a partir de vinagre de piña y la de *Acetobacter pasteurianum* fue adquirida de cepas comerciales disponibles en el mercado.

Para definir la capacidad de aireación del equipo construído se calculó el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $klac^*$ ) por el método de oxidación del sulfito de sodio, resultando que el equipo permite un  $klac^*$  máximo promedio de 0.3851 milimoles

de oxígeno/litro-minuto, correspondiente a un flujo de aire de 9.46 L/min.

Se efectuaron dos pruebas preliminares al proceso de acetificación en el reactor construido, con el objetivo de determinar: especie de cepa bacteriana a utilizar y el medio y concentración de etanol en el que mejor se desarrolla la bacteria; resultando que la bacteria que mejor se adaptó al medio de trabajo fue la de *Acetobacter sp.*, a una concentración de alcohol etílico del 7% v/v la cuál dió una producción máxima de ácido acético de 5% p/v en 30 días de proceso.

Utilizando los resultados de las pruebas preliminares, se procedió a evaluar la producción de acidez en función del tiempo en el acetador, efectuándose tres pruebas: en la primera prueba se utilizó un flujo de aire de 5.39 L/min, volumen total de medio de 10 litros y concentración inicial de etanol de 7% v/v; se partió con una acidez de 1.89% p/v alcanzándose después de 4 días de proceso una acidez de 3.35% p/v y un rendimiento final de 21.49 g de ácido acético por 100 ml de etanol alimentado.

En la segunda prueba se usó un flujo de aire de 4.02 L/min, volumen total de medio de 10 litros y concentración inicial de etanol de 7% v/v. Se partió con 0.85% p/v de acidez, alcanzándose al cabo de 7 días de proceso una acidez de 3.12% p/v y un rendimiento final de 30.66 g de ácido acético por 100 ml de etanol alimentado.

La tercera prueba de monitoreo se realizó con flujo de aire de 4.02 L/min, volumen total de medio de 10 litros y concentración inicial de etanol de 5% v/v completándose el 7% al quinto día de

proceso. Se partió con una acidez de 1.11% p/v, alcanzándose el 4.15% p/v después de 10 días de proceso. El rendimiento final fué de 43.40 g de ácido acético por 100 ml de etanol alimentado.

Los resultados acá expuestos, quedan como base para efectuar pruebas de optimización del proceso en la que se incluya el estudio del efecto del nivel de flujo de aire, diámetro y tratamiento de la piedra pómez, condiciones de adición de etanol al proceso, tiempo de proceso y medio de trabajo más adecuado para la bacteria acética.

## INDICE

CONTENIDO	Pág.
INDICE DE FIGURAS .....	i
INDICE DE TABLAS .....	iii
INTRODUCCION .....	1
1.0 ACIDO ACETICO .....	3
1.1 USOS Y DEMANDA DE ACIDO ACETICO .....	4
1.2 DISPONIBILIDAD DE ALCOHOL ETILICO EN EL SALVADOR..	5
2.0 BACTERIA DEL GENERO ACETOBACTER .....	7
3.0 SISTEMAS DE INMOVILIZACION DE CELULAS .....	13
3.1 METODOS DE INMOVILIZACION DE CELULAS.....	14
3.2 MEDIOS DE SOPORTE PARA LA INMOVILIZACION DE CELULAS POR EL METODO DE SOPORTE ENLAZANTE.....	15
3.3 MATERIALES DE CONSTRUCCION DE LA TORRE DE LECHO EMPACADO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO ACETICO.....	17
4.0 DISEÑO Y CONSTRUCCION DEL ACETADOR EMPACADO CON PIEDRA POMEZ .....	19
4.1 SELECCION DE MATERIALES DE CONSTRUCCION DE LA TORRE DE ACETIFICACION EMPACADA CON PIEDRA POMEZ..	19
4.2 MATERIAL DE EMPAQUE Y SU PREPARACION.....	21
4.3 ACCESORIOS DEL EQUIPO DE ACETIFICACION.....	22
4.4 EVALUACION DE PARAMETROS DE DISEÑO DEL EQUIPO DE ACETIFICACION.....	23
4.4.1 POROSIDAD DE LECHO EMPACADO.....	26

4.4.2 COEFICIENTE VOLUMETRICO DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO.....	28
5.0 TECNICAS EMPLEADAS PARA LA PRODUCCION DE ACIDO ACETICO CON CELULAS DE <i>Acetobacter sp</i> SOBRE PIEDRA POMEZ .....	39
5.1 ETAPA DE ACOSTUMBRAMIENTO DE LAS BACTERIAS ACETICAS DEL GENERO ACETOBACTER, AL PROCESO DE PRODUCCION DE ACIDO ACETICO.....	43
5.2 EVALUACION DEL EFECTO DE LA COMPOSICION DE SUSTRATO, CONCENTRACION DE ETANOL Y NIVEL DE AIREACION SOBRE LA PRODUCCION DE ACIDO ACETICO CON CELULAS INMOVILIZADAS DE <i>Acetobacter sp</i> .....	44
5.2.1 PRUEBAS DE ACETIFICACION PARA VOLUMENES DE MEDIO DE CULTIVO DE 250 Y 400 ml.....	46
5.3 PRUEBAS DE ACETIFICACION A ESCALA DE 10 L DE MEDIO DE CULTIVO, UTILIZANDO EL ACETADOR CONSTRUIDO DE 23 LITROS EMPACADO CON PIEDRA POMEZ.....	53
5.3.1 PREPARACION DEL SISTEMA DE ACETIFICACION ...	55
5.3.2 CRECIMIENTO DEL INOCULO .....	56
5.3.3 PRUEBAS DE ACETIFICACION .....	56
5.4 EVALUACION DE RENDIMIENTOS DE LAS PRUEBAS DE ACETIFICACION EN EL REACTOR DE 23 LITROS DE CAPACIDAD, USANDO BACTERIAS DE <i>Acetobacter sp</i> Y PIEDRA POMEZ COMO MATERIAL DE SOPORTE.....	64
6.0 OBSERVACIONES .....	69
7.0 CONCLUSIONES .....	72

8.0 RECOMENDACIONES .....	74
9.0 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	76
APENDICES .....	78
APENDICE A: ANALISIS DE CALIDAD PARA VINAGRES .....	79
APENDICE B: MATERIALES DE CONSTRUCCION PARA PROCESOS DE ACETIFICACION .....	83
APENDICE C: DETALLE DE LAS PARTES COMPONENTES DEL EQUIPO DE ACETIFICACION.....	93
APENDICE D: ANALISIS DE PIEDRA POMEZ UTILIZADA COMO MEDIO DE SOPORTE PARA LAS BACTERIAS ACETICAS.....	99
APENDICE E: CALIBRACION DE ROTAMETRO UTILIZADO PARA MEDIR EL NIVEL DE AIREACION INTRODUCIDO AL PROCESO DE ACETIFICACION EN EL REACTOR DE 23 LITROS...	104
APENDICE F: DETERMINACION DEL $klac^*$ POR EL METODO DEL SULFITO DE SODIO .....	107
APENDICE G: DETERMINACION DEL CONTENIDO DEL ACIDO ACETICO	116
APENDICE H: DETERMINACION DE ALCOHOL ETILICO POR DESTILACION .....	117
APENDICE I: PLANTEAMIENTO DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA OPTIMIZACION DEL PROCESO DE PRODUCCION DE ACIDO ACETICO A PARTIR DE ALCOHOL ETILICO INDUSTRIAL .....	119
APENDICE J: COSTOS INVOLUCRADOS EN LA ELABORACION DEL PROYECTO.....	125

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
4.1 EQUIPO DE ACETIFICACION CONSTRUIDO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO ACETICO A PARTIR DE ALCOHOL ETILICO INDUSTRIAL UTILIZANDO UN SISTEMA DE CELULAS DE <i>Acetobacter sp.</i> INMOVILIZADAS SOBRE PIEDRA POMEZ.....	20
4.2 SISTEMA UTILIZADO PARA SOLUBILIZAR METALES TOXICOS PARA LA BACTERIA ACETICA.....	23
4.3 COMPORTAMIENTO DEL $k_{lac}^*$ OBTENIDO POR CORRELACION LINEAL EN FUNCION DEL FLUJO DE AIRE, PARA EL REACTOR EMPACADO CON PIEDRA POMEZ DE 23 LITROS DE CAPACIDAD, UTILIZADO EN LA PRODUCCION DE ACIDO ACETICO.....	37
4.4 COMPORTAMIENTO DEL $k_{lac}^*$ OBTENIDO POR METODO ANALITICO EN FUNCION DEL FLUJO DE AIRE, PARA EL REACTOR EMPACADO CON PIEDRA POMEZ DE 23 LITROS DE CAPACIDAD, UTILIZADO EN LA PRODUCCION DE ACIDO ACETICO.....	38
5.1 FOTOMICROGRAFIA DE <i>Acetobacter sp.</i> AISLADA DE JUGO FERMENTADO DE PIÑA. AUMENTO 100x12.5 .....	41
5.2 FOTOMICROGRAFIA DE <i>Acetobacter sp.</i> AISLADA DE JUGO FERMENTADO DE PIÑA. AUMENTO 100x8 .....	42
5.3 SISTEMAS DE ACETIFICACION UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS CON 250 ml DE MEDIO DE CULTIVO, UTILIZANDO BACTERIAS DE <i>Acetobacter sp</i> Y PIEDRA POMEZ COMO MATERIAL DE SOPORTE.....	47



5.4	COMPORTAMIENTO DE LA ACIDEZ EN FUNCION DEL TIEMPO DE LA PRUEBA DE ACETIFICACION PARA 250 ml DE MEDIO DE CULTIVO, UTILIZANDO BACTERIAS DE <i>Acetobacter sp</i> Y PIEDRA POMEZ COMO MATERIAL DE SOPORTE.....	50
5.5	SISTEMAS DE ACETIFICACION UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS CON 400 ml DE MEDIO DE CULTIVO, UTILIZANDO BACTERIAS DE <i>Acetobacter sp</i> Y PIEDRA POMEZ COMO MATERIAL DE SOPORTE.....	51
5.6	COMPORTAMIENTO DE LA ACIDEZ EN FUNCION DEL TIEMPO DE LA PRUEBA DE ACETIFICACION PARA 250 ml DE MEDIO DE CULTIVO, UTILIZANDO BACTERIAS DE <i>Acetobacter sp</i> Y PIEDRA POMEZ COMO MATERIAL DE SOPORTE.....	54
5.7	COMPORTAMIENTO DE LA ACIDEZ EN FUNCION DEL TIEMPO DURANTE EL CRECIMIENTO DEL INOCULO EN EL REACTOR DE 23 LITROS USANDO BACTERIAS DE <i>Acetobacter sp</i> INMOVILIZADAS SOBRE PIEDRA POMEZ.....	58
5.8	RESULTADOS DE LA PRODUCCION DE ACIDEZ EN FUNCION DEL TIEMPO DE LAS PRUEBAS DE ACETIFICACION EN EL ACETADOR DE 23 LITROS DE CAPACIDAD EMPACADO CON PIEDRA POMEZ...	63
5.9	COMPORTAMIENTO DEL RENDIMIENTO EN ACIDO ACETICO EN FUNCION DEL TIEMPO PARA LAS PRUEBAS DE ACETIFICACION EN EL REACTOR DE 23 LITROS USANDO BACTERIAS DE <i>Acetobacter sp</i> Y PIEDRA POMEZ COMO MATERIAL DE SOPORTE.....	67

## INDICE DE TABLAS

	Pág.
1.1 COSTOS Y VOLUMENES DE IMPORTACION DE SOLUCIONES ACUOSAS DE ACIDO ACETICO PARA VINAGRES Y SUCEDANEOS COMESTIBLES DURANTE EL PERIODO 1989-1993 .....	5
1.2 PRODUCCION Y EXPORTACION DE ALCOHOL ETILICO PARA LA DESTILERIA SALVADOREÑA, PERIODO 1992-1994.....	6
2.1 CARACTERISTICAS DE DIFERENCIACION DE LOS GENEROS <i>Gluconobacter</i> Y <i>Acetobacter</i> .....	9
2.2 CARACTERISTICAS DE DIFERENCIACION DE ESPECIES Y SUBESPECIES DEL GENERO <i>Acetobacter</i> .....	10
2.3 CUADRO RESUMEN DE CARACTERISTICAS DE IDENTIFICACION DE BACTERIAS ACETICAS.....	11
4.1 ESPECIFICACIONES DEL EQUIPO DE ACETIFICACION CONSTRUIDO CON CAPACIDAD PARA 23 LITROS DE CARGA TOTAL.....	24
4.2 DIMENSIONAMIENTO Y PARAMETROS DE OPERACION DE ACCESORIOS DE LA TORRE DE ACETIFICACION.....	25
4.3 VALORES DEL $k_{lac}$ * OBTENIDOS PARA EL EQUIPO DE ACETIFI- CACION POR EL METODO DEL SULFITO DE SODIO POR EVALUA- CION ANALITICA Y DE CORRELACION.....	36
5.1 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE IDENTIFICACION DE LA BACTERIA ACETICA AISLADA DEL GENERO <i>Acetobacter</i> .....	43

5.2	COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN EL PROCESO DE ACETIFICACION CON BACTERIAS DEL GENERO <i>Acetobacter</i> .....	45
5.3	RESULTADOS DE PRUEBA DE ACETIFICACION CON <i>Acetobacter sp</i> PARA 250 ml DE MEDIO DE CULTIVO Y PIEDRA POMEZ COMO MATERIAL DE SOPORTE.....	49
5.4	RESULTADOS DE PRUEBA DE ACETIFICACION CON <i>Acetobacter sp</i> PARA 400 ml DE MEDIO DE CULTIVO Y PIEDRA POMEZ COMO MATERIAL DE SOPORTE.....	53
5.5	ESPECIFICACIONES DEL CRECIMIENTO DEL INOCULO INICIADOR DEL PROCESO DE ACETIFICACION .....	57
5.6	CONDICIONES DE TRABAJO DE LAS PRUEBAS DE ACETIFICACION EN EL REACTOR DE 23 LITROS DE CAPACIDAD, UTILIZANDO BACTERIAS DE <i>Acetobacter sp</i> Y PIEDRA POMEZ COMO MATERIAL DE SOPORTE .....	62
5.7	EVALUACION DE RENDIMIENTOS DE LAS PRUEBAS DE ACETIFICACION EN EL REACTOR 23 LITROS DE CAPACIDAD, UTILIZANDO BACTERIAS DE <i>Acetobacter sp</i> Y PIEDRA POMEZ COMO MATERIAL DE SOPORTE .....	66
5.8	GRADO DE UTILIZACION DE ETANOL DE LAS PRUEBAS DE ACETIFICACION EN EL REACTOR 23 LITROS DE CAPACIDAD, UTILIZANDO BACTERIAS DE <i>Acetobacter sp</i> Y PIEDRA POMEZ COMO MATERIAL DE SOPORTE .....	68

## INTRODUCCION

Muchas industrias en El Salvador utilizan ácido acético como materia prima en sus procesos, todo ése ácido acético es importado debido a que no se produce internamente, con la consecuente fuga de divisas. Como una alternativa de solución a este problema, se plantea el uso de una tecnología propia como lo es la producción de ácido acético a partir de alcohol etílico industrial utilizando células de *Acetobacter sp* inmovilizadas sobre piedra pómez. Para este estudio se partió de la investigación de factibilidad del proceso presentado por Díaz y Díaz que enfoca la producción de ácido acético en un sistema con células inmovilizadas de *Acetobacter sp* en un lecho de piedra pómez y tusa, sin llegar a la optimización del mismo.

El objetivo principal de este trabajo lo constituye la realización de pruebas de escalamiento del proceso de producción de ácido acético a partir de alcohol etílico industrial utilizando un sistema de bacterias acéticas inmovilizadas sobre piedra pómez.

Como objetivos específicos se plantean, el diseño y construcción de un acetador apropiado al proceso y la identificación del efecto y rangos de variación significativos de las siguientes variables: Composición de sustrato, concentración de etanol, flujo de aire y tiempo de proceso.

La producción de ácido acético a partir de alcohol etílico industrial en un sistema de bacterias acéticas inmovilizadas sobre piedra pómez, es un proceso que plantea una alternativa biotecnológica que puede ser factible de llevarse a cabo en El Salvador, par-

tiendo de que la materia prima y recursos naturales requeridos, como lo son el alcohol etílico y la piedra pómez, se encuentran a disponibilidad en el mercado y territorio nacional.

La piedra pómez es un recurso natural muy abundante en El Salvador, que puede ser utilizado como material de relleno para inmobilizar células, lo que genera una alternativa de aprovechamiento para este recurso.

Las etapas que comprende el desarrollo de esta investigación son las siguientes: revisión bibliográfica, diseño y construcción de un equipo de acetificación, aislamiento y/o adquisición de cepas que realicen la transformación oxidativa de etanol a ácido acético, el acostumbramiento de las cepas a diferentes concentraciones de etanol en el medio y al material de soporte, la realización de pruebas de identificación del efecto y los rangos de variación de diversas variables sobre el proceso, realización de pruebas de acetificación en el equipo construido y evaluación del rendimiento del proceso.

El seguimiento de las pruebas a nivel de laboratorio y en el equipo construido se llevó a cabo por el control de variación de la acidez (como ácido acético) en función del tiempo.

## 1.0 ACIDO ACETICO

El ácido acético (ácido etanoico)  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , es un líquido incoloro de olor picante; el ácido puro se denomina ácido acético glacial, por el aspecto de los cristales parecido al hielo, es muy irritante si no se quita rápidamente por lavado (Kirk et. al., 1966).

El contenido de ácido acético determina la fuerza del vinagre expresado como grano de fuerza<sup>1</sup>. El grano de fuerza es igual a diez veces el contenido de ácido acético; 60 granos de vinagre por ejemplo es una solución que contiene 6% de ácido acético, y una solución de 120 granos de vinagre tiene 12% de ácido acético. El vinagre se puede concentrar destilando hasta obtener la fuerza deseada (Kirk et. al., 1966).

Gran parte de la producción del vinagre comercial se basa en la oxidación bacteriológica y se realiza bajo condiciones controladas, usando cepas de bacterias específicas de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Estos organismos producen ácido acético por la oxidación del alcohol obtenido de la fermentación de gran cantidad de sustratos (Kirk et. al., 1966).

Los métodos de producción de ácido acético más aplicados son: Oxidación bacteriológica de alcohol etílico, Destilación de la madera y Oxidación catalítica de alcohol etílico (Kirk et. al., 1966).

Entre los métodos de oxidación de alcohol etílico se encuen-

---

<sup>1</sup>Grano de fuerza: vinagre que contiene 0.1 g de ácido acético en 100 ml a 20 °C.

tra el proceso del generador Frings. En un generador Frings grande, para un lote de 2,500 gal (9,463 L) de mezcla, conteniendo 10.5 % de etanol, 1% de ácido acético y 3.175 g de acetopep<sup>2</sup>, inoculado con cepa mixta de *Acetobacter*, se necesitan de tres a cinco días para alcanzar una concentración de 10.5% de ácido acético. En éste método el crecimiento bacteriano se logra en un lapso de 14 a 21 días; la producción de ácido acético por medio de la oxidación bacteriológica de etanol es conveniente hasta la capacidad 10 ton/día (Kirk et. al.,1966).

#### 1.1 USOS Y DEMANDA DE ACIDO ACETICO

) El ácido acético detiene la fermentación aeróbica y anaeróbica en los alimentos y es muy usual como preservante en encurtidos, pescado y carnes. Otras aplicaciones de importancia industrial son: coagulante del látex de caucho, detenedor en fotografía, ácido para la fabricación de sustancias químicas orgánicas, tratamiento de textiles, fuente del grupo acetilo para numerosos derivados orgánicos, etc. (Kirk et. al.,1966). Dependiendo del uso al que se destine, el ácido acético debe cumplir ciertos requisitos de calidad, los cuales se presentan en el apéndice A. |

El amplio uso del ácido acético por diversas industrias, hace importante el desarrollo e implementación de tecnologías apropiadas para su producción. En El Salvador, esto constituye

---

<sup>2</sup>Mezcla nutritiva comercial para cepas de *Acetobacter*.

un hecho de gran importancia, ya que todo el ácido acético consumido es un producto que demanda costos de importación que se han incrementado en los dos últimos años, tal como puede observarse en la tabla 1.1, en la que se presentan volúmenes y costos de importación para el ácido acético, durante el período 1989-1993.

TABLA 1.1  
COSTOS Y VOLUMENES DE IMPORTACION DE SOLUCIONES ACUOSAS DE  
ACIDO ACETICO PARA VINAGRES Y SUCEDANEOS COMESTIBLES,  
DURANTE EL PERIODO 1989-1993

AÑO	VOLUMEN DE CONSUMO (Kg)	COSTO CIF (¢)
1989	67,370	191,565.00
1990	39,915	100,730.00
1991	44,865	131,100.00
1992	59,059	259,192.96
1993	69,567	665,791.86

(Ref. Dirección General de Estadísticas y Censos)

## 1.2 DISPONIBILIDAD DE ALCOHOL ETILICO EN EL SALVADOR

Dos de los métodos de producción de ácido acético se basan en la oxidación bacteriológica ó catalítica del alcohol etílico.

La perspectiva de producir ácido acético a partir de alcohol etílico industrial para implementar una tecnología de producción basada en la oxidación bacteriológica es la de usar una materia prima



disponible de bajo costo y que permita a la vez la diversificación del uso de la caña de azúcar.

La producción de alcohol etílico industrial en El Salvador, está totalmente suplida por dos plantas: Destilería Salvadoreña, con una capacidad instalada de 21 millones de litros de etanol por año; y por la planta destiladora de Ahuachapán que trabaja solamente durante el período de zafra, con una producción anual aproximada de 750 mil litros de etanol.

La tabla 1.2 presenta datos de producción y exportación de alcohol etílico industrial de la Destilería Salvadoreña durante el período 1992-1994<sup>3</sup>. El uso de capacidad instalada de la planta oscila entre el 53 y 86% siendo el nivel de exportación del 10 al 45% lo que permite ver una prioridad por cubrir la demanda nacional.

TABLA 1.2

PRODUCCION Y EXPORTACION DE ALCOHOL ETILICO DE LA  
DESTILERIA SALVADOREÑA DURANTE EL PERIODO 1992-1994

AÑO	PRODUCCION (L/AÑO)	% EXPORTACION
1992	11,000,000	10
1993	17,000,000	40
1994	18,000,000	45

(Ref. Ramirez Treminio, 1994)

<sup>3</sup> La producción para el año 1994 es una proyección estimada por la Destilería Salvadoreña.

## 2.0 BACTERIAS DEL GENERO ACETOBACTER

La propiedad característica de las bacterias acéticas es su capacidad de oxidar el etanol a ácido acético. Este género de microorganismos producen oxidación en un medio ácido (pH de 4.5 o menor) (Defigueiredo y Splittstoesser, 1976).

La bacteria acética incluye dos géneros: *Gluconobacter* y *Acetobacter*, ambos géneros pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae*<sup>4</sup> (Breed et. al. 1974).

Los dos géneros con sus especies pueden sintetizar varios polisacáridos de glucosa y otras azúcares. Cepas de *Acetobacter aceti* subespecie *xilinum* y subespecie de *A. pasteurianum* forman una capa extracelular de celulosa, y cepas de *Gluconobacter oxidans* producen dextranas cuando crecen en medio conteniendo sacarosa y rafinosa (Defigueiredo y Splittstoesser, 1976).

Otra propiedad compartida por las Gluconobacterias y Acetobacterias es su habilidad para oxidar parcialmente una variedad de compuestos a productos que poseen el mismo carbón estructural; por ejemplo, glucosa a ácido glucónico, ácido glucónico a ácido 5-acetoglucónico, manitol a fructuosa, glicerol a dihidroxicetona, y propanol a ácido propiónico. Si bien la célula recibe energía de esta oxidación, el compuesto no sirve como una fuente de energía de carbono para síntesis del material celular (Defigueiredo y Splittstoesser, 1976).

---

<sup>4</sup>Según Buchanan y Gibbons, las gluconobacterias son miembros de la familia *Pseudomonadaceae*, mientras que las acetobacterias no están asignadas a ninguna familia.

Las características de diferenciación entre los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* se presentan en la tabla 2.1 (Breed et. al., 1974).

Las gluconobacterias son células elipsoidales, de 0.6 - 0.8 a 1.5 - 2.0  $\mu\text{m}$ , que se encuentran solas, en pares o en cadenas. Cuando presentan movilidad lo hacen por flagelos polares en número de tres u ocho; raramente presentan un solo flagelo. No forman endosporas, son gramnegativas, raramente se encuentran grampositivas en colonias viejas. Poseen metabolismo respiratorio, siendo el oxígeno el aceptor terminal de electrones. Oxidan el etanol a ácido acético, no oxidan el ácido acético ni el lactato a  $\text{CO}_2$ , su temperatura de crecimiento óptima es de 25 - 30°C y toleran un rango de 7°C a 41°C, aunque algunas no crecen a temperaturas sobre los 37°C. Presentan un pH óptimo de 5.5 - 6.0; el crecimiento de bacterias y la producción de ácido acético se da a pH de 4 - 4.5, el crecimiento en medio alcalino es pobre. Crecen en flores, frutas agrias, vegetales, cerveza, cerveza de sorgo de Africa del Sur, sidra, vino, vinagre de vino, etc. (Breed et. al., 1974).

Las acetobacterias son células elipsoidales que forman bastoncitos, rectos o ligeramente curvos, de 0.6 - 0.8 a 1 - 3  $\mu\text{m}$ , se encuentran solos, en pares o en cadenas. Presentan formas esféricas, elongadas, expandidas, agrupadas en círculos, curvadas, ramificadas o filamentosas. Si tienen movimiento lo efectúan por medio de flagelos peritricos, no forman endosporas. Las células jóvenes son Gramnegativas, en colonias viejas se presentan algunas Gramvariables. En la tabla 2.2 se describen características de diferenciación de

especies y subespecies del género *Acetobacter* y en la tabla 2.3 se muestran algunas pruebas de identificación de las bacterias acéticas. Poseen mecanismo respiratorio, nunca fermentativo, siendo el oxígeno el aceptor terminal de electrones (Breed, et. al. 1974; Jorgensen, 1959).

TABLA 2.1  
 CARACTERISTICAS DE DIFERENCIACION DE LOS GENEROS  
*Gluconobacter* Y *Acetobacter*

	<i>Gluconobacter</i>	<i>Acetobacter</i>
Flagelos	Polar	Peritrico
Crecimiento a pH 4.5	+	+
Oxidación de:		
Etanol a ácido acético a pH 4.5	+ (M) <sup>a</sup>	+ (F)
Acido acético a CO <sub>2</sub>	-	+
Lactato a CO <sub>2</sub>	-	+
Glucosa a gluconato	+	d
Ciclo de Krebs	-	+
Producción de 5-Cetogluconato	+	d
Cetogénesis	+	d
Quinonas:		
Q10	+	-
Q9	-	+
Hidrólisis de:		
Lactosa y Almidones	-	-
Gelatina	- (D)	-
Pigmentos verduzcos y/o fluorescentes	-	-
DNA (%mol G + C)	55-64	60-64

<sup>a</sup> M, moderado; F, fuerte; D, débil

(Ref. Breed, et. al. 1974)

TABLA 2.2  
 CARACTERISTICAS DE DIFERENCIACION DE ESPECIES Y  
 SUBESPECIES DEL GENERO ACETOBACTER

	1. <i>A. aceti</i>				2. <i>A. pasteurianum</i>					3. <i>A. peroxidans</i>
	1a	1b	1c	1d	2a	2b	2c	2d	2e	
Catalasa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-
Cetogénesis en: glicerol o eritritol	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	-	-
Formación de: 5-Cetogluconato	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-
2-Cetogluconato	(+)	(+)	(+)	(+)	d	-	-	-	-	-
Gluconato	+	+	+	+	(+)	+	+	-	-	-
Crecimiento en etanol <sup>c</sup>	+	-	(-)	+	(-)	+	+	-	-	+
Producción de: celulosa	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
τ -pirona	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
pigmento café	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
DNA (%mol G + C)	59-65 63	60-61 64	62-		55-62 55-56			62		61-64

1a: subsp. *aceti*; 1b: subsp. *orleanensis*; 1c: subsp. *xilinum*; 1d: subsp. *liquefaciens*

2a: subsp. *pasteurianum*; 2b: subsp. *lovanensis*; 2c: subsp. *estunensis*; 2d: subsp. *ascendens*; 2e: subsp. *paradoxus*.

<sup>a</sup> Moderadamente fuerte.

<sup>b</sup> Negativo o muy cambiante; () Usualmente positivo o negativo.

<sup>c</sup> En medio Hoyer-Frateur: Etanol, 3% v/v; sulfato de amonio, 0.1%; fosfato diácido de potasio, 0.09%; sulfato de magnesio heptahidratado, 0.05%; cloruro férrico, 0.0005%.

(Ref. Breed, et. al, 1974)

TABLA 2.3

## CUADRO RESUMEN DE PRUEBAS DE IDENTIFICACION DE BACTERIAS ACETICAS

Especie Bacteriana	Formación de película	Reptación de la película por las paredes de vidrio	Coloración por el yodo	Enturbiamiento del líquido	Formas celulares hipertróficas
1. <i>A. oxidans</i>	muy tenue	++	-	+++	+++
<i>A. industrium</i>	gruesa	-	-	+++	+
2. <i>A. aceti</i>	bastante gruesa	-	-	-	+
<i>A. pasteurianum</i>	casi siempre buena	-	+	-	muy fuertes
<i>A. kuetzinganum</i>	bastante delgada	++	+	++	raras
<i>A. acetosum</i>	en forma de levadura de la flor	escasa	-	-	+
<i>A. rancens</i>	seca, rugosa	+	-	muy escaso	+
<i>Thermobact. aceti</i>	muy tenue	++	-	+++	++
3. <i>A. xilinoïdis</i>	desde gruesa hasta coriácea	-	+	-	-
<i>A. orleanensis</i>	potente	-	-	-	+
<i>A. xilinum</i>	resistente, gruesa, coriácea	-	-	-	-
<i>A. ascendens</i>	tenue, uniforme	+++	-	+++	muy fuertes
4. <i>A. acetigenum</i>	delgada, continúa	-	+	+	raras
<i>A. schuetzenbachii</i>	floja, escasa	-	-	+	-
<i>A. curvum</i>	floja, escasa	-	-	+	-

(Ref. Jorgensen, 1951)

TABLA 2.3

CUADRO RESUMEN DE PRUEBAS DE IDENTIFICACION DE BACTERIAS ACETICAS  
(continuación)

Especie Bacteriana	Novilidad	Temperatura (°C)		Concentración alcohólica máxima en la cual todavía se produce desarrollo y crecimiento (en % de vol)	Cantidad máxima de ácido acético formado (%)
		Optima	Máxima		
1. <i>A. oxidans</i>	+	18-21	30-33	7	casi 2
<i>A. industrium</i>	+	23	35	6-7	2.7
2. <i>A. aceti</i>	-	34	42	11	6.6
<i>A. pasteurianum</i>	-	34	42	9.5	6.2
<i>A. kuetszinganum</i>	-	34	42	9.5	6.6
<i>A. acetosum</i>	-	28	36	11	6.6
<i>A. rancens</i>	-	-	-	-	-
<i>Termobact. aceti</i>	+	-	-	9	6
3. <i>A. xilinoidis</i>	-	28	35	-	-
<i>A. orleanensis</i>	-	30	35-36	-	-
<i>A. xilinum</i>	-	26-33	34	6-7	4.5
<i>A. ascendens</i>	-	31	44	12	9
4. <i>A. acetigenum</i>	+	33	-	7	casi 4
<i>A. schuetzenbachii</i>	-	23-27	31-35	-	11.5
<i>A. curvum</i>	-	30	casi 38	-	-

(Ref. Jorgensen, 1951)

### 3.0 SISTEMAS DE INMOVILIZACION DE CELULAS

Puesto que los procesos tanto químicos como microbiológicos giran en torno al reactor, uno de los factores más importantes para determinar la economía general del proceso es el diseño del mismo, contrariamente a lo que sucede con el equipo para procesos de transferencia de masa y calor, no existe ningún método directo para diseñar equipos en los que se pueda desarrollar una reacción química o bien un proceso microbiológico. Esto se debe a que el diseño de un reactor está regido primordialmente por el sistema específico del que se trate (Bailey & Ollis, 1986).

Muchos compuestos químicos útiles, especialmente aquellos producidos por procesos microbiológicos de oxidación y/o fermentación, tales como alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos, antibióticos, esteroides y enzimas, son usualmente formados por reacciones multi-etapas catalizadas con muchas clases de enzimas producidas por células vivas. Esta biocatálisis puede realizarse a través de sistemas de inmovilización de células, que consisten en el "atrapamiento" de las células vivas o en estado creciente, en estructuras de confinamiento o unión que las retienen en una región particular del reactor; dicha inmovilización tiene que ser llevada a cabo dentro de condiciones moderadas para mantener la actividad celular (Chibatta, 1974).

Entre los beneficios que presentan estos sistemas pueden mencionarse: El logro de densidades celulares más grandes, que en sistemas de células suspendidas y la disminución del lavado de células



y del movimiento genético fuera del reactor, lo que permite en algunos casos, la separación continua del producto y la remoción de productos inhibidores de la reacción (Bailey & Ollis, 1986).

### 3.1 METODOS DE INMOVILIZACION DE CELULAS

Los métodos de inmovilización de células pueden clasificarse en tres tipos (Chibatta, 1974): a) Método de entrapamiento; b) Método de enlazamiento cruzado y c) Método de soporte-enlazante.

En el método de entrapamiento, las células son atrapadas directamente en las matrices de un polímero; el cual puede ser sintético (policramida, cloruro de polivinilo, poliuretano) o natural (alginato de calcio, K-carragenina, agar, colágeno y gelatina). En el método de enlazamiento cruzado, las células de microorganismos son inmovilizadas por enlazamiento cruzado utilizando reactivos bifuncionales como el glutaraldehído o el toluentiocianato (Chibatta, 1974).

El método de soporte enlazante se basa en el enlace directo de las células del microorganismo al soporte, ya sea por adhesión física o por enlace iónico y/o covalente (Chibatta, 1974).

Dadas las características y demandas de las bacterias productoras de ácido acético, el método de inmovilización más adecuado es el método de soporte enlazante ya que éste presenta sobre los otros las siguientes ventajas (Chibatta, 1974):

- La inmovilización puede ser fácilmente llevada a cabo bajo condiciones suaves.
- La limitación a la transferencia de masa es más pequeña que para el método de entrampamiento.
- Es posible la reutilización del soporte.
- Un gran número de células pueden ser inmovilizadas, usando un soporte con una gran superficie de contacto.

### 3.2 MEDIOS DE SOPORTE PARA LA INMOVILIZACION DE CELULAS

En general puede usarse como material de soporte cualquier material que ofrezca las siguientes características (Bailey & Ollis, 1986):

- a- Proporcionar una superficie interfacial grande entre el gas y el líquido.
- b- Ser químicamente inerte con respecto al medio de cultivo que se está procesando.
- c- No presentar sustancias inhibidoras del crecimiento y metabolismo de las células.
- d- Ser estructuralmente fuerte para permitir el fácil manejo e instalación.
- e- Tener bajo costo.

Entre los materiales de soporte se mencionan (Chibatta, 1974):

- Polisacáridos (celulosa).
- Proteínas (Gelatinas, almidones).
- Oxidos metálicos (zirconio, titanio).
- Polímeros sintéticos (resinas intercambiadoras).
- Materiales inorgánicos (sílica, cerámica).

Para el proceso de producción de ácido acético presentado en esta investigación se seleccionó como material de soporte piedra pómez, ya que presenta características deseables para la inmovilización de las bacterias acéticas (Díaz y Díaz, 1991).

La piedra pómez, está definida como lava volcánica excesivamente celular y vítrea muy porosa, de estructura a veces con cavernas alargadas separadas por paredes delgadas, de color tenue amarillento casi blanca; generalmente de composición riolítica<sup>5</sup>: sílice del 65 al 80% en peso; aluminio del 12 al 15%; óxidos de hierro del 1 al 3% en peso; magnesio, menos del 1%; cal, del 1 al 2%; potasio y sodio del 5 al 8%; se caracteriza por poseer un peso que oscila entre 500 y 1600 Kg/m<sup>3</sup> y además por poseer alta porosidad. Los depósitos de piedra pómez descansan generalmente sobre rocas altamente descompuestas y se encuentran a flor de tierra o a varios metros de profundidad (Cázarez Martel, et. al., 1976; Díaz Hernández, et. al., 1978).

En El Salvador, la piedra pómez se encuentra en abundancia en los alrededores de los centros emisores: volcán de San

---

<sup>5</sup>Término general aplicado a materiales volcánicos que han sido explosivos o aireadamente arrojados por un volcán.

Salvador, lago de Ilopango, lago de Coatepeque; y en la zona oriental en San Miguel y Moncagua (Cazares Martel, et. al., 1976).

Dada la naturaleza aeróbica del proceso de producción de ácido acético por bacterias acéticas, un sistema de células inmovilizadas por el método de soporte enlazante puede ser diseñado como una torre o reactor de lecho empacado, que plantee el uso de un material de empaque en el reactor que sirva de soporte a la bacteria y que proporcione a la vez una gran superficie de contacto gas-líquido necesaria para la transferencia de oxígeno al proceso. Para el caso del reactor de este estudio, en el que se hará uso de piedra pómez como material de soporte, por la composición característica de esta, al utilizarla en la producción de ácido acético se requiere de un tratamiento previo con ácido clorhídrico, con el cual se eliminan por lavado sustancias inhibitoras de la bacteria acética como lo son hierro, cobre y zinc (Díaz y Díaz, 1991).

### 3.3 MATERIALES DE CONSTRUCCION DE TORRES DE LECHO EMPACADO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO ACETICO.

Los accesorios y el cuerpo de la torre de lecho empacado para producir ácido acético por un sistema de inmovilización de bacterias acéticas, deben ser construídos de materiales resistentes al efecto físico y químico de las sustancias y del ambiente que entrará en contacto con los mismos.

Entre los materiales a seleccionar para construir un bio-reactor para este proceso se tienen:

- Madera (Ciprés previamente tratado)
- Metales: Aluminio, aceros inoxidable, hierros con alto porcentaje de silicio, Hastelloy, etc.
- Porcelana química
- Ladrillo a prueba de ácidos
- Vidrio
- Plástico, Teflón
- Metal recubierto de plástico o vidrio, etc.

Mayores detalles de los materiales mencionados se presentan en el apéndice B. En la sección 4.0 se presentan los materiales seleccionados para la construcción del equipo de acetificación utilizado en esta investigación.

#### 4.0 DISEÑO Y CONSTRUCCION DEL ACETADOR EMPACADO CON PIEDRA POMEZ

El equipo construido para el proceso de acetificación es un reactor tubular empacado, de operación discontinua (ver figura 4.1) cuyo diseño estuvo condicionado por la disponibilidad de un tubo de vidrio PYREX de 121 cm de altura y 15.5 cm de diámetro con un volumen total de 23 litros, y que sirvió como cuerpo principal de la torre de acetificación. El equipo constó además de las siguientes partes:

- a) Tanques de recolección y alimentación.
- b) Reactor tubular con piedra pómez como material de soporte.
- c) Sistema de aireación.
- d) Sistema de toma de muestras y de descarga.

En el apéndice C se muestran las partes que componen el equipo de acetificación y sus accesorios.

#### 4.1 SELECCION DE MATERIALES DE CONSTRUCCION DE LA TORRE DE ACETIFICACION EMPACADA CON PIEDRA POMEZ.

En base a las propiedades de los materiales, a la accesibilidad (precio y disponibilidad) y facilidad de trabajo, se seleccionaron los siguientes materiales para la construcción del acetador:

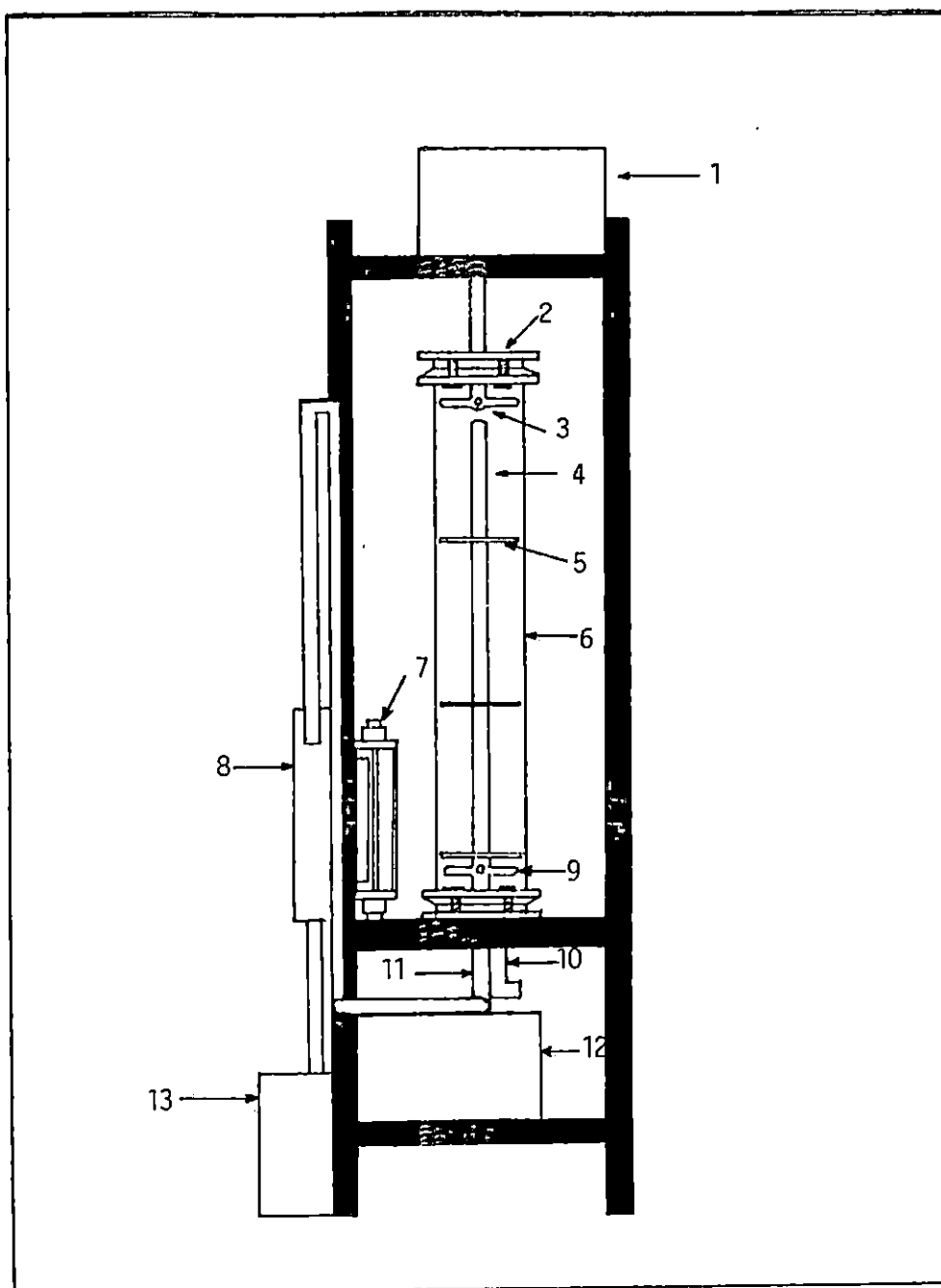


FIGURA 4.1 Equipo de acetificación construido para la producción de ácido acético a partir de alcohol etílico industrial, utilizando un sistema de células de *Acetobacter sp.* inmovilizadas sobre piedra pómez. (1) Tanque superior para alimentación de medio; (2) Tapadera superior de aluminio; (3) Distribuidor de medio líquido; (4) Tubo de soporte central de aluminio; (5) Disco de soporte de piedra pómez; (6) Columna de vidrio pirex; (7) Rotámetro; (8) Filtro de algodón; (9) Distribuidor de aire; (10) Toma de muestra; (11) Entrada de aire estéril; (12) Tanque inferior para descarga de medio; (13) Filtros de lejía y agua estéril.

Aluminio: Usado en los aspersores, tubo central, sujetadores de discos para la piedra pómez y otras piezas que deben estar en contacto prolongado con el ácido acético. Las uniones con rosca fueron recubiertas con teflón, para evitar que partículas de aluminio pudieran depositarse en las soluciones adicionadas a la torre y para evitar fugas.

PVC: Su uso se limitó a accesorios como codos, tés, llaves, válvulas y poco en tuberías debido a la solubilidad del pegamento por el ácido acético, además para minimizar el efecto del ácido sobre el pegamento, se recubrió con teflón la parte externa de la unión del tubo de PVC antes de unirlo con el accesorio correspondiente.

Tanto para el aluminio como para el PVC se realizó una prueba inicial para detectar si éstos materiales serían afectados en alguna medida por el ácido acético. La prueba consistió en dejar piezas de PVC y aluminio en ácido acético durante un mes, comprobando que no hubo ningún efecto apreciable a la vista y al tacto del ácido acético sobre las piezas.

#### 4.2 MATERIAL DE EMPAQUE Y SU PREPARACION

El lecho empacado con piedra pómez de la torre de acetificación contó con una altura útil de 90 cm y con una porosidad máxima de 0.6974 (sección 4.4.1) y el diámetro medio de la piedra pómez osciló entre 2.54 y 3.81 cm.

El análisis mineralógico de la piedra pómez antes y des-



pués del tratamiento con ácido clorhídrico (sección 3.2) se muestra en el apéndice D, donde se tiene que el tratamiento con ácido produjo una reducción por arrastre en los contenidos de hierro, cobre y zinc del 33%, 1.9% y 35% respectivamente.

Para verificar si aún había arrastre de hierro, cobre y zinc presentes en la piedra pómez tratada, por efecto de las soluciones con las cuales estará operando el sistema, como son ácido acético y alcohol etílico, se realizaron pruebas de 36 horas en las que se hicieron pasar mezclas de ácido acético y etanol al 11% v/v sobre el lecho de piedra pómez tratada en un sistema como el mostrado en la figura 4.2; obteniéndose arrastres a los diez días de proceso de 28.13 ppm de Fe, 0.43 ppm de Cu y 3.0 ppm de Zn, que de acuerdo con lo reportado por Díaz y Díaz (1991), están por debajo de los niveles de toxicidad máximos que pueden soportar las bacterias acéticas, los cuales son en partes por millón 15 para cobre, 50 para hierro y 100 para zinc.

#### 4.3 ACCESORIOS DEL EQUIPO DE ACETIFICACION

La aireación al sistema fue proporcionada por un compresor INGERSOLL-RAND de 220 voltios, 2 Hp, 100 psig de descarga máxima con capacidad de tanque para 20 galones. La medición del flujo de aire suministrado por el compresor se hizo a través de un rotámetro SCHUTTE & KOERTING CO. con una graduación de 0 a 250 mm, el cual fue calibrado para medir el flujo en litros/min, de

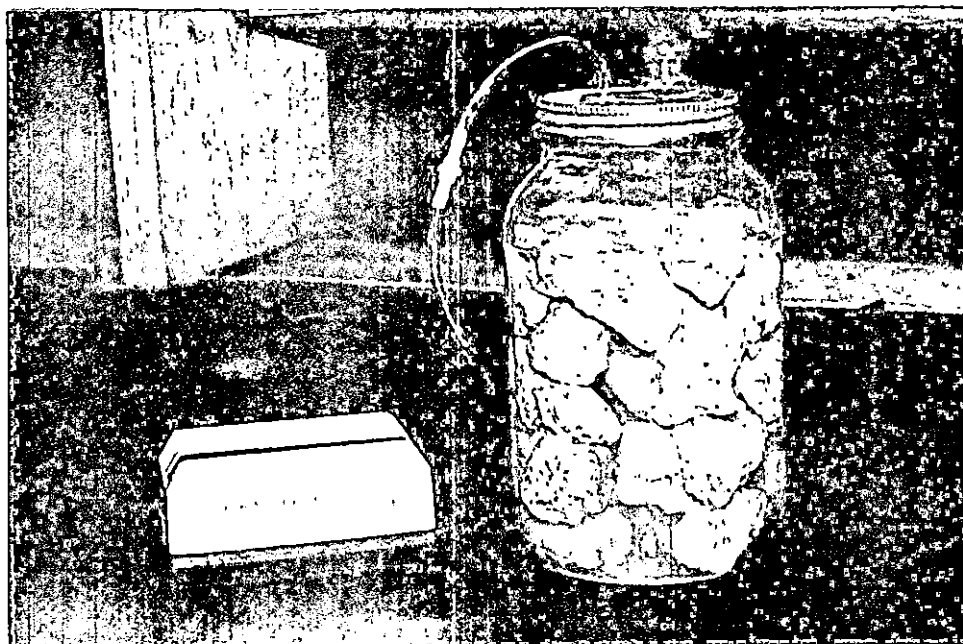


Figura 4.2 Sistema utilizado para solubilizar metales tóxicos para la bacteria acética

acuerdo al método presentado en el apéndice E.

En la tabla 4.1 se describen las dimensiones y materiales de construcción del equipo de acetificación construido, detallándose cada una de las partes que lo constituyen y la tabla 4.2 muestra los parámetros de operación de equipos accesorios de la torre así como también las dimensiones y materiales de su estructura de soporte.

#### 4.4 EVALUACION DE PARAMETROS DE DISEÑO DEL EQUIPO DE ACETIFICACION.

Para el diseño del equipo de acetificación deben evaluarse ciertos parámetros que afectan directamente su funcionamiento.

TABLA 4.1  
 ESPECIFICACIONES DEL EQUIPO DE ACETIFICACION CONSTRUIDO CON  
 CAPACIDAD PARA 23 LITROS DE CARGA TOTAL

DESCRIPCION	DIMENSIONES	MATERIAL DE CONSTRUCCION
Cuerpo de la torre	Altura: 121.5 cm Diámetro interno: 15.5 cm	Vidrio PYREX
Lecho empacado	Altura útil: 90 cm	Piedra Pómez
Tubo central sujetador del lecho	Diámetro externo: 1.27 cm Altura: 110 cm	Aluminio
Aspersores: Aire y Alimentación	Diámetro externo: 0.9 cm Longitud: 6 cm	Aluminio
Tapaderas	Diámetro: 27 cm Espesor: 0.5	Aluminio
Discos de soporte de lecho empacado	Diámetro externo: 15 cm Diámetro de agujeros: 0.7 cm Espesor: 0.6 cm	PVC
Conductos de recirculación y conexión a la bomba	Diámetro: 1.2 cm Longitud: 20 cm (a la bomba) 90 cm (a recirculación)	Plástico
Tubo de toma de muestras	Diámetro interno: 0.5 cm Longitud: 10 cm	PVC
Tanques de carga y descarga	Capacidad: 5 gal	Plástico
Tuberías	Diámetro: ½" ced 40	PVC
Válvulas de paso	Diámetro: ½" ced 40	Plástico
Empaques	Espesor: 0.4 cm Diámetro externo: 17.5 cm Diámetro interno: 15.5 cm	Hule recubierto de teflón
Filtro de algodón	Diámetro: 1½" ced 40 Longitud: 30 cm	PVC
Filtros de lavado	Diámetro: 4" ced 40 Longitud: 40 cm	PVC

TABLA 4.2  
 DIMENSIONAMIENTO Y PARAMETROS DE OPERACION DE  
 ACCESORIOS DE LA TORRE DE ACETIFICACION.

ACCESORIO	ESPECIFICACIONES
Bomba	TEEL PUMP, 115 Volts, 60 Ciclos
Estructura de soporte del acetador	DEXION, 2 m de altura
Base del acetador	Madera, 46.5 x 46.5 x 1.5 cm (Largo x ancho x espesor)
Ventilador	SUPER BOXER FAN, 115 volts, 60 ciclos
Compresor	INGERSOLL-RAND, 220 VOLTS, 2 HP, 100 Psig, capacidad de tanque: 20 gal
Rotámetro	SCHUTTE & KOERTING CO. graduación 0 a 250 mm

to, entre estos podemos mencionar su porosidad, relacionada con la superficie de contacto entre el medio de cultivo y el microorganismo, así como la evaluación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno de la torre y sentar un parámetro básico en el escalamiento del equipo de acetificación.

#### 4.4.1 POROSIDAD DEL LECHO EMPACADO

Para que un reactor de lecho empacado presente características deseables al flujo de fluidos es necesario que el volumen fraccionario,  $\epsilon$ , o fracción de espacio vacío en el lecho empacado sea grande, esta fracción  $\epsilon$  es conocida como porosidad (Treybal, 1988).

La porosidad de un lecho estático depende del tamaño y la distribución de tamaños de las partículas, de la forma de éstas y de la rugosidad de su superficie, del método de empaque y del tamaño del recipiente relacionado al diámetro de las partículas (Mc. Cabe, 1989; Foust, et. al., 1984).

El tamaño de partículas y el tamaño del recipiente, determinan la porosidad. La pared del recipiente, interrumpe la continuidad de los contactos partícula-partícula y por lo tanto forma mayores fracciones vacías cercanas a la pared (Mc. Cabe, 1989; Foust, et. al., 1984).

Siendo la porosidad, la relación volumen vacío a volumen total del lecho, ésta puede calcularse experimentalmente llenando el reactor de lecho empacado con agua, vaciándolo lo y comparando el volumen de agua con el volumen total del lecho calculado a partir de su altura y sección transversal. La porosidad también puede ser calculada a partir de la siguiente ecuación (Mc. Cabe, 1989; Foust, et. al., 1984):

$$\epsilon = \frac{V_T - V_s}{V_T} \quad (4.1)$$

Donde:

$\epsilon$  = porosidad

$V_T$  = volumen total

$V_s$  = volumen de sólidos

La porosidad del acetador se evaluó a partir de la ecuación 4.1, donde el volumen total del lecho ( $V_T$ ) fue calculado a partir de las dimensiones del mismo:

Altura de lecho: 76 cm

Diámetro interno: 15.5 cm

De acuerdo a la ecuación de volumen de un cilindro:

$$V_T = \pi r^2 h = \pi (D/2)^2 h$$

el volumen de la torre es:

$$V_T = \pi * (15.5/2)^2 * 76 \text{ cm}^3 = 14,340.59 \text{ cm}^3 = 14.34 \text{ L}$$

El volumen de sólidos ( $V_s$ ), se obtiene de la diferencia entre el volumen total del lecho y volumen de medio cargado que es de 10 L; de donde:

$$V_s = 14.34 \text{ L} - 10 \text{ L} = 4.34 \text{ L}$$

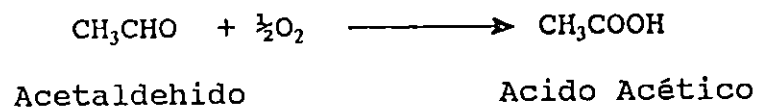
El cálculo de porosidad del acetador se realizó sin tomar en cuenta el espacio ocupado por la bacteria, es decir, el dato reportado representa la porosidad máxima que presentó el acetador bajo las condiciones dadas:

$$\epsilon = 0.6974$$

En las especificaciones del proceso de acetificación (Tabla 5.6) se presentan los datos de porosidad máxima y mínima para cada corrida calculadas de la misma forma.

#### 4.4.2 DETERMINACION DE LAS RAZONES DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO EN EL PROCESO DE PRODUCCION DE ACIDO ACETICO POR BACTERIAS ACETICAS.

Siendo que las bacterias acéticas son estrictamente aeróbicas, se requiere que el proceso de oxidación tenga suficiente oxígeno a disposición de las bacterias; las reacciones de conversión de etanol en ácido acético dan una idea sobre tal requerimiento:



No todo el oxígeno suministrado por medio de la aireación proporcionada por el sistema es fijado por las bacterias acéticas, de manera que es necesario suministrar un exceso sobre el teórico requerido; usualmente se emplea 200% de exceso de la cantidad teórica (Kirk, et. al., 1966; Prescott, 1952).

Estos requerimientos de oxígeno en el proceso de acetificación implican el diseño de mecanismos de aireación que satisfagan tal demanda, así como la evaluación de la capacidad de transferencia de oxígeno que el bioreactor como tal, puede ofrecer al proceso.

Un criterio de la evaluación de la capacidad de transferencia de oxígeno de un equipo de acetificación, es la razón volumétrica de transferencia de oxígeno  $klac^*$  (Bailey & Ollis, 1986).

Idealmente, esta razón debe ser medida en el bioreactor, en el que se incluya el caldo nutritivo y la población o las poblaciones de células de interés (para el caso, bacterias acéticas). Sin embargo, la conducción de experimentos de transferencia de oxígeno, bajo éstas condiciones, resulta costoso e inconveniente, ya que requiere de la prevención por contaminación, del control ambiental y de la preparación y habilitación del medio y del inóculo (Bailey & Ollis, 1986).

Una estrategia para el estudio de la razón volumétrica de transferencia de oxígeno ( $klac^*$ ) de un reactor, es el



uso de sistemas sintéticos que aproximen las condiciones de la bioreacción, sin las complicaciones de un cultivo vivo. En dichas aproximaciones el objetivo principal es evaluar la dependencia del  $k_{lac}^*$  con la hidrodinámica del sistema (Bailey & Ollis, 1986).

Un sistema sintético confiable, para evaluar la razón volumétrica de transferencia de oxígeno, para reactores de lecho empacado, es el sistema de oxidación de sulfito de sodio a sulfato de sodio en presencia de un ión metálico ( $Co^{++}$  ó  $Cu^{++}$ ) como catalizador (Bailey & Ollis, 1986). En el apéndice F se presenta la descripción del método del sulfito de sodio para la evaluación de  $k_{lac}^*$  en un reactor de lecho empacado.

Otra importancia del  $k_{lac}^*$  es el de servir de parámetro de diseño y escalamiento de bioreactores aireados de columna. Por bioreactores aireados de columna, se entienden reactores cuya razón de altura es mayor que el diámetro. También en dichos reactores, el mezclado es llevado a cabo totalmente por el paso de un gas comprimido, el cual se eleva a través del líquido. Los reactores de éste tipo han sido utilizados por muchos años en la industria química debido a sus ventajas y a su relativo bajo costo, su configuración mecánica simple y sus reducidos costos de operación basados en sus bajos requerimientos de energía. Aunque son poco familiares en la industria de procesos biológicos, los bioreactores de torre han sido utilizados a gran escala en

la producción de cerveza y para la elaboración de vinagre (Chemical Engineering, 1985).

La razón de consumo de total de oxígeno en el reactor es encontrada mediante la combinación del  $kla'$  con una característica macroscópica apropiada del reactor. Si la composición del líquido es uniforme y las burbujas se dispersan uniformemente a través del reactor, la razón de transferencia de masa será:

$$Vkla'(c^*-c_{liq})_e = \text{razón de consumo de oxígeno, mol O}_2/\text{s}$$

donde el subíndice e se refiere a que se consideran condiciones de mezcla completa a todo lo largo del reactor.

Cuando las burbujas se elevan en flujo en pistón a través del reactor, considerando siempre mezcla completa en el líquido,  $c^*$  varía con la posición. Sobre una altura diferencial del reactor  $dz$ , la pérdida instantánea de la burbuja es:

$$HAdz(dpO_2/dt) (1/RT)$$

donde:

$$H = (\text{vol. de gas/ vol de reactor})$$

$$Adz = (\text{vol. diferencial del reactor})$$

$$(dpO_2/dt) = (\text{razón de cambio de concentración de la burbuja})$$

lo cual se iguala con:

$$-kla'(cl^*-cb)Adz$$

que es la razón de transferencia de masa en el líquido. Si  $pO_2 = Mc^*$  (M es la constante de la ley de Henry), se obtiene:

$$(H/RT)(dpO_2/dt) = (HM/RT)(dc^*/dt) = -kla'(cl^*-cb)$$

para una velocidad de elevación de burbuja constante  $u_b$ ,  $dt = dz/u_b$ , la variación de  $c^*$  con  $z$  es:

$$(cl^*-c_b)_z = (cl^*-c_b)_{entrada} * \exp(-kla'RTz/HMu_b)$$

La razón de transferencia de masa global en el volumen Ah es por tanto:

$$\int_0^h kla(cl^*-c_b)(z)Adz = (HMu_b/RT)(cl^*-c_b)_{entrada}A(1 - \exp(-kla'RTz/HMu_b))$$

(4.2)

La ecuación 4.2 proporciona la razón de consumo de  $O_2$  por unidad de tiempo, donde el factor de diseño  $kla'$  es constante para una determinada razón de consumo de oxígeno, por lo que en el proceso de escalamiento la variable carac-

terística a tratar es la altura de la torre ( $h$ ), y conociéndose con exactitud el resto de variables que involucra la ecuación puede llegarse a definir con éxito las dimensiones de un equipo de tamaño mayor (Totman, 1985).

La obtención de valores del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $klac^*$ ) a diferentes flujos de aire para una geometría de equipo dada, permite evaluar una tendencia del comportamiento del  $klac^*$  con respecto al flujo de aire empleado, y de esta manera establecer conclusiones sobre las condiciones de aireación que podrían aplicarse al proceso de acetificación, que no necesariamente son las óptimas para la bacteria acética.

La construcción de una curva de comportamiento del coeficiente de transferencia de oxígeno con respecto al flujo de aire aplicado al acetador, se realizó evaluando este coeficiente para ocho flujos diferentes en un rango de 9.4 a 4.2 L de aire/min, partiendo para cada prueba, de 10 L de una solución 0.1 N de sulfito de sodio con una concentración de  $10^{-4}$  M de sulfato de cobre como catalizador. En el apéndice F se presentan los resultados de la evaluación experimental del  $klac^*$  para cada flujo de aire obtenidos de acuerdo al método ahí descrito. Los valores de  $klac^*$  obtenidos para el equipo de acetificación construido, evaluados por los métodos analítico y de correlación lineal se presentan en la tabla 4.3.

El comportamiento de  $klac^*$  por correlación lineal en

función del flujo de aire (figura 4.3) se puede representar por la ecuación determinada por evaluación de regresión lineal:

$$y = a + bx + cx^2 + d/x + e/x^2 \quad (4.3)$$

donde:  $y = klac^*$  en milimoles de  $O_2$ /litro-min

$x =$  flujo de aire en L/min

$a = 4.9569015$  ;  $b = -0.44262994$

$c = 0.01620791$  ;  $d = -20.549957$

$e = 29.9369616$

Mientras que el comportamiento de  $klac^*$  del método analítico en función del flujo de aire (figura 4.4) puede representarse por la ecuación determinada por regresión lineal:

$$y = a + bx + cx^2 + d/x + e/x^2 \quad (4.3)$$

donde:  $y = klac^*$  en milimoles de  $O_2$ /litro-min

$x =$  flujo de aire en L/min

$a = 8.8146255$  ;  $b = 0.90628565$

$c = 0.036601534$  ;  $d = -33.996491$

$e = 46.751676$

Ambas ecuaciones fueron determinadas utilizando el software Jandel Scientific Tablecurve versión 3.10, ajustándose en

ambos casos con gran confiabilidad a los resultados experimentales.

De acuerdo a los resultados (figuras 4.2 y 4.3), el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno adecuado como parámetro de escalamiento del equipo construido (punto máximo en ambas figuras), es el correspondiente a un flujo de aire de 9.46 L/min, con un valor de 0.3796 y 0.3906 milimoles de  $O_2$ /L-min para los métodos de evaluación por correlación lineal y analítico respectivamente.

El nivel de aireación en base a la demanda del proceso de producción de ácido acético puede ubicarse en un intervalo de flujo de aire de 9.46 a 4.02 L/min (Díaz y Díaz, 1991)<sup>†</sup>; por lo que el acetador diseñado resulta apropiado para evaluar el efecto de flujo de aire en la producción de ácido acético.

---

<sup>†</sup> En donde la demanda de oxígeno del proceso de producción de ácido acético ha sido calculado en base al requerimiento estequiométrico y considerando un exceso de oxígeno del 200%.

TABLA 4.3  
 VALORES DE  $k_{lac}^t$  OBTENIDOS PARA EL EQUIPO DE ACETIFICACION  
 POR EL METODO DEL SULFITO DE SODIO POR EVALUACION  
 ANALITICA Y DE CORRELACION LINEAL.

Flujo de aire (L/min)	Intervalo de tiempo (min)	Pendiente Correlación Lineal	$k_{lac}^t$ milimoles $O_2/L\text{-min}$	$\%p/v Na_2SO_3$ inicial	$\%p/v Na_2SO_3$ final	$k_{lac}^t$ Analítico
9.46	60	-0.0095701	0.3796377	0.633405	0.42671	0.3905635
8.64	60	-0.0094666	0.3755313	0.634200	0.070506	0.3726860
7.80	70	-0.0083989	0.3331770	0.613189	0.017964	0.3373138
6.92	80	-0.0083776	0.3323298	0.701286	0.033577	0.3310916
6.15	70	-0.0076322	0.3027634	0.697709	0.131984	0.3205962
5.39	90	-0.0063553	0.2521065	0.692212	0.080380	0.2696749
4.69	100	-0.0055546	0.2203440	0.677694	0.082454	0.2361256
4.02	120	-0.0045242	0.1794708	0.626114	0.054014	0.1891218

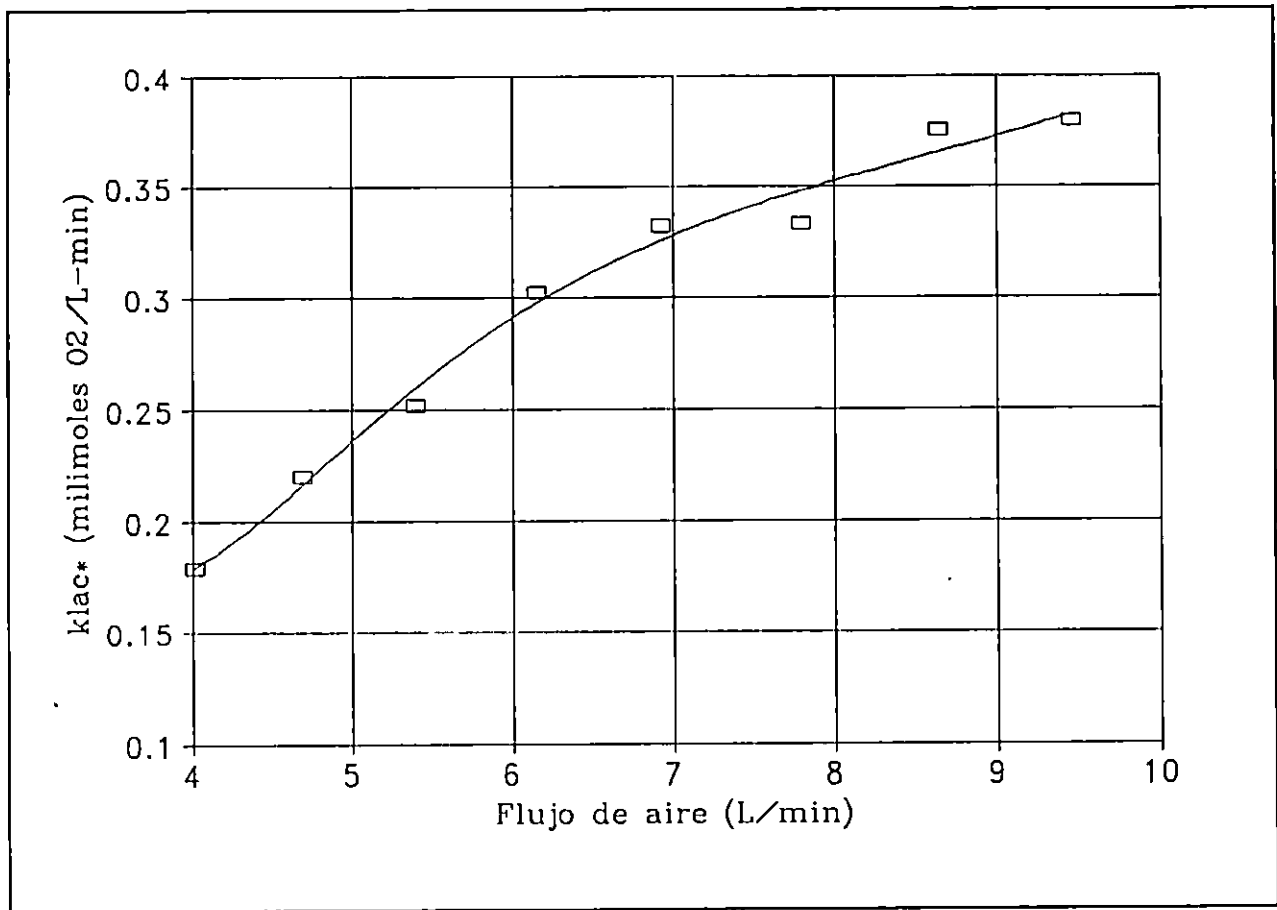


Figura 4.3 Comportamiento del  $k_{lac^*}$  obtenido por correlación lineal con respecto al flujo de aire, para el reactor empacado con piedra pómez de 23 litros de capacidad total, utilizado en la producción de ácido acético.



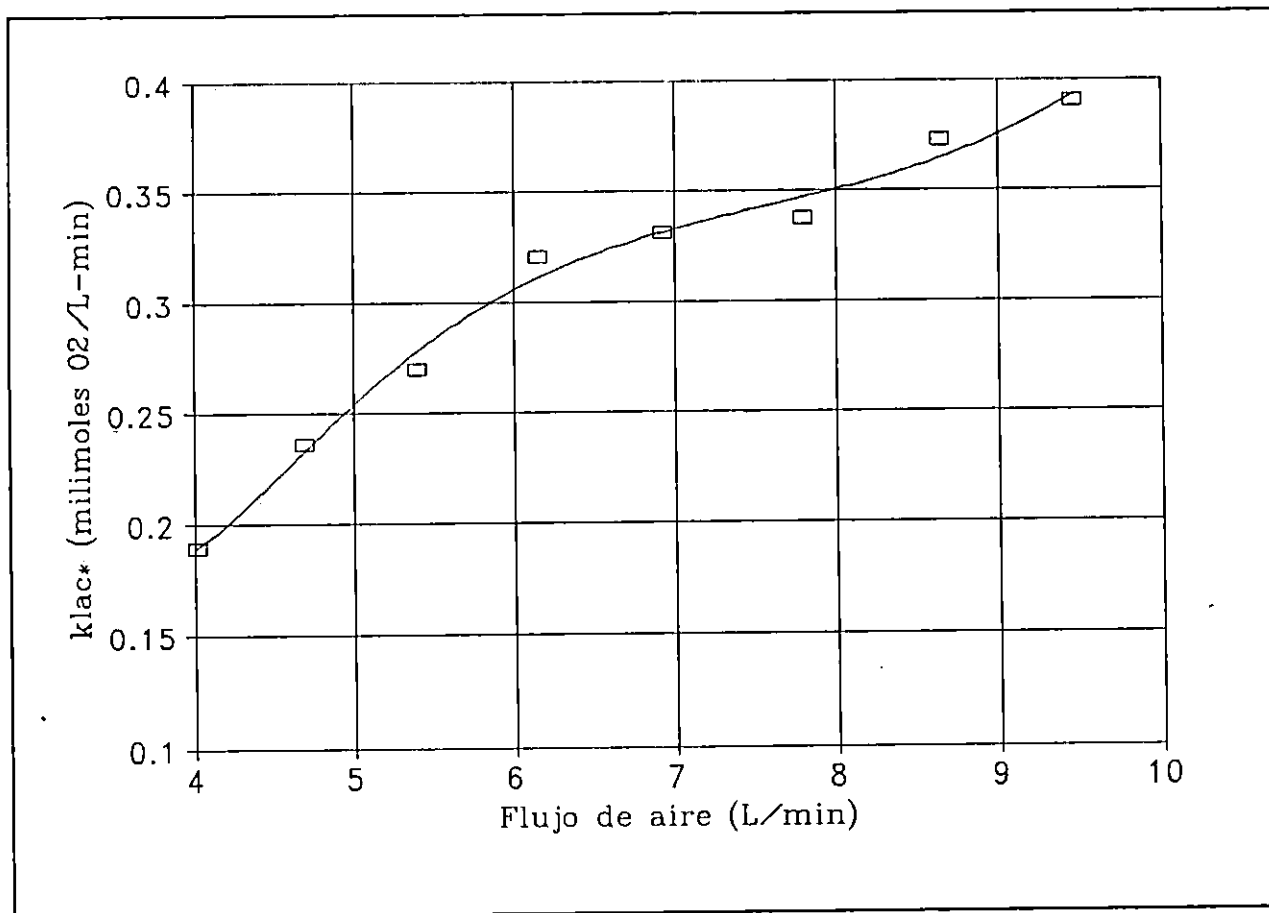


Figura 4.4 Comportamiento del  $k_{lac^*}$  obtenido por método analítico con respecto al flujo de aire, para el reactor empacado con piedra pómez de 23 litros de capacidad total, utilizado en la producción de ácido acético.

## 5.0 TECNICAS EMPLEADAS PARA LA PRODUCCION DE ACIDO ACETICO CON CELULAS DE *Acetobacter sp.* INMOVILIZADAS SOBRE PIEDRA POMEZ.

Además del diseño, construcción y especificación de un acetador, la realización de pruebas de escalamiento del proceso de producción de ácido acético abarca, el aislamiento y mantenimiento de cepas productoras de ácido acético y la identificación del efecto de variables como: composición del sustrato, concentración de etanol y nivel de aireación sobre la producción de ácido acético.

En esta investigación se contó con dos cepas productoras, una cepa comercial de *Acetobacter pasteurianum* y una cepa nativa de *acetobacter sp.* aislada de jugo fermentado de piña.

La cepa comercial fue obtenida como una donación de la Asociación Española de cultivos puros a través de la Universidad de las Palmas de Gran Canarias, España.

El aislamiento de la cepa nativa de *Acetobacter* fue realizado con la colaboración del laboratorio Especialidades Microbiológicas Industriales S.A. de C.V. (ESMI), San Salvador.

Las pruebas de identificación de la bacteria aislada (figuras 5.1 y 5.2) se llevaron a cabo en los laboratorios de la Planta Piloto de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de El Salvador. La descripción de resultados de estas pruebas de identificación es la siguiente:

- a) Características de la bacteria en medio sólido. El cultivo inoculado en caja petri conteniendo sustrato nutritivo con 2% v/v de

- etanol, presentó colonias después de 48 horas de incubación a temperaturas entre 28 a 35°C, formando colonias pequeñas, circulares, de bordes lisos, elevación convexa y color amarillento.
- b) Características en medio líquido. El sustrato nutritivo con 2% v/v de etanol, presentó formación de película en la superficie después de 48 horas de incubación a temperatura entre 28 a 35°C, la película presentó reptación y no hubo enturbiamiento del caldo.
- c) Tinción de Gram. La bacteria aislada es gramnegativa.
- d) Prueba de movilidad. La bacteria aislada no presentó movilidad de la prueba de gota pendiente.
- e) Coloración por el yodo. La bacteria acética no presenta capa mucosa, la cual es una sustancia amorfa que rodea la célula y está constituida por polisacáridos, principalmente de almidón, éste al reaccionar con el yodo da una coloración azul. La bacteria aislada presenta negativa esta prueba.
- f) Oxidación de alcohol etílico. La bacteria aislada da positiva la prueba de oxidación de etanol, habiéndose desarrollado favorablemente en medios sólidos y líquidos conteniendo etanol.

Un resumen de los resultados obtenidos en las pruebas de identificación se presenta en la tabla 5.1. De acuerdo a estos resultados y tomando como base la información presentada en las tablas 2.1, 2.2 y 2.3 de la sección 2.0, puede afirmarse que la bacteria nativa aislada pertenece al género *Acetobacter*.

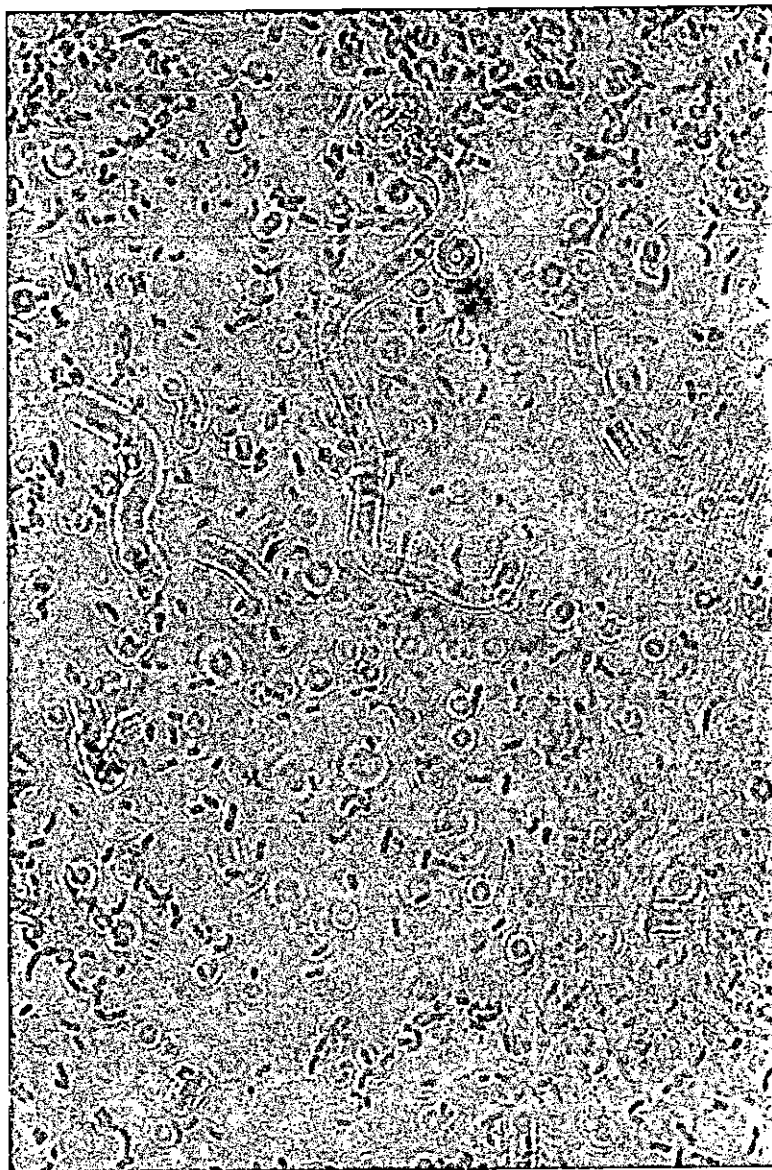


Figura 5.1 Fotomicrografía de *Acetobacter* sp. aislada de jugo fermentado de piña. Aumento 100x12.5.

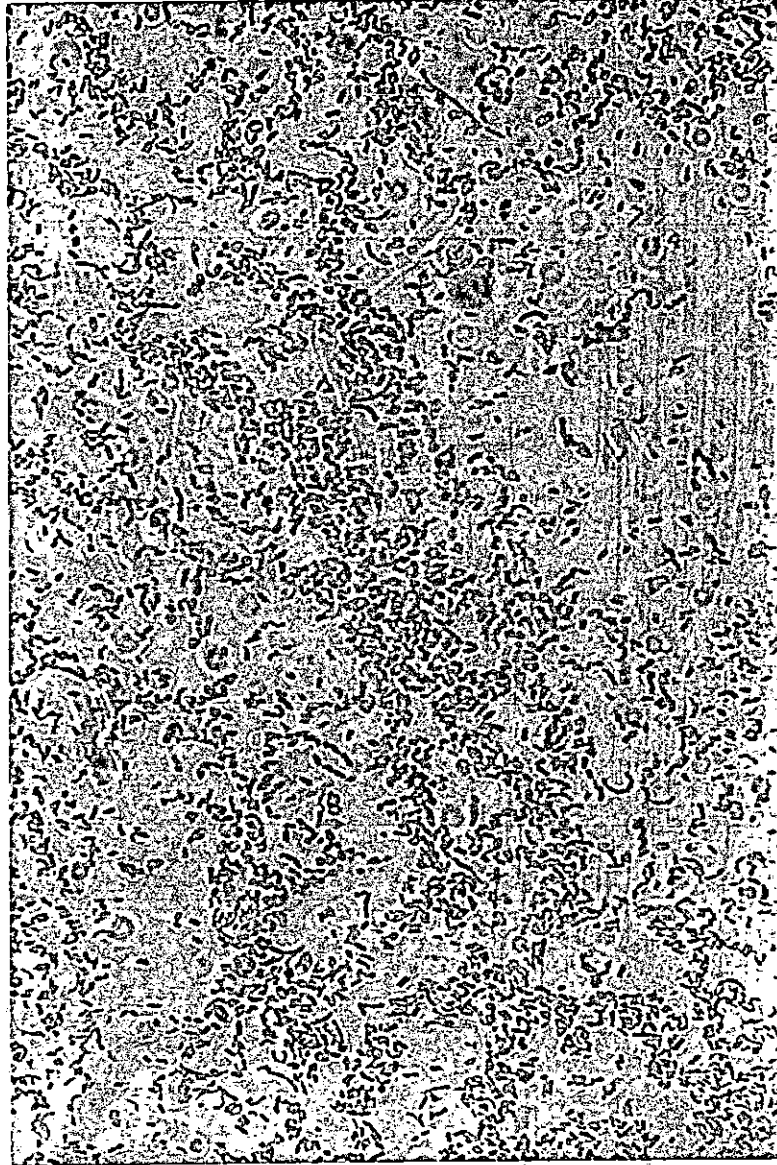


Figura 5.2 Fotomicrografía de *Acetobacter* sp. aislada de jugo fermentado de piña. Aumento 100x8

TABLA 5.1

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE IDENTIFICACION DE LA BACTERIA  
ACETICA AISLADA DEL GENERO *Acetobarter*.

Formación de película y reptación de la misma	Positivo
Enturbiamiento del caldo	Negativo
Tinción de Gram	Gramnegativas
Prueba de movilidad	Negativa
Coloración por yodo	Negativa
Oxidación de alcohol etílico	Positiva

Los componentes básicos del medio de aislamiento de la bacteria acética así como de los medios de cultivo para las etapas de acostumbramiento y producción son: carbonato de calcio, glucosa comercial y extracto de levadura. La formulación de los diferentes medios se presenta en la tabla 5.2.

5.1 ETAPA DE ACOSTUMBRAMIENTO DE LAS BACTERIAS DEL GENERO *Acetobacter*, AL PROCESO DE PRODUCCION DE ACIDO ACETICO.

Para el proceso de acetificación es necesario que la bacteria sea previamente acostumbrada a niveles máximos de concentración de etanol, así como también al medio de soporte. El acostumbramiento de las bacterias acéticas (*Acetobacter sp.* y *Acetobacter pasteurianum*), a diferentes concentraciones de etanol y a la piedra pómez como material de soporte, utilizando diámetro de piedra entre 1/2 y 3/4 de pulgada, se hizo en forma

simultánea.

Este proceso se realizó por etapas que se diferenciaban por la concentración de etanol introducida al medio. Se inició con inóculos a medios con concentraciones de 0.2 y 0.5% v/v de etanol. Los crecimientos a estas concentraciones sirvieron de inóculo a medios con concentración de etanol del 5% v/v, de donde se partió a acostumbramientos al 7, 9, 10, 11 y 12% v/v de etanol en el medio.

## 5.2 EVALUACION DEL EFECTO DE LA COMPOSICION DE SUSTRATO, CONCENTRACION DE ETANOL Y NIVEL DE AIREACION EN LA PRODUCCION DE ACIDO ACETICO CON CELULAS INMOVILIZADAS DE *Acetobacter sp.*

El proceso de acetificación puede ser afectado por diversos factores: temperatura, flujo de oxígeno, tiempo de proceso, diámetro de la partícula de empaque, composición de sustrato, concentración de etanol y especie de cepa bacteriana. El grado de influencia de cada una de estas variables, debe establecerse a través de estudios experimentales separados, que identifiquen la significancia del efecto de las mismas sobre la acetificación. La determinación de variables de efectos más significativos, permitirá realizar estudios de optimización que conduzcan a un escalamiento adecuado a nivel industrial.

TABLA 5.2

COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN EL PROCESO DE PRODUCCION DE ACIDO ACETICO CON BACTERIAS DEL GENERO *Acetobacter*.

COMPUESTO	MEDIO DE AISLAMIENTO	MEDIO DE MANTENIMIENTO	MEDIO LIQUIDO PARA IDENTIFICACION	MEDIO LIQUIDO PARA ACOSTUMBRAMIENTO I <sup>a</sup>	MEDIO LIQUIDO PARA ACOSTUMBRAMIENTO II <sup>a</sup>
Carbonato de Calcio (CaCO <sub>3</sub> ) (g/L)	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
Glucosa Comercial (g/L)	36	36	36	18	
Extracto de Levadura (g/L)	7.5	7.5 <sup>b</sup>	7.5 <sup>b</sup>	7.5 <sup>b</sup>	
Agar granulado (g/L)	15				
Peptona (%)	0.1				
Etanol (% v/v)	4	variable <sup>c</sup>	2%	variable <sup>d</sup>	variable <sup>d</sup>
Fosfato de amonio (g/L)					0.1667
Sulfato de magnesio (g/L)					0.0101
Fosfato ácido de potasio (g/L)					0.0132

<sup>a</sup> En el proceso de acetificación se utiliza el medio en el que mejor desarrollo presenta la bacteria acética.

<sup>b</sup> 7.5 g/L si es levadura comercial.

<sup>c</sup> Se da mantenimiento a la cepa hasta la mayor concentración que ésta soporte.

<sup>d</sup> La bacteria se acostumbra hasta la máxima concentración posible de etanol.

(Ref. Díaz y Díaz, 1991)



### 5.2.1 PRUEBAS DE ACETIFICACION PARA VOLUMENES DE MEDIO DE CULTIVO DE 250 Y 400 MILILITROS.

En estas pruebas se investigó el efecto de la composición de sustrato, concentración de etanol, especie de cepa bacteriana y nivel de aireación. El control de los diferentes experimentos se realizó en función del tiempo por medio de la cuantificación de la acidez producida expresada como ácido acético (ver apéndice G). Se realizaron dos pruebas:

a- Primera prueba de acetificación para 250 ml de medio de cultivo : Se utilizaron reactores de 500 ml de capacidad empacados con piedra pómez esterilizada de 1/2 a 3/4 de pulgada de diámetro hasta una altura de lecho de 4 cm, se agregaron 250 ml de medio (ver tabla 5.2) con concentraciones de etanol variables, no se utilizó aireación mecánica externa (Figura 5.3). En esta prueba se evaluó:

a.1- Concentración de etanol en que se desarrolla mejor la bacteria. Se utilizaron tanto reactores con medio I como con medio II y se experimentó con concentraciones de 5, 7, 9, 10 y 11% v/v de etanol en el medio. A partir del día 18 después de la inoculación se adicionó diariamente 1 cc de etanol.

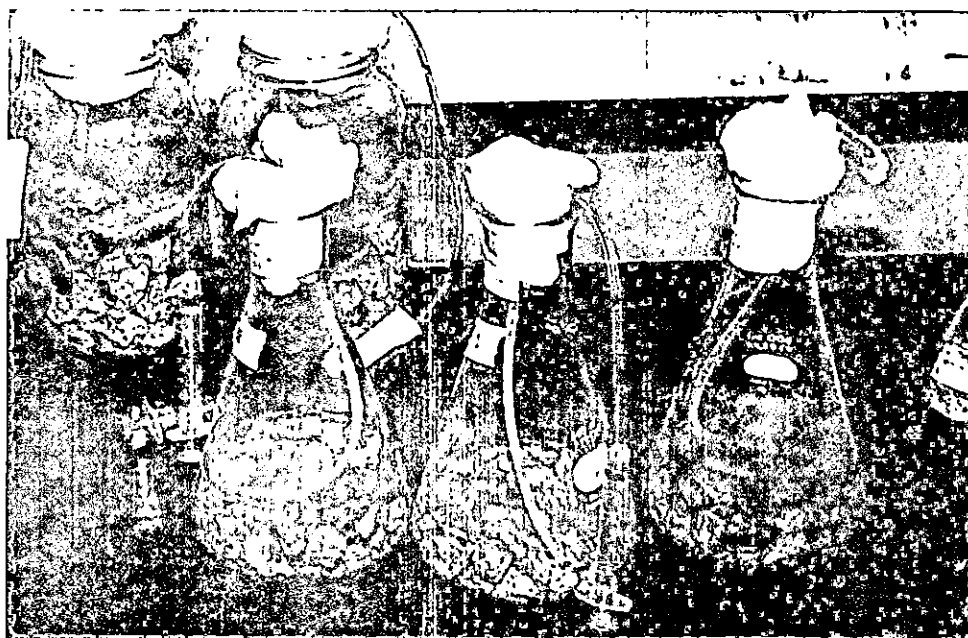


Figura 5.3 Sistemas de acetificación utilizados en las pruebas de acetificación con 250 mililitros de medio de cultivo, utilizando bacterias de *Acetobacter sp.* y piedra pómez como material de soporte.

a.2- Composición del medio de trabajo más favorable para la bacteria acética. Se evaluaron por separado: la producción de acidez en medio I de crecimiento añadiendo 1cc de etanol diariamente a partir del día 18 de efectuado el inóculo, adicionando medio I cuando se consideró necesario; y la producción de acidez en medio II, agregado después de haber obtenido crecimiento celular abundante en medio I.

a.3- Mejor adaptación y producción de acidez entre dos cepas de bacterias acéticas. Se comparó entre una cepa comercial (*Acetobacter pasteurianum*) y una ce

pa aislada del medio ambiente (*Acetobacter sp*) utilizando reactores bajo las mismas condiciones iniciales de concentración de etanol en el medio, igual cantidad de medio y etanol añadido.

Durante las pruebas se observó una mejor adaptación de la bacteria nativa aislada (*Acetobacter sp.*) con respecto a la bacteria comercial (*Acetobacter pasteurianum*), por lo que se optó por seguir utilizando la bacteria aislada *Acetobacter sp.*

De acuerdo a los resultados obtenidos de esta primera prueba, se observa que la producción de acidez es más elevada a concentraciones de etanol en el medio de 5 y 7% v/v, a la vez puede notarse una mayor producción de acidez empleando solamente medio I que cuando se cambia de medio I a medio II a las mismas concentraciones de etanol. Así se tiene que, en medio I se obtuvo a los 30 días de proceso una producción de ácido acético de 5.9153% p/v para una concentración inicial de etanol de 7% v/v y una producción de ácido acético de 5.5337% p/v a los 34 días de proceso para una concentración inicial de etanol de 5% v/v.

Cuando se cambió de medio I a medio II se obtuvieron los valores máximos de producción de acidez de 5.0232% p/v para 7% v/v de etanol a los 30 días de proceso, y de 4.7065% p/v para 5% v/v de etanol a 48 días de proceso.

En cambio, a concentraciones superiores de 9% v/v de

etanol en ambos medios, la producción de ácido acético no supera el nivel de 1% p/v.

Un resumen de los resultados de estas pruebas para *Acetobacter sp.* se presentan en la tabla 5.3 y el comportamiento de la acidez en función del tiempo en la figura 5.4.

TABLA 5.3

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ACETIFICACION CON *Acetobacter sp* PARA  
250 ml DE MEDIO DE CULTIVO Y PIEDRA POMEZ COMO MATERIAL DE SOPORTE

Concentración de etanol (% v/v)	Tiempo de prueba (Días)	Acidez alcanzada (% p/v como CH <sub>3</sub> COOH)
Medio I		
5%	34	5.5337
7%	30	5.9153
9%	22	0.9133
10%	22	0.9396
11%	22	0.2000
Medio I con cambio a Medio II		
5%	48	4.7065
7%	30	5.0232
9%	22	0.0212
10%	22	0.0212
11%	22	1.4231

b- Segunda prueba de acetificación para 400 ml de medio de cultivo: Se realizó una segunda prueba de monitoreo en 4 reactores de 2,500 ml de capacidad, estos fueron empacados con piedra pómez de 1 a 1.5 pulgadas de diámetro hasta una altura de 10 cm después de haber sido esterilizada, se agregaron 400 ml de medio de cultivo I al 7%

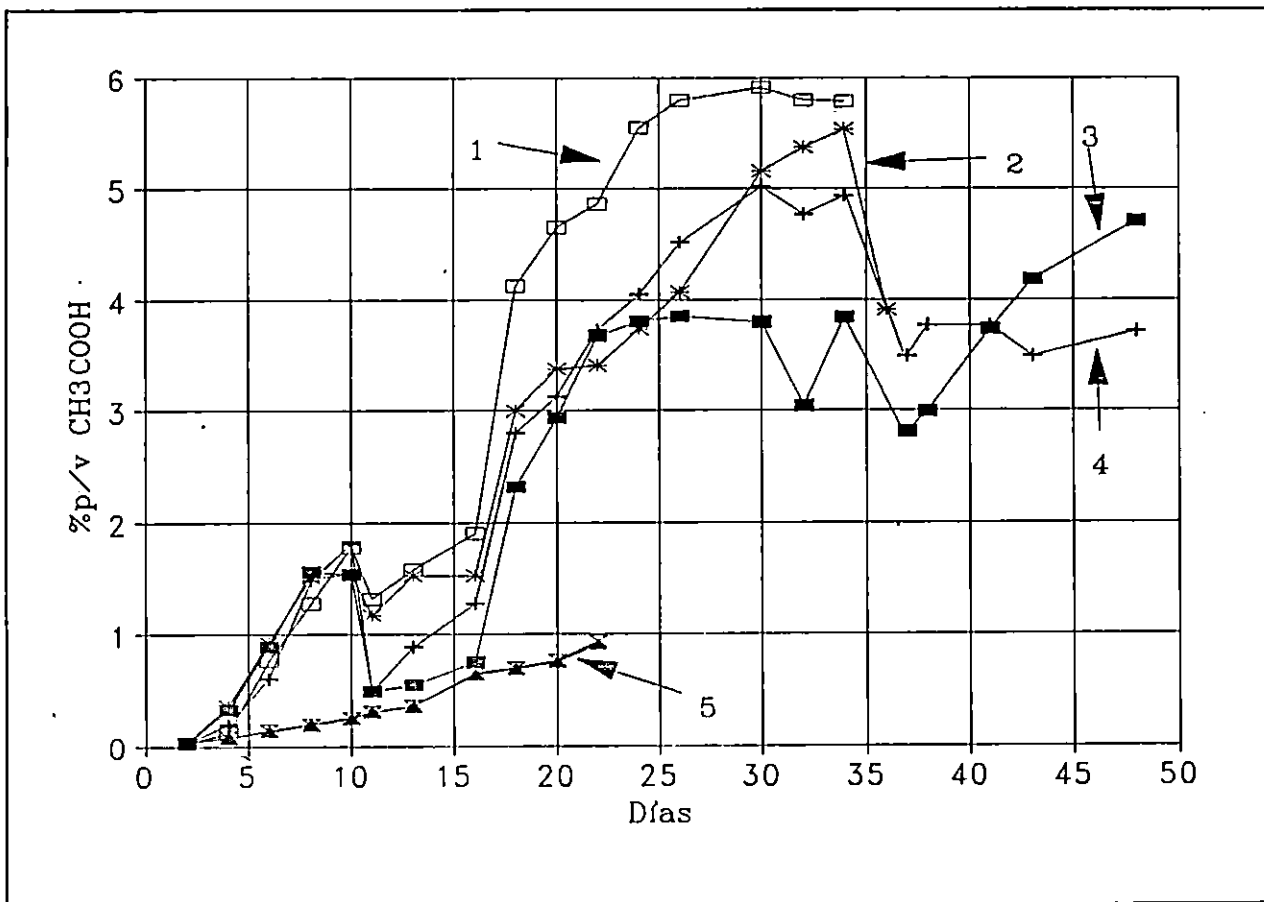


Figura 5.4 Comportamiento de la acidez en función del tiempo de la primera prueba de acetificación para 250 ml de medio de cultivo, utilizando una cepa de *Acetobacter sp* y piedra pómez como material de soporte. (1) Acetificación sin aireación al 7% v/v de etanol; (2) Acetificación sin aireación al 5 v/v de etanol; (3) Acetificación sin aireación al 5% v/v de etanol cambiando de medio I a medio II; (4) Acetificación sin aireación al 7% v/v de etanol cambiando de medio I a medio II, (5) Acetificación sin aireación al 9, 10 y 11% de etanol con y sin cambio de medio I a medio II (la líneas se superponen).

v/v de etanol en el medio, y se inoculó con *Acetobacter* sp. por haber sido estos parámetros (medio, concentración y cepa) con los que se obtuvo mejores resultados en la anterior prueba de monitoreo. Para proveer oxígeno al inóculo se utilizaron bombas de pecera marca HI-TECH PUMP-310 con capacidad para 10 galones; se incertó una manguera al reactor con una jeringa incorporada para toma de muestra y de esta manera no abrir el reactor (Ver figura 5.5). Con esta prueba se evaluó:

b.1- Producción de acidez en relación a la cantidad de etanol agregado. Para este fin se utilizaron dos

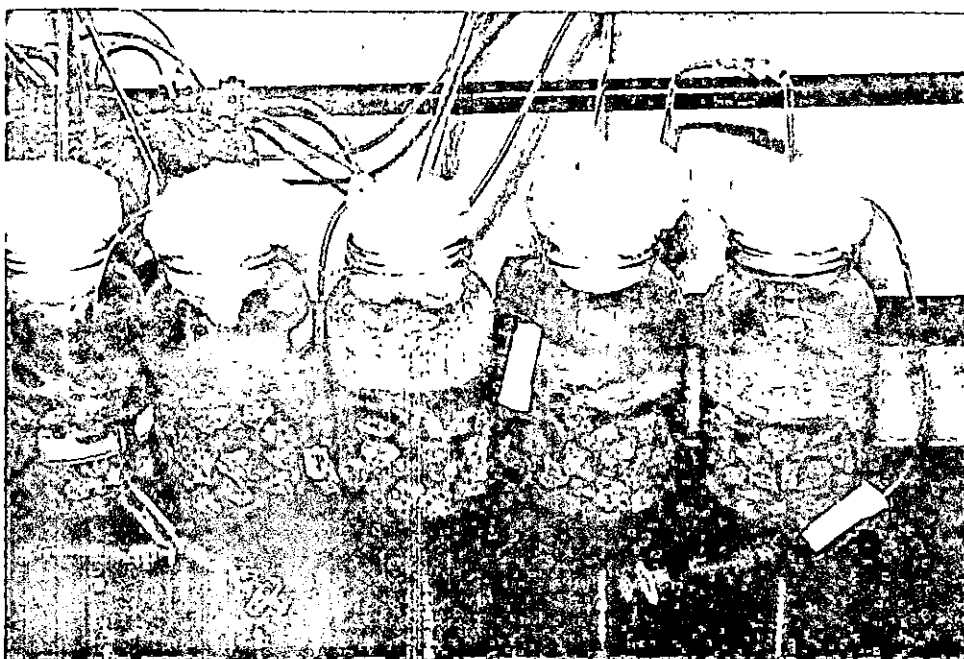


Figura 5.5 Sistemas utilizados en las pruebas de acetificación con 400 mililitros de medio de cultivo utilizando una cepa de *Acetobacter* sp. y piedra pómez como material de soporte.

de los reactores en las condiciones ya descritas, a uno se le añadió etanol a los 13 días y el otro sirvió de blanco para comparación.

b.2- Efecto de la adición de sales sobre la acidez. Este efecto se evaluó en dos sistemas conteniendo 400 ml de medio al 7% de etanol, adicionando sales nutritivas (constituyentes del medio II) a uno de los sistemas, mientras el otro servía de blanco. La adición de sales al sistema se realizó después de 10 días de la inoculación.

Los resultados de la segunda prueba de acetificación se presentan en la tabla 5.4, y en la figura 5.6. Las pruebas se suspendieron a los 20 días de proceso debido a problemas de contaminación en los reactores, por lo que únicamente se observaron dos de los sistemas en los que la concentración de ácido acético alcanzó un valor de 1.94% p/v a los 18 días en el sistema con adición de sales y de 0.99-83% p/v a los 10 días en el sistema con adición periódica de etanol. En ambos sistemas se utilizó medio de cultivo I y se partió de una concentración de etanol en el medio de 7% v/v.

Las pruebas a escala de 250 y 400 ml, generaron la información necesaria para iniciar pruebas de producción de ácido acético en el reactor construido de 23 litros de capa

cidad total. Esta información fue: uso de la cepa aislada de *Acetobacter sp.* como microorganismo productor, uso de medio de cultivo I como medio de trabajo y uso de un volumen de etanol equivalente al 7% con respecto al volumen total de medio en el reactor.

TABLA 5.4

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ACETIFICACION CON *Acetobacter sp* PARA 400 ml DE MEDIO DE CULTIVO Y PIEDRA POMEZ COMO MATERIAL DE SOPORTE

PRUEBA	TIEMPO DE PRUEBA (DIAS)	ACIDEZ ALCANZADA (% P/V COMO CH <sub>3</sub> COOH)
Adición de sales	18	1.9396
Adición periódica de etanol	10	0.9983

NOTA 1: Concentración de etanol: 7% v/v en medio I; aireación por bomba.

NOTA 2: Hubo contaminación de los cultivos.

5.3 PRUEBAS DE ACETIFICACION A ESCALA DE 10 LITROS DE MEDIO DE CULTIVO UTILIZANDO EL ACETADOR DISCONTINUO DE 23 LITROS DE CAPACIDAD TOTAL EMPACADO CON PIEDRA POMEZ.

El proceso de acetificación en el reactor construido para 10 L de volumen de medio de cultivo y 23 litros de capacidad total (incluyendo el volumen ocupado por el lecho empacado), abarcó tres etapas:

1- Preparación del sistema de acetificación.



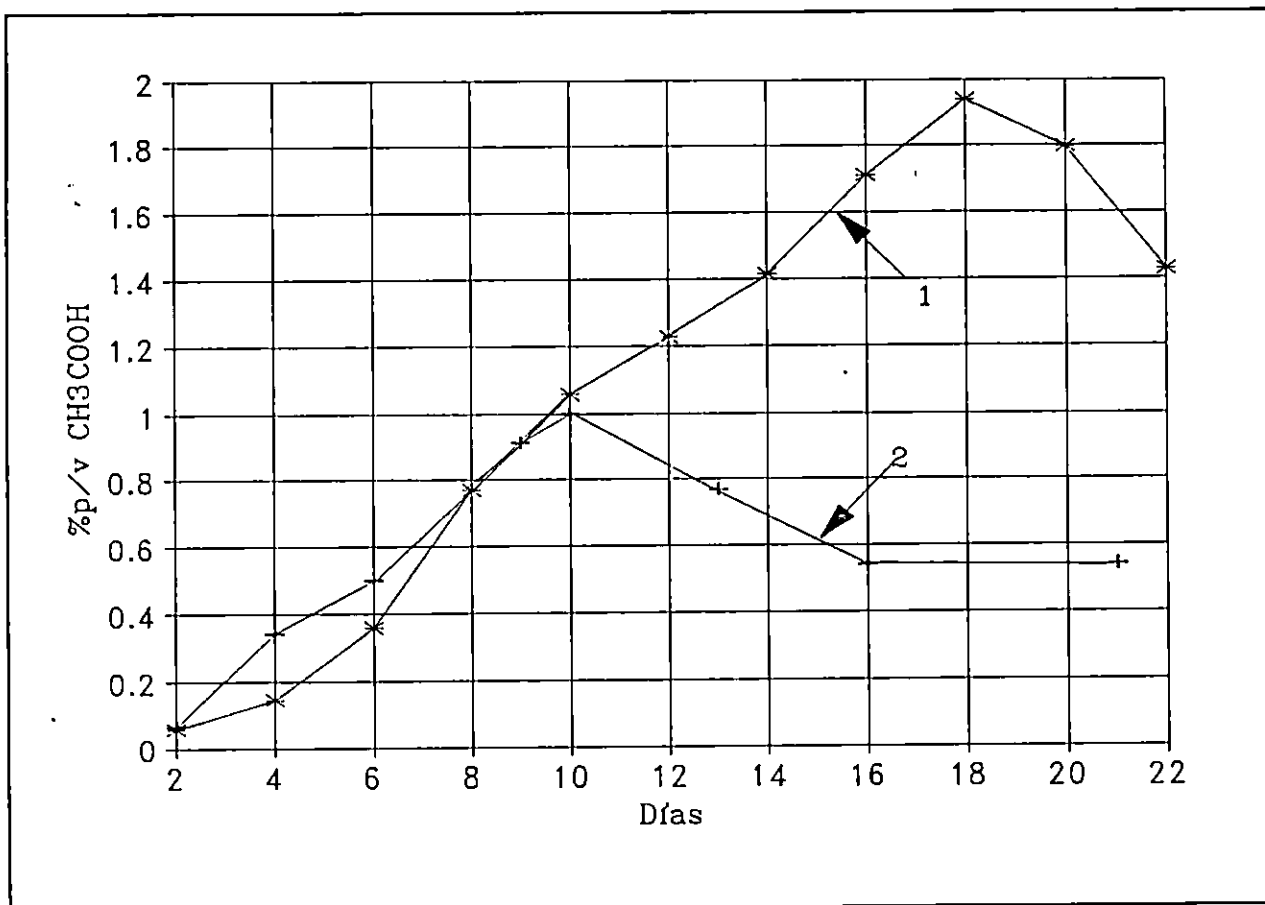


Figura 5.6 Comportamiento de la acidez en función del tiempo de la segunda prueba de acetificación para 400 ml de medio de cultivo, utilizando bacterias de *Acetobacter sp* y piedra pómez como material de soporte. (1) Acetificación al 7% v/v de etanol con aireación y adición de sales; (2) Acetificación al 7% v/v de etanol con aireación y adición de etanol.

- 2- Crecimiento del inóculo.
- 3- Pruebas de acetificación.

#### 5.3.1 PREPARACION DEL SISTEMA DE ACETIFICACION

- a) Preparación del sistema de acetificación. Para inoculación del acetador se prepararon 10 L de medio I al 7 % v/v de etanol con un pH entre 4.5 y 5 y se esterilizó a 121°C y 15 Psig durante 15 minutos en erlenmeyers de 1000 ml.
- b) Esterilización de la piedra pómez. En el acetador se utilizó como empaque piedra pómez entre 1" a 1.5" de diámetro, esterilizadas a 121°C y 15 Psig durante una hora en canastas de aluminio de 23 cm de altura y 22.5 cm de diámetro.
- c) Esterilización del aire. El aire alimentado a la columna de acetificación fue primero pasado por lejía comercial en proporción de dos a uno con agua, luego por agua destilada y esterilizada, y finalmente por un filtro de algodón estéril.
- d) Esterilización de la columna de acetificación. Para evitar contaminación dentro de la columna, se generó vapor de agua a 121 °C y 15 Psig en el autoclave, el cual se hizo circular por la columna durante un tiempo total de 5 minutos, en lapsos de 30 segundos cada vez.

### 5.3.2 CRECIMIENTO DEL INOCULO

Para lograr el crecimiento del inóculo en el reactor se procedió a hacer siembras de la bacteria ya acostumbrada en el interior de la columna. La siembra se realizó en zona estéril, empacando la columna con capas de piedra pómez limpia y esterilizada y con capas de piedra con bacteria adherida (inóculo), una vez logrado un lecho de 76 cm de altura, se agregó el medio de crecimiento al 7% v/v de etanol, se cerró herméticamente la columna y se hizo pasar un flujo de aire de 5.39 L/min. El crecimiento del inóculo se controló durante 90 horas (4 días)<sup>6</sup>. La acidez inicial y final del proceso fueron respectivamente 0.57098% y 1.8969% p/v de ácido acético. Las especificaciones del crecimiento del inóculo se presentan en la tabla 5.5 y los resultados del comportamiento de la acidez en función del tiempo para esta etapa se presentan en la figura 5.7.

### 5.3.3 PRUEBAS DE ACETIFICACION

Una vez logrado el crecimiento del inóculo se realizaron tres pruebas de producción de ácido acético en el reactor discontinuo construido de 23 litros de capacidad. La variación de condiciones entre estas pruebas fue la forma de

---

<sup>6</sup>Excelente tiempo en comparación con los 17 a 21 días que reporta la bibliografía.

TABLA 5.5  
 ESPECIFICACIONES DEL CRECIMIENTO DEL INOCULO INICIADOR DEL  
 PROCESO DE ACETIFICACION

Bacteria utilizada	<i>Acetobacter sp</i>
Tipo de proceso	discontinuo
Temperatura de trabajo	Ambiente
Presión de trabajo	Atmosférica
Flujo de aire (L/min)	5.39
Volumen de medio alimentado (L)	10
Volumen de medio remanente (L)	0
Volumen total	10
Concentración inicial de etanol (%v/v)	7
Concentración final de etanol (%v/v)	2.91
Concentración inicial de ácido acético (%p/v)	0.57
Concentración final de ácido acético (%p/v)	1.98
Tiempo de muestreo (h)	12
Tiempo total de acetificación (h)	90
Rango de porosidad del lecho	0.69
Relación altura de empaque/ altura de columna	0.69

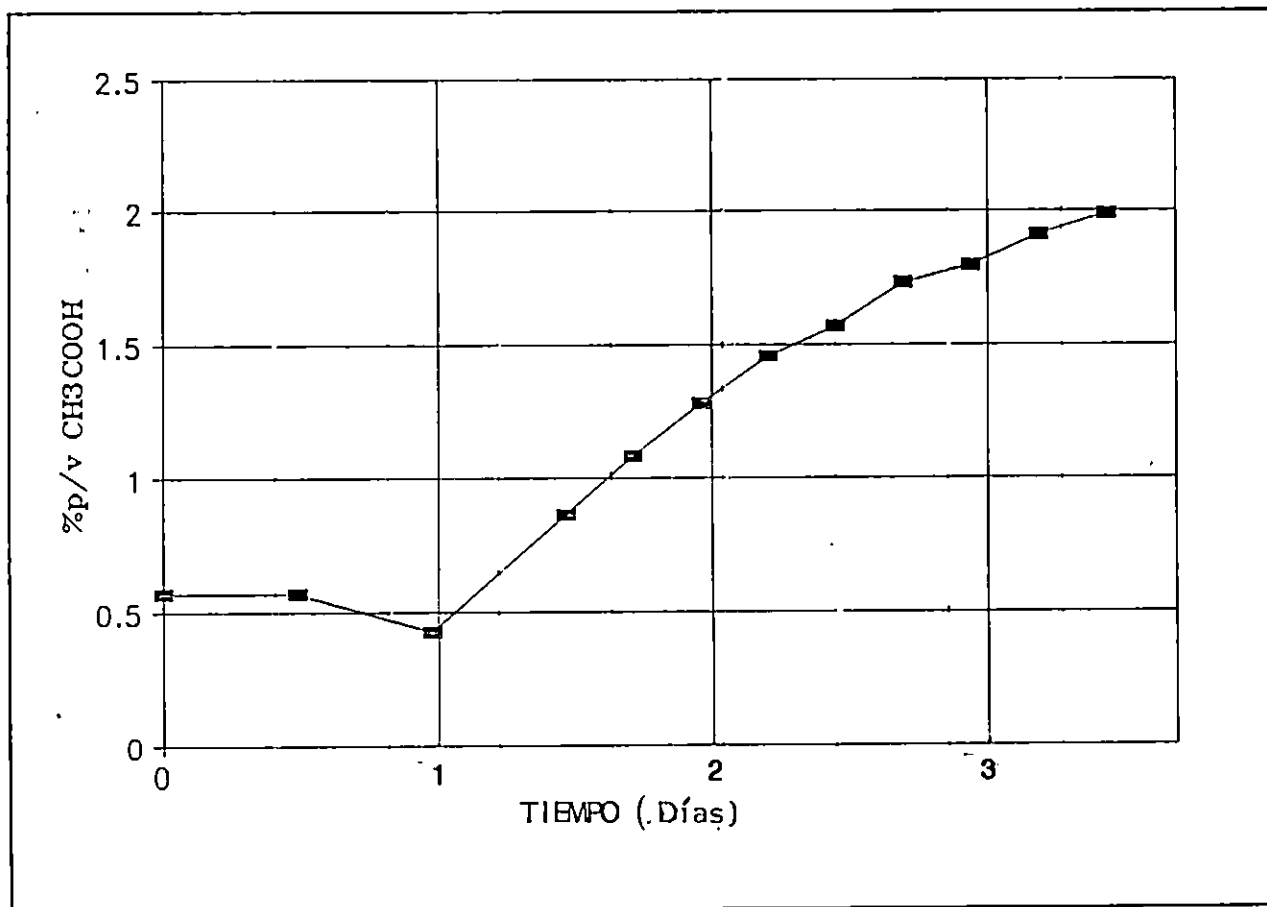


Figura 5.7 Comportamiento acidez-tiempo durante el crecimiento del inóculo en un reactor de 23 litros usando bacterias *Acetobacter sp* inmovilizadas sobre piedra pómez. Inóculo: *Acetobacter sp* acostumbrado al 11% v/v de etanol; medio alimentado: 10 litros de medio I al 7% v/v de etanol.

adición del etanol al proceso y la variación del nivel de aireación entrando en el mismo; manteniéndose como condiciones fijas el uso de medio de cultivo I y la adición de una cantidad total de etanol equivalente al 7% del volumen total de medio adicionado al acetador.

El nivel de aireación seleccionado para las pruebas osciló entre 5.39 y 4.02 L/min, valores que están por debajo del nivel de aireación máximo medido en el equipo que es de 9.46 L/min (Sección 4.4.2, pág. 35).

- a) Primera prueba: Consistió en la adición de una cantidad de etanol equivalente a la necesaria para mantener la concentración del 7% v/v de etanol en el medio de cultivo I que generó el crecimiento celular. Para determinar la cantidad de etanol a agregar, se hizo una evaluación del etanol remanente tal como se describe en el apéndice H. Se partió con una acidez inicial en el medio de 1.89% p/v y se empleó un flujo de aire de 5.39 L/min.
  
- b) Segunda prueba: Se realizó introduciendo medio I fresco al 7% v/v de etanol sobre 2.5 L de medio remanente de la prueba anterior, para completar 10 litros. La acidez al inicio de la prueba fue de 0.85% p/v, se usó un flujo de aire de 4.02 L/min (ver pág. 61, último párrafo).
  
- c) Tercera prueba: Similar a la anterior, con la variante

que el medio agregado (5.6 L) para completar 10 litros, tenía una concentración del 5% v/v de etanol. La cantidad que completaba el 7% v/v de etanol fue adicionado 5 días después del inicio del proceso. La concentración de acidez al inicio de la prueba fue de 1.11% p/v y el flujo de aire se mantuvo a 4.02 L/min.

La tabla 5.6 muestra las especificaciones de operación de cada una de las pruebas descritas de este proceso; y la figura 5.8 muestra los resultados de acidez en función del tiempo.

El volumen de medio de cultivo necesario para cubrir el lecho empacado sin crecimiento bacteriano fue de 10 litros, a medida que este crecimiento aumentaba, disminuyó la cantidad de medio necesario para cubrir el lecho; esta disminución fue del 11 y 19% para la segunda y tercera prueba respectivamente.

De acuerdo a la tabla 5.6 y figura 5.8, puede observarse que el tiempo de proceso para la primera prueba fue de 4 días alcanzando una concentración de ácido acético de 3.35% p/v; la segunda prueba de acetificación se rastreó durante 7 días, con una acidez evaluada de 3.12% p/v; el tiempo de proceso para la tercera prueba fue de 10 días, alcanzándose una concentración de ácido acético de 4.15% p/v.

El mínimo requerido de acidez en un vinagre comer-

cial, es del 4% p/v (ver apéndice A), sólo fue logrado en la tercera prueba ya que las dos primeras tuvieron que suspenderse debido a fallas en el equipo y en el proceso.

También puede observarse que el comportamiento acidez-tiempo es más pronunciado y más estable para la primera prueba de acetificación en la que se mantuvo un flujo de 5.39 L/min de aire; además existe similitud de la segunda y tercer prueba entre el tercero y sexto día del proceso; en los rangos restantes de tiempo el aumento de acidez es mayor para la tercera prueba.

Es de hacer notar, que el flujo máximo de aire (9.46 L/min) que presentaba un valor de  $klac^*$  más alto para el equipo fue evaluado para un sistema sintético que en cierta medida describía el comportamiento de la transferencia de oxígeno en el sistema pero sin la presencia de organismos vivos y de medio de cultivo, por lo que las condiciones de trabajo en la torre fueron fijadas a 5.39 L/min para el crecimiento del inóculo y la primera corrida, disminuyéndose hasta 4.02 L/min para las dos últimas pruebas debido a que con 5.39 L/min se presentaban problemas de lavado de células y evaporación de medio de trabajo.



TABLA 5.6

CONDICIONES DE TRABAJO PARA LAS PRUEBAS DE ACETIFICACION EN EL  
 REACTOR 23 LITROS, UTILIZANDO BACTERIAS *Acetobacter sp*  
 INMOVILIZADAS SOBRE PIEDRA POMEZ

	CORRIDA 1	CORRIDA 2	CORRIDA 3
Bacteria utilizada	<i>Acetobacter sp</i>	<i>Acetobacter sp</i>	<i>Acetobacter sp</i>
Tipo de proceso	discontinuo	discontinuo	discontinuo
Temperatura	Ambiente	Ambiente	Ambiente
Presión de trabajo	Atmosférica	Atmosférica	Atmosférica
Flujo de aire (L/min)	5.39	4.02	4.02
Volumen de medio alimentado (L)	0.8	6.4	5.6
Volumen de medio remanente (L)	9.2	2.5	2.5
Volumen total (L)	10	8.9	8.1
Concentración inicial de etanol (L)	7	7	5 <sup>a</sup>
Concentración final de etanol (% v/v)	3.05	2.10	0.95
Concentración inicial de ácido acético (% p/v)	1.89	0.85	1.11
Concentración final de ácido acético (% p/v)	3.35	3.12	4.15
Tiempo entre muestreo (h)	c/6	c/6	c/14 y c/10
Tiempo total de acetificación (días)	4	7	10
Rango de Porosidad del lecho	0.69-0.45	0.45-0.39	0.39-0.34
Relación altura de empaque/altura de columna	0.69	0.69	0.69

<sup>a</sup> El restante 2% se añadió posteriormente

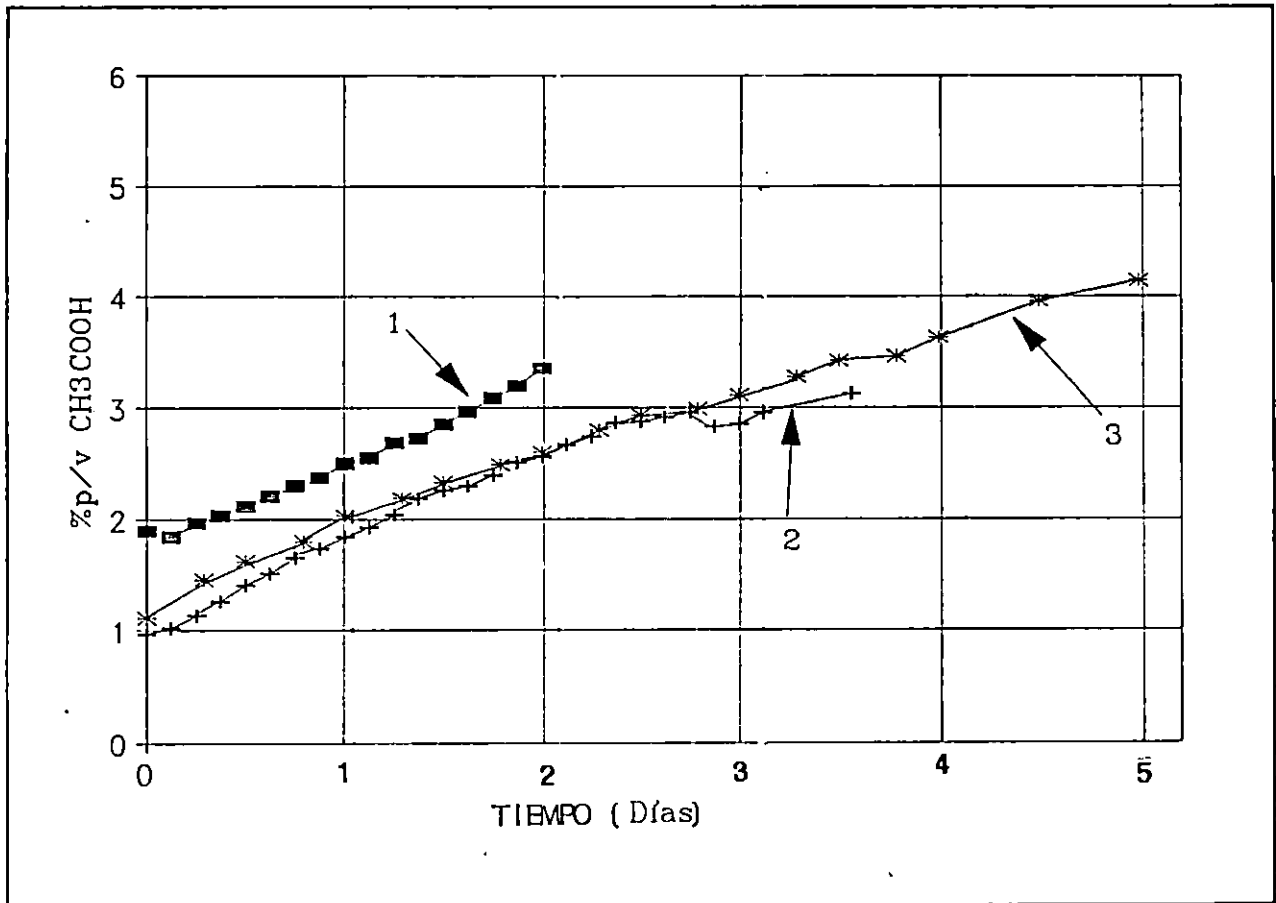


Figura 5.8 Resultados de la producción de acidez en función del tiempo de las pruebas de acetificación en el reactor de 23 litros de capacidad, usando bacterias de *Acetobacter sp* y piedra pómez como material de soporte. (1) primera prueba de acetificación a 5.39 L/min de aire; (2) segunda prueba de acetificación a 4.02 L/min de aire; (3) tercera prueba de acetificación a 4.02 L/min de aire.

5.4 EVALUACION DE RENDIMIENTOS DE LAS PRUEBAS DE ACETIFICACION EN EL REACTOR DE 23 LITROS DE CAPACIDAD USANDO BACTERIAS DE *Acetobacter sp* Y PIEDRA POMEZ COMO MATERIAL DE EMPAQUE.

El rendimiento de las pruebas de producción de ácido acético, en el reactor construido de 23 litros de capacidad, fue evaluado en base a la producción de ácido acético y al consumo de alcohol etílico partiendo de las ecuaciones 5.1 y 5.2 (Díaz y Díaz, 1991):

RENDIMIENTO EN FUNCION DEL ACIDO ACETICO PRODUCIDO:

$$Y_{Ac. Ac.} = \frac{\% \text{ p/v ácido acético final en el medio} - \% \text{ p/v ácido acético inicial en el medio}}{\% \text{ v/v de etanol en el medio}} \times 100 \quad (5.1)$$

RENDIMIENTO EN FUNCION DEL ALCOHOL ETILICO CONSUMIDO:

$$Y_{etanol} = \frac{(\% \text{ v/v}_{et. \text{ introducido}}) - (\% \text{ v/v}_{et. \text{ final}})}{(\% \text{ v/v}_{et. \text{ introducido}})} \times 100 \quad (5.2)$$

Donde  $Y_{Ac. Ac.}$  en la ecuación 5.1 es el rendimiento en función de la producción de ácido acético que expresa la cantidad en gramos de ácido producido durante el tiempo de proceso por cada 100 ml de etanol introducido al mismo;  $Y_{etanol}$  (ecuación 5.2) representa el rendimiento en función del consumo de alcohol etílico y expresa la cantidad en mililitros de etanol consumido du

rante el proceso por cada 100 ml de etanol introducido al mismo.

En la tabla 5.7 se presentan las evaluaciones de los rendimientos en función de la producción de ácido acético y del etanol consumido para cada prueba realizada. La figura 5.9 muestra el comportamiento rendimiento en ácido acético producido con respecto al tiempo.

De acuerdo a esta información los rendimientos en función de ácido acético producido para la primera, segunda y tercera prueba son respectivamente 21.49, 30.66 y 43.40 g de ácido acético por cada 100 ml de etanol introducido; mientras que el rendimiento en función de alcohol etílico consumido para las tres pruebas, presentan respectivamente valores de 56.43, 70 y 86.93 ml de etanol por 100 ml de etanol introducido. También puede observarse que el comportamiento rendimiento-tiempo de la primera prueba está por debajo de los otros dos, esto se debe a que la adición de etanol se realizó sobre el medio de cultivo que generó el crecimiento celular y que contaba con una acidez de 1.89% p/v. El comportamiento rendimiento-tiempo para la segunda y tercera prueba es similar durante los siete días en común en ambos procesos (figura 5.9).

Puede notarse, además, que la prolongación del tiempo de proceso para la tercera prueba, favoreció los valores de rendimientos en ácido acético y etanol para esta prueba que son los más altos detectados en las otras dos pruebas.

El grado de utilización del etanol introducido a cada

prueba para la producción de ácido acético puede calcularse en base a 100 ml de etanol introducido, considerando una densidad de etanol al 100% de 0.78075 g/ml y una relación estequiométrica de ácido acético producido por etanol reaccionado de 1.3036 g de ácido acético/g de etanol. En la tabla 5.8 se presentan los resultados de la evaluación del grado de utilización de etanol para cada prueba de acetificación.

TABLA 5.7

EVALUACION DE RENDIMIENTOS DE LAS PRUEBAS DE ACETIFICACION EN EL REACTOR DE 23 LITROS USANDO BACTERIAS DE *Acetobacter sp* Y PIEDRA POMEZ COMO MATERIAL DE SOPORTE<sup>a</sup>.

Prueba	TIEMPO DE PROCESO (DIAS)	ACIDEZ ALCANZADA	$Y_{ac.ac.}$ (g de ácido acético por 100 ml de etanol)	$Y_{etanol}$ (ml de etanol por 100 <sup>b</sup> ml de etanol)
1	4	3.35	21.49	56.43
2	7	3.12	30.66	70.00
3	10	4.15	43.40	86.93

<sup>a</sup> Los datos para el cálculo de los rendimientos han sido tomados de la tabla 5.7 de la sección 5.3.3

<sup>b</sup> Se refiere a 100 mililitros de etanol introducido al proceso

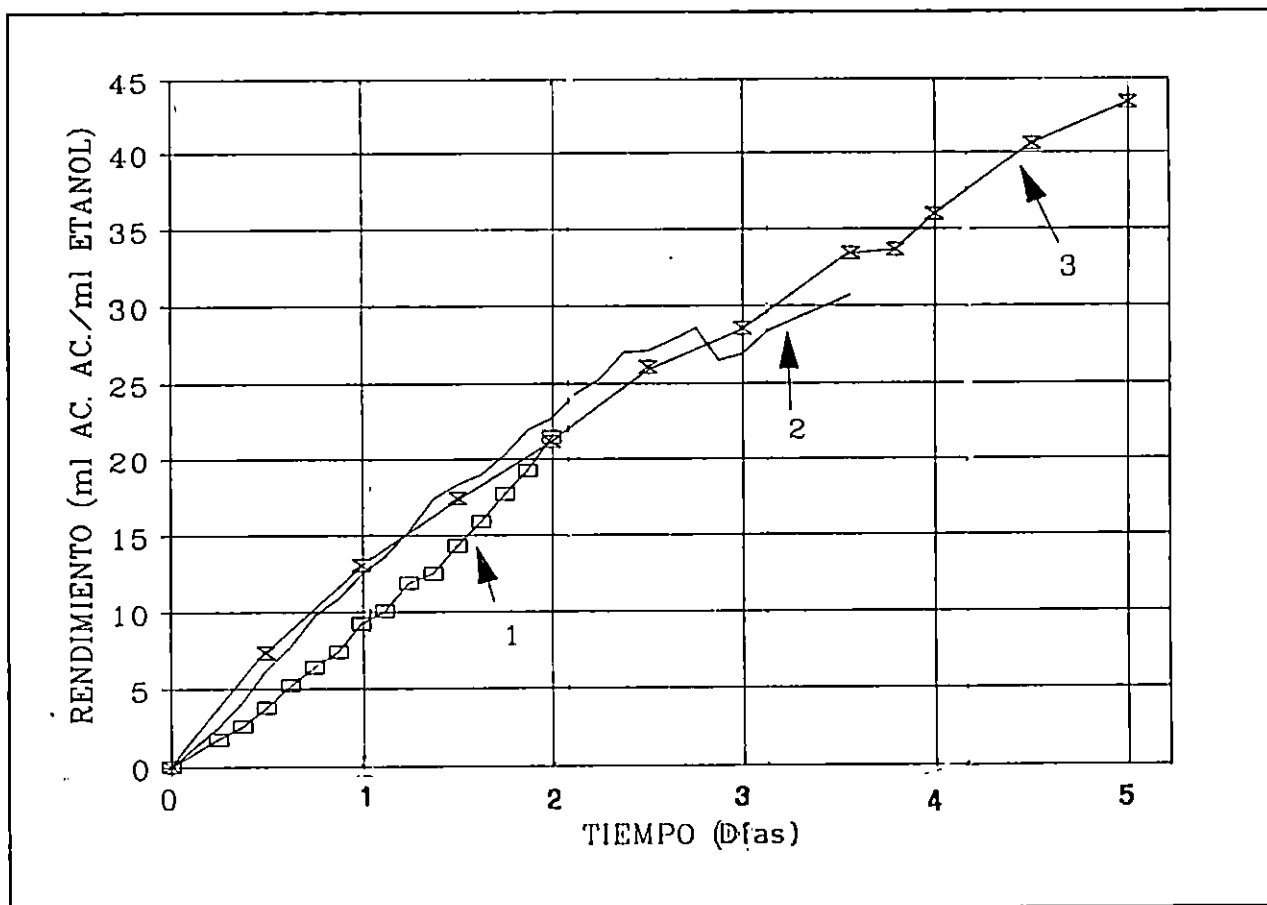


Figura 5.9 Comportamiento  $Y_{ac.ac.}$  en función del tiempo para las pruebas de acetificación en el reactor de 23 litros usando bacterias *Acetobacter sp* y piedra pómez como material de soporte. (1) primera prueba de acetificación a 5.39 L/min de aire; (2) segunda prueba de acetificación a 4.02 L/min de aire; (3) tercera prueba de acetificación a 4.02 L/min de aire.

TABLA 5.8

GRADO DE UTILIZACION DE ETANOL PARA LAS PRUEBAS DE ACETIFICACION  
 EN EL REACTOR DE 23 LITROS USANDO BACTERIAS DE *Acetobacter sp*  
 Y PIEDRA POMEZ COMO MATERIAL DE SOPORTE

PRUEBA	g de ácido acético producido	ml de etanol consumido <sup>a</sup>	g teóricos de ácido acético	% de utilización de etanol
1	21.49	56.43	57.45	38.00
2	30.66	70.00	71.27	44.00
3	43.40	86.43	88.48	48.60

<sup>a</sup> El método para determinar alcohol remanente presente en el medio agotado y los valores obtenidos en las tres pruebas, los cuales sirvieron de base para determinar el volumen de alcohol consumido en el proceso, se presentan en el apéndice H y tabla H-1.

## 6.0 OBSERVACIONES

- 1- Para el diseño del acetador se partió de estructuras ya existentes (como el cuerpo de la torre, la bomba, el compresor, etc.), y en base a esto se realizó el diseño del resto del acetador; lo que determinó los 23 litros de capacidad total del equipo que incluye el material de soporte y el medio de cultivo.
- 2- Con el tratamiento de lavados con ácido clorhídrico y agua desmineralizada aplicado a la piedra pómez se persigue eliminar impurezas presentes en ésta, tales como hierro, cobre, plomo y zinc hasta un nivel en el cual éstos no solubilicen en cantidades que puedan inhibir la bacteria acética.
- 3- Para decidir el uso y tamaño de piedra pómez con la que se trabajó, se toman en cuenta los siguientes aspectos: porosidad, superficie de contacto piedra pómez-bacteria, atrapamiento de aire en los agujeros de la piedra y apelmazamiento del lecho; aspectos que favorecen la formación de la capa de bacterias y su desarrollo.
- 4- *Acetobacter pasteurianum* soportó una concentración máxima de etanol de 9% v/v en el medio, alcanzó 3.52% de acidez en 30 días con medio I, y presentó mejor crecimiento en medio II; Siendo razonablemente superada por la cepa *Acetobacter sp.* la cual alcanzó un 5.91% p/v de acidez en 30 días a una concentración del 7% v/v de etanol; por lo que el resto de la experimentación se



realizó con esta última.

- 5- Se efectuaron monitoreos de acetificación con las siguientes variaciones: con o sin aplicación de aireación por medio de bombas, agregando o no etanol, adicionando o no medio a la misma concentración de etanol original. Monitoreos efectuados previos a las pruebas en el acetador con capacidad para 10 litros de medio de cultivo, resultando que las mejores condiciones de trabajo a utilizar en el acetador fueron: medio I con etanol al 7% v/v.
- 6- El crecimiento de la bacteria acética en el reactor fue abundante al tercer día de la inoculación, lo que resulta ventajoso si se considera que en un proceso industrial similar al realizado se logra crecimiento bacteriano después de 17 a 21 días de la inoculación; sin embargo, es necesario realizar más pruebas para determinar el tiempo promedio que el inóculo de la cepa aislada *Acetobacter sp.* tarda en presentar un crecimiento abundante; pues en este estudio solamente se efectuó una prueba con inoculación inicial.
- 7- En las pruebas realizadas no fue necesario aplicar un nivel de aireación alto para lograr un crecimiento bacteriano rápido y abundante, como pudo comprobarse en las pruebas en reactores a escala de 250 ml de medio de cultivo en los que no hubo aireación mecánica, así como también en las pruebas de acetificación en el

reactor a bajos niveles de aireación (segunda y tercera prueba).

- 8- Los discos de soporte de la piedra pómez se deformaron por el calor aplicado en la esterilización, obligando a acortar el tiempo de esterilización de la columna de acetificación a 5 minutos; sin embargo, no se observó contaminación mientras la torre de acetificación estuvo en operación.
  
- 9- Las estructuras de aluminio son sencibles a la acción del sulfito de sodio por lo que es necesario aplicar un lavado al sistema con agua desmineralizada después de cada prueba de oxidación de sulfito de sodio a sulfato.

## 7.0 CONCLUSIONES

- 1- El medio I (tabla 5.2) con una concentración de etanol de 7% v/v de etanol constituyó el medio de crecimiento y de trabajo satisfactorio para la bacteria aislada, (*Acetobacter sp*) y no para la cepa comercial obtenida (*Acetobacter pasteurianum*), como pudo comprobarse en las pruebas a escala de 250 ml de medio de cultivo.
- 2- El comportamiento acidez-tiempo para las pruebas a 250 ml de medio de cultivo permitió determinar el uso del medio I al 7% v/v de etanol, para las pruebas de escalamiento en el acetador construido.
- 3- El comportamiento acidez-tiempo en la primera prueba de producción de ácido acético en el reactor de 23 litros fue mejor que el de la segunda y tercera prueba, sin embargo el comportamiento rendimiento-tiempo fue inferior, considerándose como causa de esta variación la forma de adición de etanol a los procesos, ya que en la primera prueba, el etanol fue adicionado sobre un medio ya procesado que contaba con un porcentaje de acidez elevado (secciones 5.3 y 5.4).
- 4- Comparando el rendimiento en función del ácido acético producido con el rendimiento en función del etanol consumido, se observa que el porcentaje utilización de etanol para la producción de á-

cido está por debajo del 50% para las tres pruebas realizadas. Esta subutilización de etanol en el proceso es en parte consecuencia de la evaporación acelerada por el paso del aire a través de la columna. Otra causa de esta deficiencia puede ser la sobreoxidación y la abundancia de bacterias que consumen simultáneamente el etanol y el ácido producido.

- 5- El equipo construido para el proceso de acetificación permite trabajar hasta un flujo máximo de 9.46 L/min. Debido a las limitaciones en los aparatos de medición de flujo de aire no se realizaron pruebas a mayores niveles de aireación, lo que significa que puede encontrarse un coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno mayor o llegar a obtener un valor constante, por lo que el valor del  $klac^*$  de 0.379 milimoles de  $O_2/L\text{-min}$  puede no ser el máximo para el equipo de acetificación construido.

## 8.0 RECOMENDACIONES

- 1- Se recomienda un estudio más detallado de todas las variables que puedan afectar al proceso de producción de ácido acético en estudio, como el flujo de aire, concentración de etanol, diámetro de la piedra pómez, tipo de sustrato, tipo de proceso, nivel de recirculación, etc. Este estudio debe evidenciar el efecto que causa cada variable sobre el proceso, para seleccionar aquellas que ejerzan un efecto significativo sobre el mismo y de esta manera propiciar investigaciones que lleven a la optimización del proceso. En el anexo I se presenta el diseño estadístico experimental recomendado para evaluar la optimización del flujo de aire, diámetro de la piedra pómez a utilizar y tiempo de residencia en el reactor.
- 2- Se recomienda investigar más a fondo las causas de los bajos rendimientos y de la subutilización del etanol en el proceso. Una medida inmediata es la instalación de un condensador en la parte superior de la columna y la determinación del nivel de sobreoxidación de la bacteria aislada.
- 3- Es recomendable la reformulación del medio de crecimiento y de trabajo para la *Acetobacter pasteurianum* así como la investigación de los parámetros óptimos de operación de la misma.
- 4- En vista de la calidad del producto obtenido (en cuanto al grado

de acidez alcanzado), puede plantearse su uso como un vinagre o solución acuosa de ácido acético para la industria alimenticia. Una justificación económica de este planteamiento es que el nivel de importación de este producto también es significativo pues su demanda se incrementó en los últimos años. Es de aclarar que no se efectuaron las pruebas de calidad para vinagres, planteados en el anexo A; por lo que se recomienda su realización y de esta manera definir la calidad del vinagre que se obtiene del proceso en estudio.

## 9.0 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- Bailey, J. E.; Ollis, D. F., "Biochemical Engineering Fundamentals", 2° Edition, McGraw-Hill Book Company, 1986.
- 2- Breed, S. R.; Murray E. G.; Smith, R., "Berguey's Manual of Determinative Bacteriology", 7° Edition, The Williams and Wilkins Company, 1974.
- 3- Cazares M., M.G., "Estudio Experimental sobre Concreto Liviano de Pómez", Trabajo de Graduación presentado previa opción al título de Ingeniero Civil, Universidad de El Salvador, 1976.
- 4- Chibatta, J. T.; Tosa, M. Sujimura; "Immobilized Living Microbial Cells", Annual Reports of Fermentation Processes, 1983.
- 5- Cochran, W. G.; Cox, G. N., "Diseños Experimentales", 1° Edición, Editorial Trillas, México, 1978.
- 6- Defigueiredo, M. P.; Splittoesser, D. F.; "Food Microbiology: Public Heat and Spoilage Aspects", 1° Edition, The AVI publishing Company Inc., Connecticut U.S.A., 1976.
- 7- Díaz Hernández, M. A.; Hernández, J. C.; Tobar Osorio, C. A., "Estudio Experimental sobre Concreto Ligero de Piedra Pómez", Trabajo de Graduación, previa opción al título de Ingeniero Civil, Universidad de El Salvador, 1978.
- 8- Díaz Meléndez, A. C.; Díaz Piloña, M. G., "Producción de Acido Acético a partir de Alcohol Etílico Industrial", Trabajo de Graduación, previa opción al título de Ingeniero Químico, Universidad de El Salvador, 1991.

- 9- Aguilar, L. A.; Gerente de Producción de Destilería Salvadoreña, Apopa, San Salvador, El Salvador; Entrevista personal, Mayo, 1993.
- 10- Segura Lemus, V. M.; Profesor Titular de la Escuela de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad de El Salvador, Entrevista personal, Junio, 1993.
- 11- Ramírez Treminio, Rodolfo; Jefe del Departamento de Producción de Destilería Salvadoreña, Apopa, San Salvador, El Salvador; Entrevista personal, Mayo, 1994.
- 12- Jorgensen, A., "Microbiología de las Fermentaciones Industriales", 7<sup>a</sup> Edición, Editorial Acribia, España, 1951.
- 13- Kirk, R. E.; Othmer, D. F., "Enciclopedia de Tecnología Química", 1<sup>a</sup> Edición, UTEHA, México, 1966.
- 14- Mc Cabe, W. I., Smith, "Operaciones Básicas de Ingeniería Química", 1<sup>a</sup> Edición, Editorial Reverté S. A., España, 1981.
- 15- Pearson, D., "The Chemical Analysis of Food", 7<sup>th</sup> Edition, Chemical Publishing Company, New York, 1975.
- 16- Perry, R.H.; Chilton, C. H., "Manual del Ingeniero Químico", 2<sup>a</sup> Edición, Editorial McGraw-Hill, México, 1984.
- 17- Prescott, S. C.; Dunn, C. G., "Microbiología Industrial", 2<sup>a</sup> Edición, Editorial Aguilar S. A., España, 1952.
- 18- Totman, R. S.; "Scaling Using  $k_{lac}$  in Bioreactors", Chemical Engineering, Vol. 92, #2, U.S.A., February, 1985.
- 19- Treybal, R. E., "Operaciones de Transferencia de Masa", 2<sup>a</sup> Edición, McGraw-Hill, México, 1988.
- 20- Jandel Scientific Tablecurve Software, versión 3.10, U.S.A., 1992.



# APENDICES

## APENDICE A

## ANALISIS DE CALIDAD PARA VINAGRES

Los principales tipos de examinación requeridos en muestras de vinagre y productos artificiales de acuerdo con requerimientos legales se presentan a continuación, siendo aconsejable examinar las muestras en el siguiente orden: acidez total, cenizas, preservativos, arsénicos, cobre, plomo, zinc, valor de oxidación alcalina, valor de ionización y una prueba cualitativa para acidez mineral. En la tabla A.1 se presentan perfiles analíticos aceptados por muchos años como típicos para varios tipos de vinagres (Pearson, 1975).

- a) Gravedad específica. Un vinagre conteniendo 5% de ácido acético tendrá una gravedad específica de 1.019.
- b) Acidez total. Diluir 10 ml de una muestra de vinagre con agua en un tazón de porcelana, añadir fenolftaleína y titular con NaOH 0.5 M. Agitar constantemente.

Acidez total:  $\text{Titulación} * 0.3 = \% \text{ p/v como ácido acético}$

La acidez total no debe ser menor de 4%. Productos de buena calidad contienen un mínimo de 5%. La actividad de microorganismos y anguílulas de vinagre causan disminución en la acidez.

TABLA A-1  
PERFILES TIPICOS DE VINAGRES Y CONDIMENTOS NO FERMENTADOS

	VINAGRE DE MALTA	CONDIMENTO NO FERMENTADO	VINAGRE DE SIDRA	VINAGRE DE VINO	VINAGRE ESPIRITUOSO (CONCENTRADO)
Gravedad específica	1.013-1.022	1.007-1.022	1.013-1.024	1.013-1.021	0.015-1.020
Acidez total como ácido acético (%)	4.3-5.9	4.1-5.3	3.9-9.0	4.4-7.4	11.5-12.2
Acidez fija como ácido acético (%)	0.2-0.4	despreciable	0.1-0.2	-	-
Acido málico (%)	-	-	0.07-0.16	-	-
Sólidos totales (%)	1.4-3.5	0.1-0.45	1.9-3.5	1.4-3.2	0.15-0.60
Ceniza total (%)	0.18-0.45	0.02-0.05	0.2-0.45	0.16-0.69	0.02-0.05
Alcalinidad de cenizas (ml 0.01 N/ml)	-	-	2.2-4.0	-	-
Nitrógeno total (%)	0.04-0.14	0.00-0.02	-	-	0.003-0.030
Acido fosfórico como P2O5 (%)	0.05-0.12	0.00-0.02	0.04-0.3	-	0.05
SO3 (%)	0.05-0.12	0.00-0.01	-	-	-
Cloruro de sodio (%)	0.15-0.25	0.01-0.12	-	-	-
Azúcares totales (%)	-	-	0.15-0.7	0.22-0.56	-
Alcohol (%v/v)	-	-	0.03	-	0.15
Índice de oxidación	500-1800	0.0-20	arriba de 3500	600-2000	90-650 (1)
Índice de oxidación alcalina	70-180	0.0-10	-	60-180	3-20 (1)
Índice de yodo	380-1500	0.0-25	-	380-1000	5-30 (1)
Índice de ésteres	30-140	0.0-15	-	50-220	0-20 (1)

(1) Calculado para 5% de ácido acético

(Ref. Pearson, 1976)

- c) Acidez volátil. Destilar 10 ml de la muestra en un aparato de destilación Kjeldhal y titular el destilado con NaOH 0.5 M utilizando fenolftaleína como indicador. A la vez evaporar 10 ml de muestra un mínimo de 5 veces con agua, titular la acidez fijada y calcular la acidez volátil por diferencia.
- d) Sólidos totales. Evaporar 25 ml de muestra en un disco de platino y secar a peso constante en un horno a 100 °C. La acidez volátil que tiende a quedar particularmente en los sólidos totales, puede ser removida por tres evaporaciones con agua.
- e) Cenizas. Encender los sólidos totales a la más baja temperatura posible. Si gran cantidad de cenizas son obtenidas, las sales también pueden ser determinadas.
- f) Nitrógeno. Se determina por el método de Kjeldhal en 25 ml de muestra. La titulación con formol también puede ser aplicada.
- g) Fosfatos. Se determina de las cenizas o preferiblemente después de la oxidación por vía húmeda.
- h) Metales. Se examina la muestra para arsénico, cobre, plomo y zinc.
- i) Acidez mineral. Trazas de sulfato estan usualmente presentes en el vinagre, pero si exceden de 0.03% (como ácido sulfúrico) se debe de tener precaución. La presencia de acidez mineral puede ser detectada por la siguiente prueba: mezclar 2 ml de muestra con 2 ml de alcohol y añadir 2 gotas de anaranjado de metilo. Un color rojo indica un bajo pH debido a la presencia de acidez mineral. El pH de productos conteniendo 4% de ácido acético raras veces disminuye a 2.9 para vinagre de malta y 2.5 para productos

artificiales.

El ácido sulfúrico presente puede ser estimado por el método de Hehner; el cual está basado en el hecho de que las cenizas de vinagre genuino presenta reacción alcalina. La presencia de acidez mineral es improvable si la ceniza es alcalina al tornasol (Pearson, 1975).

## APENDICE B

## MATERIALES DE CONSTRUCCION PARA PROCESOS DE ACETIFICACION

El cuerpo de la torre puede ser de madera, metal, porcelana química, ladrillo a prueba de ácidos, vidrio, plástico, metal cubierto de plástico o vidrio, u otro material, según las condiciones de corrosión. Para facilitar su construcción y aumentar su resistencia, generalmente son circulares en la sección transversal (Treybal, 1988).

Se requiere de mucha destreza en el diseño, fabricación y mantenimiento del equipo para el manejo del ácido acético glacial que en presencia de aire es sumamente corrosivo. El Durirón, la Plata y el Tantalio son los únicos metales comerciales que resisten el uso prolongado. El trabajo del metal ha de ser lo menor posible para reducir la corrosión local (Kirk et. al., 1966).

El aluminio tiene ventajas en algunos aparatos del equipo ya que la disolución de una cantidad muy pequeña del metal no da color al ácido. El índice de corrosión del aluminio por el ácido acético alcanza el máximo en solución relativamente diluída como se muestra en la tabla B-1 (Kirk et. al., 1966).

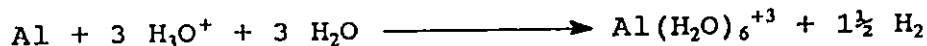
Las corrosiones expresadas en la tabla B-1 se pueden atribuir, al menos en parte, a la hidratación del ión trivalente del aluminio. La disolución del aluminio en soluciones de ácido se puede representar como una reacción entre el aluminio y el ión hidronio ( $H_3O^+$ ). El ión aluminio que forma es hidratado:

TABLA B-1

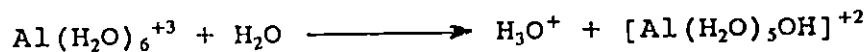
## CORROSION DEL ALUMINIO POR EL ACIDO ACETICO

CONCENTRACION DE ACIDO ACETICO %	CORROSION DEL ALUMINIO AL AÑO (MICRAS)
0.2	15
0.5	61
1.0	406
5.0	269
10.0	168

(Ref. Kirk, et. al., 1966)



El ión  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{+3}$  reacciona luego con agua de la siguiente manera:



Las reacciones sucesivas del mismo tipo conducen a  $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2]^+$  y  $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})_3] \cdot x\text{H}_2\text{O}$ . Hay, pues una sucesión de hidrólisis favorecidas por la gran cantidad de agua de las soluciones diluidas lo que origina la formación de hidróxido de aluminio hidratado como producto final. En soluciones más concentradas, que suministran más iones hidronios, el equilibrio se desplaza en sentido opuesto lo que ocasiona la formación de  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{+3}$  como producto final. El aumento de la concentración de  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{+3}$  reduce la corrosión, pues, según la teoría de Nernst acerca de los potenciales de disolución al aumentar la concentración de iones de un metal en solución, el potencial de disolución de ese metal se vuelve menos negativo (Kirk et. al., 1966).

La presencia de  $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})_3]_x\text{H}_2\text{O}$  también reduce la corrosión pues se deposita y forma una película protectora sobre el metal. Ambos productos finales de la serie de hidrólisis, reducen la corrosión, pero hay una corrosión intermedia de ácido, en la cual la corrosión alcanza su máximo grado (Kirk et. al., 1966).

Al aumentar aún más la concentración del ácido, ocurren variaciones más complejas en la velocidad de corrosión. La figura B-1 indica el índice de corrosión del aluminio industrial a diferentes temperaturas en concentraciones de ácido acético hasta de 100% (Kirk et. al., 1966).

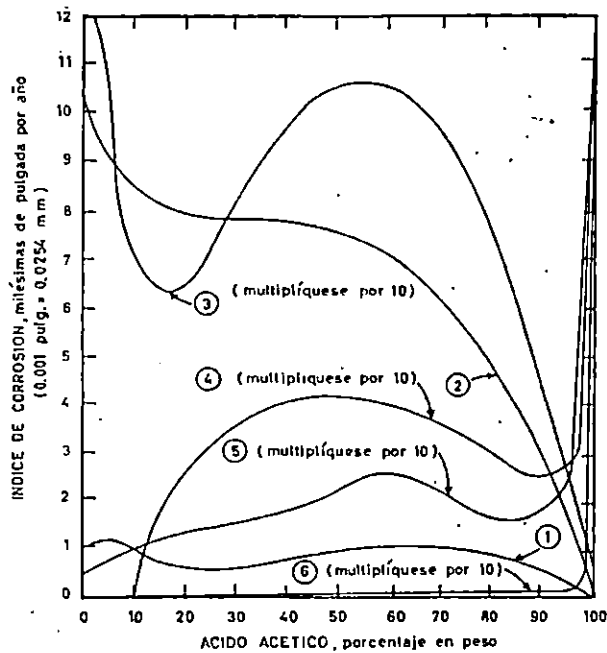


Figura B-1 Corrosión de aluminio y acero inoxidable 18-8 en ácido acético acuoso (Kirk, et. al., 1966).



Los aceros inoxidable son eficaces por el óxido superficial resistente que forman. La formación de esta película es función del tiempo. Al quedar el metal pasivo expuesto a la acción del ácido, se disuelve lentamente la capa de óxido, pero con mayor rapidez que la de su formación en el líquido, cuando el metal se vuelve a poner en contacto con el aire, se forma rápidamente el óxido. Es probable que con el tiempo la película se aproxime asintóticamente a un espesor determinado (Kirk et. al., 1966).

Los hierros de alto porcentaje de silicio (14.5% Si, 0.75% Mg, 0.9% máx C) son resistentes al ácido acético en todas las condiciones de temperatura, concentración y grado de aireación, a condición de que los vaciados sean sanos y no contengan escoria ni inclusiones de carbón. Por desgracia, esta clase de aleación tiene uso limitado por las dificultades que ofrece su fabricación. Tiene que ser colada y no admite otro trabajo a máquina que el esmerilado. Es muy quebradiza y está expuesta a fracturarse por choque térmico (Kirk et. al, 1966).

Se usa mucho el cobre cuando es posible excluir el aire. En tal caso es mínima la corrosión, y se pueden manejar todas las concentraciones del ácido a la temperatura de ebullición. El cobre aventaja a los demás metales y aleaciones que se pueden usar en virtud de la facilidad con la que se manufactura y su bajo costo. La plata no es atacada por el ácido acético glacial hirviendo, ni aún en presencia de aire, por consiguiente, se utiliza para la fabricación de condensadores de ácido acético glacial. Para reducir el costo del equipo se usa la plata en revestimiento, que se hace y colo-

ca a la medida o se pone en caliente para que ajuste por contracción (Kirk et. al., 1966).

El Hastelloy resiste el efecto corrosivo del ácido puro hirviendo, pero su alto costo restringe su aplicación a aquellos casos en que se utiliza ácido en presencia de agentes más corrosivos, como el cloro o el ácido sulfúrico (Kirk et. al., 1966).

El níquel y el metal monel son apropiados para soluciones sin aire y a baja temperatura. A temperaturas altas en presencia de aire, se restringe mucho su uso (Kirk et. al., 1966).

Por extensos ensayos realizados con numerosas aleaciones, se conoce la resistencia de éstas a la corrosión por ácido acético glacial hirviendo (Tabla B-2).

Los materiales de construcción enumerados en la tabla H-3 se recomiendan para aplicaciones diversas en las condiciones habituales. La madera es el material más conveniente desde el punto de vista de la duración y el costo mínimo de mantenimiento, aunque no siempre es el más barato (Kirk et. al., 1966).

El tetrafluoroetileno (Teflón, TFE) es un producto que ha logrado gran aceptación en usos industriales gracias a las nuevas técnicas de aplicación. Los métodos usados en la metalurgia de polvos se han aplicado al moldeo del teflón. Se preforma a temperatura ambiente a presiones entre 140 y 170 Kg/cm<sup>2</sup> y se sinteriza luego a 365-393 °C, en estado de gel. La cantidad de fluencia es muy pequeña comparada con la de las resinas termoplásticas comunes. Se puede conformar en cinta, o como recubrimiento sobre alambre (Perry & Chilton, 1984).

TABLA B-2

## RESISTENCIA DE ALEACIONES A LA CORROSION POR ACIDO ACETICO

ALEACION	PENETRACION POR AÑO (MICRAS)
18-8 Cr-Ni (con poco carbono)	2.410
24% de Cr (con poco carbono)	19.560
30% de Cr (con poco carbono)	3.300
18% Cr; 8% Ni; Mo	0.145
24% Cr; 12% Ni; Mo	0.460
35% Cr; 5% Ni; Mo	0.112
Elcomet K	0.500
La Bour G-60	0.760
Hastelloy G	3.810
Illium G	1.520
Metal "Pioneer"	7.620
Durimet T	2.540
Aluminio 2S	134.620
Pfaudlerware N°42	1.040
Pfaudlerware N°42 PF	2.100

(Ref. Kirk et. al., 1966)

El teflón tiene excelente resistencia a casi todos los productos químicos y los disolventes; buena resistencia al calor; propiedades excepcionalmente buenas a bajas temperaturas. Relativamente poca compresibilidad y baja elasticidad. En forma de dispersión acuosa se aplica también el teflón como revestimiento y como material de impregnación (Kirk, et. al., 1966; Perry & Chilton, 1984).

TABLA B-3

## MATERIALES DE CONSTRUCCION PARA EQUIPO DE ACIDO ACETICO

EQUIPO	PARA ACIDO DEBIL		PARA ACIDO FUERTE (CALIENTE O FRIO)
	CON AIRE	SIN AIRE	EXENTO DE AIRE
Tanques	Madera	Madera	Aluminio, Acero inoxidable.
Tubería	Aceros inoxidable 430 y 316, Everdure, Herculloy, cobre, vidrio, cerámica.	Everdure, Herculloy, Cobre, Vidrio.	Acero inoxidable N° 316, Aluminio, Vidrio, Cobre,
Válvulas	Worthite, Durirón, Acero inoxidable 316, Bronce de aluminio, Everdure.	Durirón, Everdure, Bronce de aluminio.	Worthite, Durirón, Acero inoxidable 316, Bronce de aluminio, Aluminio.
Cambiadores de Calor	Acero inoxidable 430, Everdure, Herculloy, Vidrio.	Everdure, Cobre, Vidrio.	Aluminio, Acero inoxidable 316, Everdure, Vidrio, Cobre.
Bombas	Worthite, Durirón, Hastelloy B y C, Acero inoxidable (con poco carbono y molibdeno), Herculloy, Everdure, Bronce de aluminio.	Worthite, Durirón, Acero inoxidable, Bronce de aluminio, Everdure, Bronce.	Worthite, Durirón, Acero inoxidable (con poco carbono, alto porcentaje de molibdeno), Bronce de aluminio.
Destiladores		Cobre	Cobre, Acero inoxidable 316, Aluminio
Reactores			Durirón, Acero inoxidable, Aluminio, Cerámica.
Condensadores			Plata pura, Vidrio.

(Ref. Kirk et. al., 1966)

El cloruro de polivinilo (PVC), tiene excelente resistencia a gran número de productos químicos, entre ellos los ácidos corrientes, bases y sales orgánicas casi en todas las condiciones y a temperaturas hasta 160 °F (71 °C). La resistencia a algunos compuestos químicos orgánicos como acetaldehído, alcohol butílico, tetracloruro de carbono, alcohol etílico, glicerol y alcohol metílico es también excelente. No se recomienda su uso con acetona, cetonas, éteres o hidrocarburos aromáticos y clorados (Perry & Chilton, 1984).

Las propiedades físicas del PVC sin plastificar lo hacen apropiado para la fabricación de muchos tipos de equipo químico, como tanques de reacción, torres, conductos y campanas inatacables por los humos, bombas, ventiladores, tuberías y válvulas. Su resistencia a algunos químicos se muestra en la tabla B-4 (Kirk et. al., 1966).

Las piezas de PVC se unen entre sí por cementación química o por pernos, roblones o por soldadura (por gas caliente, fricción o alta frecuencia) (Kirk, et. al., 1966; Perry & Chilton, 1984).

TABLA B-4

## RESISTENCIA QUIMICA DEL PVC

COMPUESTO	PVC
10% ácido acético (CH <sub>3</sub> COOH)	Excelente
Sulfato de Cobre (CuSO <sub>4</sub> )	Excelente
Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Excelente

Las clasificaciones son para exposiciones prolongadas a temperatura ambiente (menores que 100 °F)

(Ref. Perry, et. al., 1984)

El vidrio es un producto inorgánico de fusión que se ha enfriado hasta adquirir un estado rígido sin ninguna cristalización (ASTM). En el mercado se encuentran gran diversidad de composiciones (Tabla B-5), se caracteriza por su transparencia, dureza y resistencia al rayado, lisura, inercia química, excelentes propiedades de aislamiento eléctrico y dieléctricas, es un material refractario, no es poroso y tiene un coeficiente de dilatación calorífica muy elevada (Kirk et. al., 1966).

En este caso, de las propiedades más importantes se tiene su inercia química. La excelente resistencia, incluso a temperaturas bastante elevadas y a las reacciones con casi todos los compuestos químicos es la razón por la cual se usan utensilios de vidrio en la ciencia química. En general el vidrio tiene una resistencia buena o excelente a la corrosión y de ahí su uso en tuberías, bombas, columnas y otros elementos de las fábricas de productos químicos en los cuales se están empleando condiciones corrosivas cada día más fuertes. La insignificante reacción del vidrio en otras aplicaciones da como resultado la no contaminación de los materiales que están en contacto con él. Esa elevada resistencia a la corrosión por los ácidos, salvo el fluorhídrico, permite la limpieza y la esterilización rigurosas, cuando así se requiera.

La lisura facilita la limpieza de la superficie y el mantenimiento de condiciones estériles; se reduce al mínimo la adherencia y la acumulación de materiales extraños (Kirk, et. al., 1966)

TABLA B-5  
COMPONENTES DE VIDRIOS COMERCIALES

COMPONENTE	SODICO CALCICO	PLOMO	BOROSI- LICATO	96% SILICE	VIDRIO DE SILICE
SiO <sub>2</sub>	70-75	53-68	73-82	96	99.8
Na <sub>2</sub> O	12-18	5-10	3-10	-	-
K <sub>2</sub> O	0-1	1-10	0.4-1	-	-
CaO	5-14	0-6	0-1	-	-
PbO	-	15-40	0-10	-	-
B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	5-20	3	-
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.5-2.5	0-2	2-3	-	-
MgO	0-4	-	-	-	-

(Ref. Kirk, et. al., 1966)

## APENDICE C

DETALLE DE LAS PARTES COMPONENTES DEL EQUIPO DE  
ACETIFICACION

Figura C-1 Orificio de descarga de producto terminado.

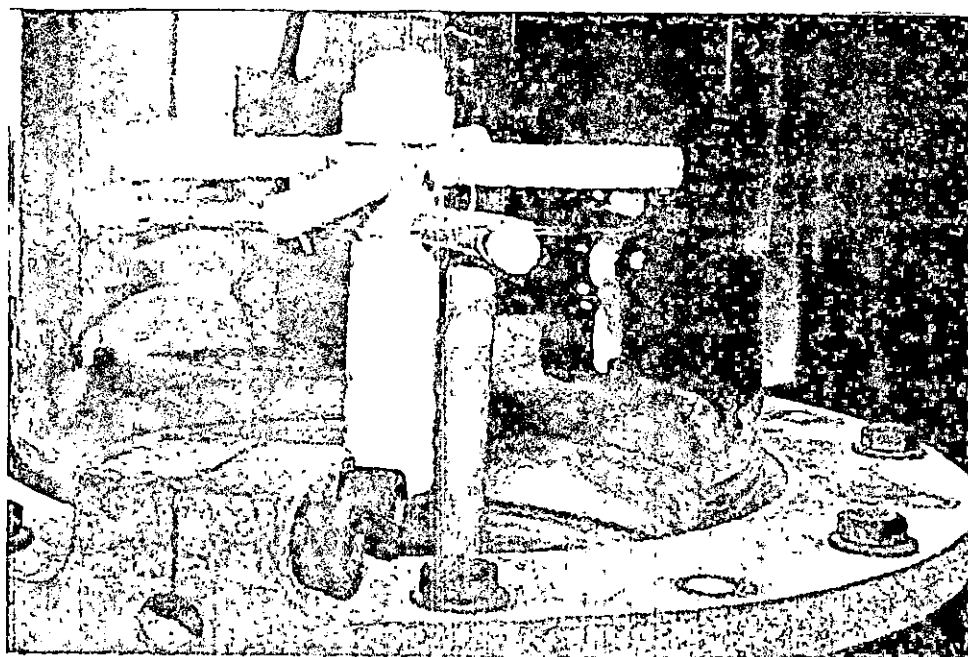


Figura C-2 Tubo de toma de muestras y tubos aireadores.



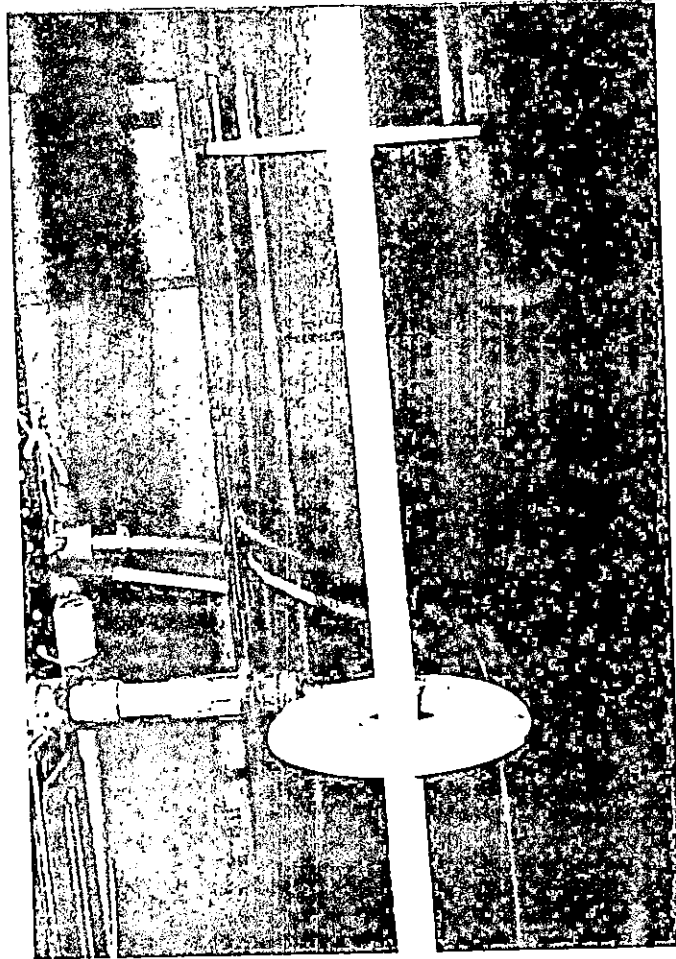


Figura C-3 Discos de soporte de la piedra pómez.



Figura C-4 A la izquierda, tubo de entrada de aire, a la derecha, salida de toma de muestra.

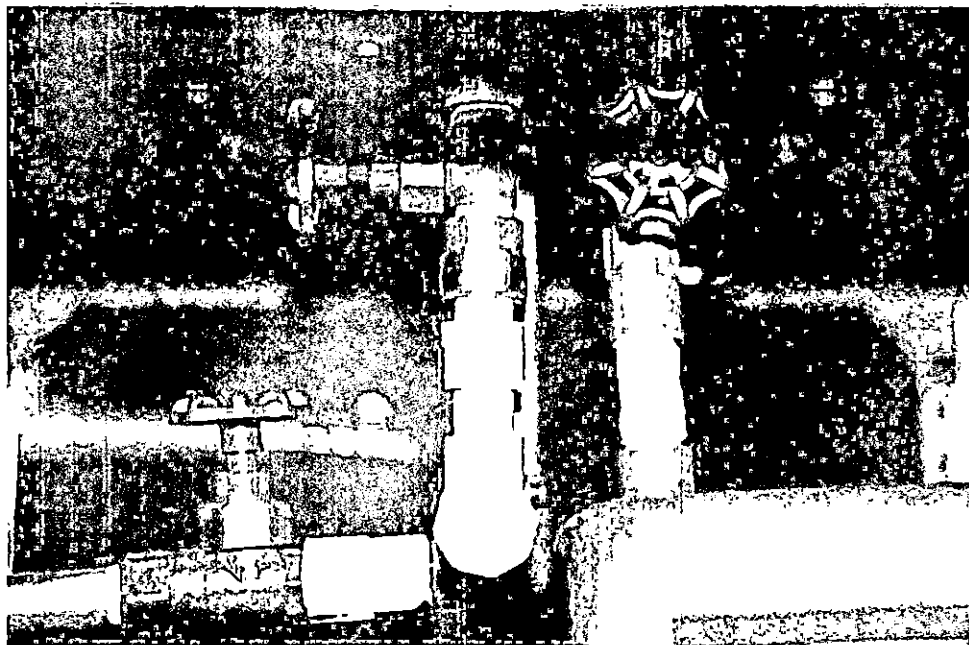


Figura C-5 A la izquierda, llave de paso para entrada de aire; de frente, tubo de salida de toma de muestra; a la derecha, tubo de descarga de producto terminado.

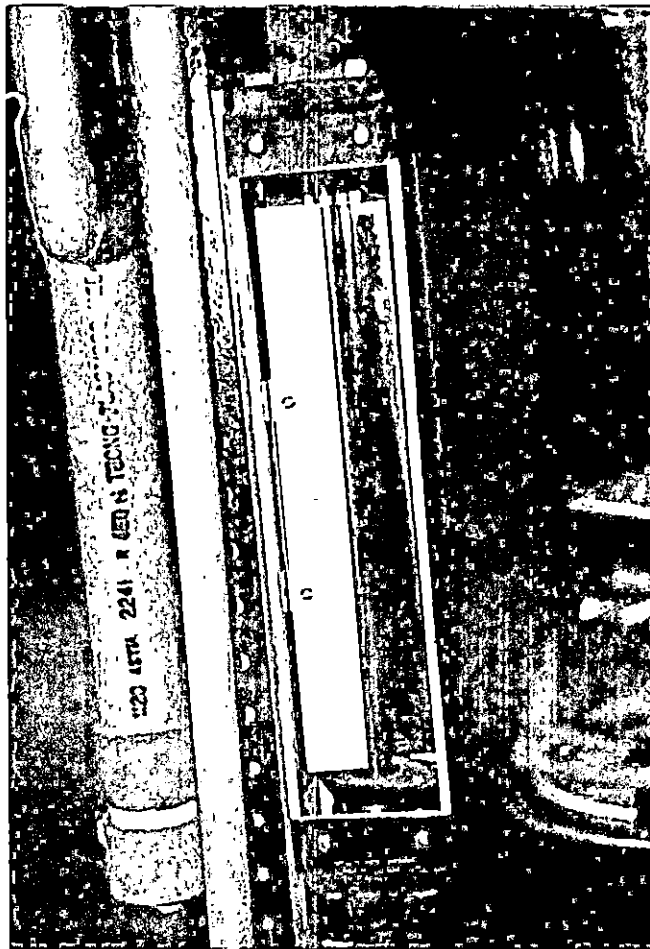


Figura C-6 A la derecha, filtro de algodón para el aire de entrada;  
a la izquierda, rotámetro para medir el aire entrando.

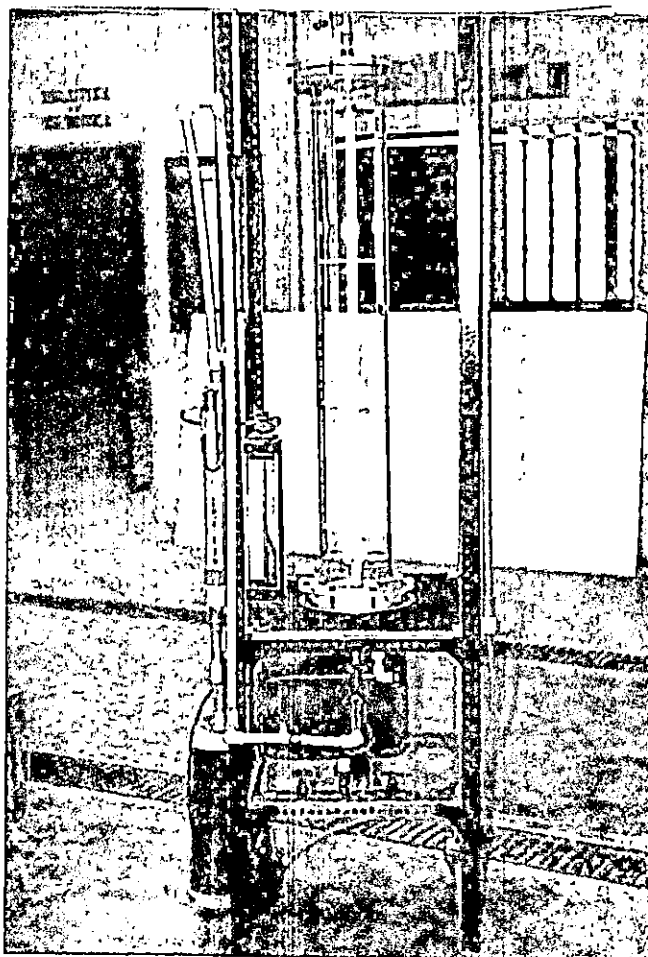


Figura C-7 Detalle del equipo de acetificación utilizado en la producción de ácido acético a partir de alcohol etílico industrial con *Acetobacter sp.* inmovilizadas sobre piedra pómez.

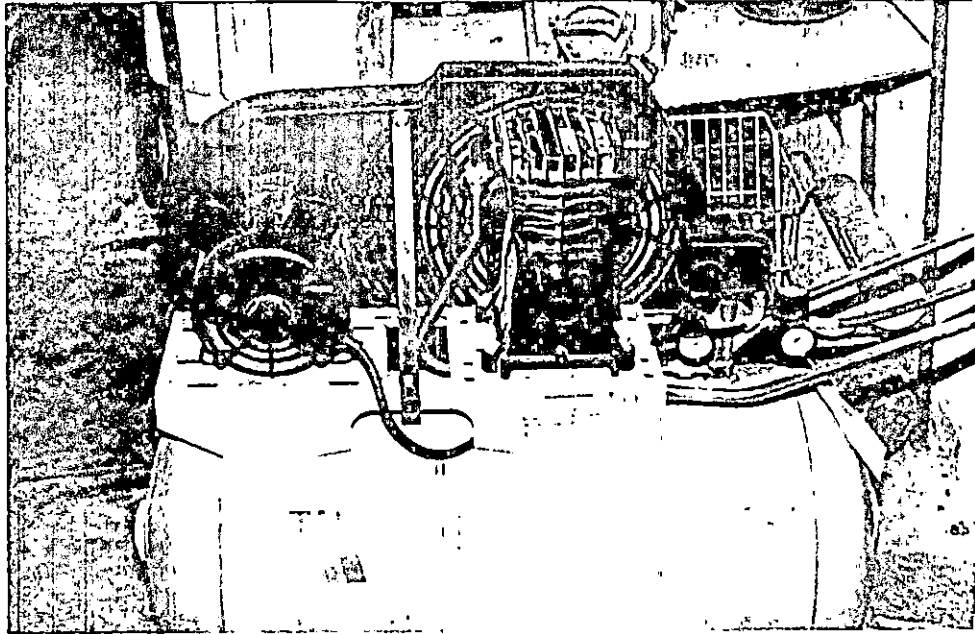


Figura C-8 Compresor utilizado para el abastecimiento de aire a la torre.

## APENDICE D

ANALISIS DE LA PIEDRA POMEZ UTILIZADA COMO MEDIO DE  
SOPORTE PARA LA BACTERIAS ACETICAS

UBICACION DEL MUESTREO: CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR.

ANALISIS POR FLUORESCENCIA DE R-X :METODO DE COMPARACION DIRECTA  
REALIZADO EN EL CENTRO DE INVESTIGACIONES Y APLICACIONES NUCLEARES  
DE LA FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA DE LA UNIVERSIDAD DE EL  
SALVADOR; ANALISTA, ING. ANTONIO MATUS.

## APENDICE D-1

## MUESTRA DE PIEDRA POMEZ SIN TRATAR QUIMICAMENTE

ELEMENTOS	CONCENTRACION
Si	29.45 ± 1.193 % W
K	9559.261 ± 496.18 ppm
Ca	1.276 ± 0.048 % W
Ti	1826.884 ppm
Mn	< 884.777 ppm
Fe	1.715 ± 0.104 % W
Cu	331.91 ± 62.005 ppm
Zn	143.36 ± 32.315 ppm
Rb	41.063 ± 5.4 ppm
Sr	276.63 ± 16.982 ppm
Y	< 8.060 ppm
Zr	160.07 ± 10.580

## APENDICE D-2

## MUESTRA DE PIEDRA POMEZ TRATADA CON ACIDO CLORHIDRICO

ELEMENTOS	CONCENTRACION
Si	32.756 ± 1.320 % W
K	9413.141 ± 436.70 ppm
Ca	1.208 ± 0.043 % W
Ti	1741.543 ± 64.64 ppm
Mn	< 502.007 ppm
Fe	1.138 ± 0.068 % W
Cu	325.767 ± 44.98 ppm
Zn	92.761 ± 26.392 ppm
Rb	40.620 ± 4.047 ppm
Sr	289.78 ± 17.32 ppm
Y	13.453 ± 2.359 ppm
Zr	191.19 ± 11.051

## MUESTRA DE PIEDRA POMEZ DESPUES DEL PROCESO DE ACETIFICACION

ELEMENTOS	CONCENTRACION
Si	32.931 ± 1.274 % W
K	9834.32 ± 453.896 ppm
Ca	1.3825 ± 0.049 % W
Ti	1575.75 ± 55.91 ppm
Mn	< 577.771 ppm
Fe	1.1055 ± 0.0715 % W
Cu	295.905 ± 54.311 ppm
Zn	< 79.754 ppm
Rb	37.386 ± 4.202 ppm
Sr	280.01 ± 16.724 ppm
Y	< 8.095 ppm
Zr	196.59 ± 12.418

Spectrum POST2FE.SPE Iteration 3: ChiSquare = 1.6; Dif = -0.0  
POMEZ SIN TRATAMIENTO FE

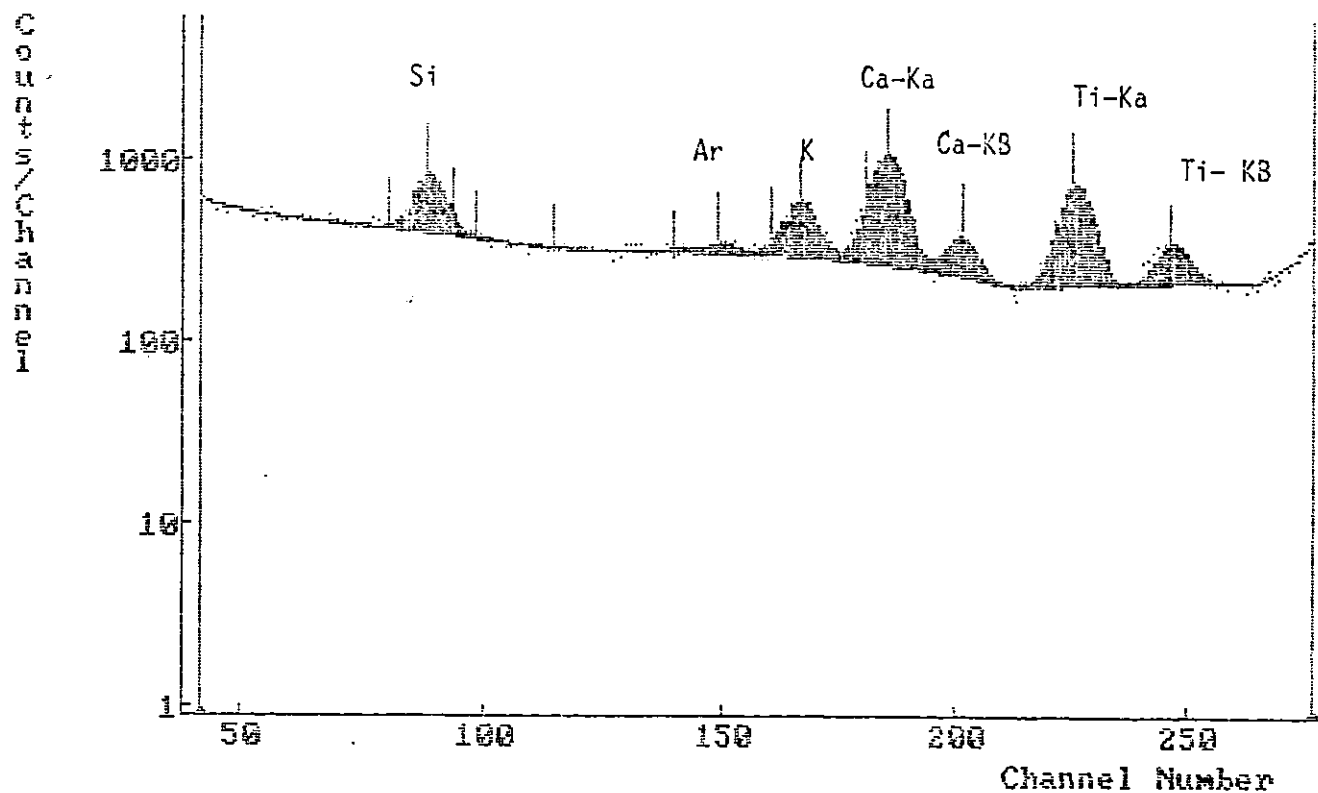


Figura D-1. Espectro por análisis de Fluorimetría de rayos X en una muestra de piedra pómez sin tratamiento (Laboratorio CIAN-FIA).



Spectrum P0DA1CD.SPE Iteration 2: ChiSquare = 1.4; Dif = -.6  
 POMEZ DESPUES DE ACETIFICACION1

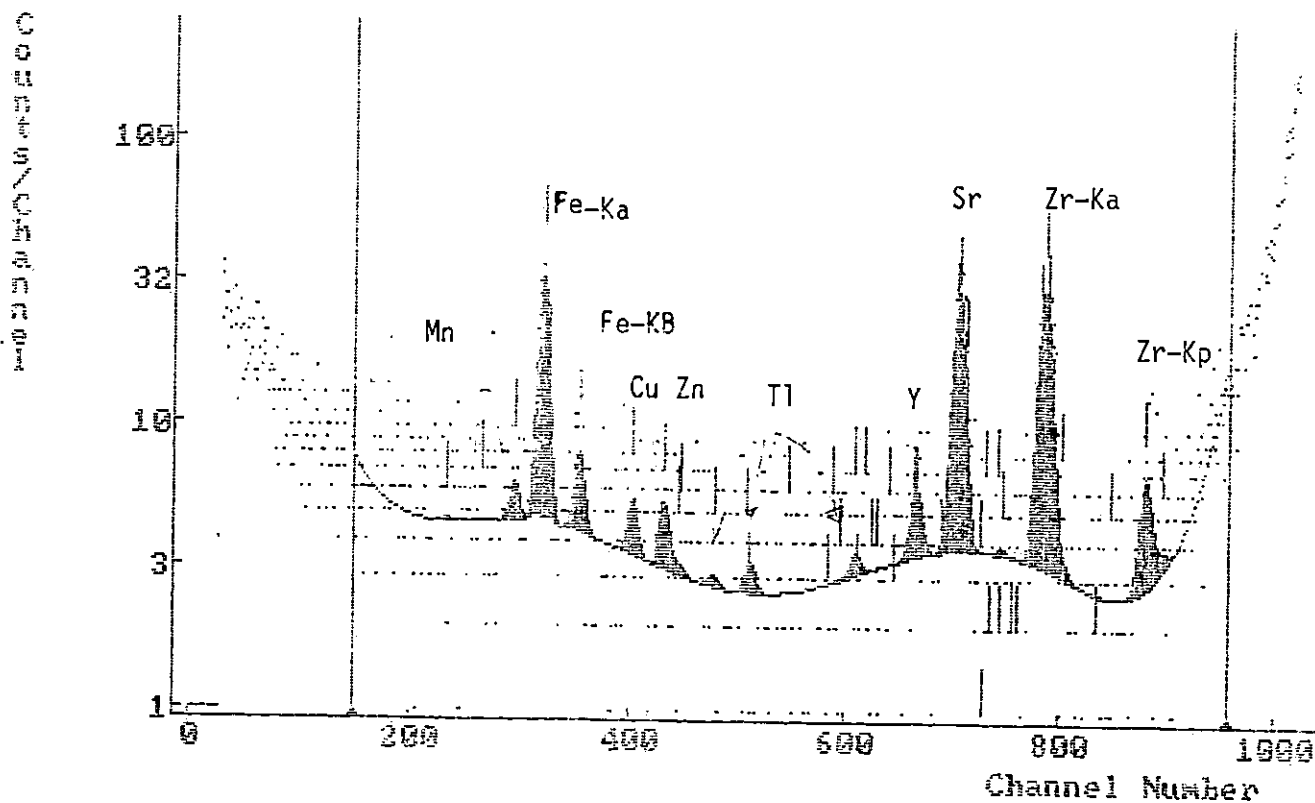


Figura D-2. Espectro por análisis de Fluorometría de rayos X en una muestra de piedra pómez después del proceso de acetificación (Laboratorio CIAN-FIA).

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
 FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS  
 UNIDAD DE QUIMICA

Ciudad Universitaria, 10 de enero de 1994.

Bachilleres  
 Eduardo Figueroa  
 Tania Torres.  
 Presente.

Por este medio envío a ustedes, los resultados del análisis de Alcohol Acido Acético, el cual se ha realizado en dos muestras:

Identificación de muestra	No de Muestra	Cu ppm	Fe ppm	Zn ppm
Alcohol-Acido Acético	232 - A	0.07	4.22	0.45
Alcohol-Acido Acético	232 - B	0.06	4.22	0.45

Responsable de análisis: Lic. Cleotilde Martínez de Góchez

Atentamente,

"HACIA LA LIBERTAD POR LA CULTURA"



Dra. FRANCISCA CAÑAS DE MORENO  
 Jefe de la Unidad de Química



Dra. FCdeM\*darr.

## APENDICE E

CALIBRACION DE ROTAMETRO UTILIZADO PARA MEDIR  
EL NIVEL DE AIREACION INTRODUCIDO AL PROCESO DE  
ACETIFICACION EN EL REACTOR DE 23 LITROS

Para la medición del flujo de aire de entrada a la torre de acetificación, se utilizó un rotámetro marca SCHUTTE & KOERTING CO. con una graduación de 0 a 250 mm, que mide la altura de elevación de un flotador o plomada que se desplaza dentro de un tubo cilíndrico de vidrio, hacia arriba o hacia abajo, de acuerdo al caudal de fluido que circule por el sistema.

El rotámetro se calibró midiendo el volumen de agua desplazada por el aire que pasa a travez de éste en una probeta invertida de 2000 ml de capacidad, dentro de un recipiente que se encuentra totalmente lleno de agua. El aire fue proporcionado por un compresor marca INGERSOLL-RAND de 2 Hp, a una presión de descarga de 15 psig y fue inyectado dentro de la probeta durante un período de 10 segundos. Los datos obtenidos para la altura seleccionada se presentan en la tabla E-1.

Los flujos obtenidos para cada altura en el rotámetro, fueron analizados estadísticamente por computadora, utilizando un programa creado por Jandel Scientific llamado Tablecurve, con el cual se encontró que la correlación que mejor se ajustaba a los datos, por tener un mejor coeficiente de correlación, era la descrita por la ecuación:

$$y = a + b/x + c/x\sqrt{x} + d/x^2 \quad \text{E-1}$$

donde:

y : Flujo de aire (L/min)

x : Altura (mm)

La ecuación E-1 posee un coeficiente de correlación de 0.997969457 por lo que es válida para predecir el flujo de aire del rotámetro. La ecuación E-1 es válida únicamente entre las alturas de 100 hasta 250 mm ya que fuera de éstos rangos no se tomaron datos experimentales. La figura E-1 puede utilizarse para encontrar gráficamente el flujo de aire que circula por el rotámetro.

TABLA E-1. Datos obtenidos de la calibración del Rotámetro

Altura (mm)	Volumen desplazado (ml) en 10 seg.			Vl promedio	Flujo L/min	Flujo por correlación lineal(a)	Flujo por correlación no lineal(n)
	R1	R2	R3				
250	1504.215	1504.200	1584.220	1504.212	9.51	9.39	9.46
240	1510.000	1510.200	1510.100	1510.100	9.06	9.00	9.05
230	1407.500	1407.450	1407.550	1407.500	8.45	8.60	8.64
220	1381.240	1381.200	1381.250	1381.230	8.29	8.21	8.22
210	1326.650	1326.700	1326.755	1326.702	7.96	7.81	7.80
200	1220.200	1220.100	1219.500	1219.933	7.32	7.41	7.38
190	1166.500	1165.900	1166.100	1166.167	7.00	7.02	6.97
180	1078.750	1078.600	1078.800	1078.717	6.47	6.62	6.55
170	1025.000	1024.500	1025.800	1025.100	6.15	6.23	6.15
160	965.000	965.500	965.900	965.467	5.79	5.83	5.76
150	895.900	894.500	895.000	895.133	5.37	5.44	5.39
140	843.300	842.950	843.500	843.250	5.06	5.04	5.03
130	780.100	780.500	780.000	780.200	4.68	4.65	4.69
100	600.100	600.500	600.400	600.333	3.60	3.46	3.60

(a) Correlaciones obtenidas con Jandel Scientific Tablecurve Software Versión 3.10

Lineal:  $y=+bx$  donde:  $a=-0.49715912$ ,  $b=0.0395604$ ,  $r=0.996611541$

No Lineal:  $y= a+b/x+c/x^2+d/x^3$  donde:  $a=36.220392$ ,  $b=-19103.392$ ,  $c=261465.29$ ,  $d=-1030520.3$ ,  $r=0.997969457$

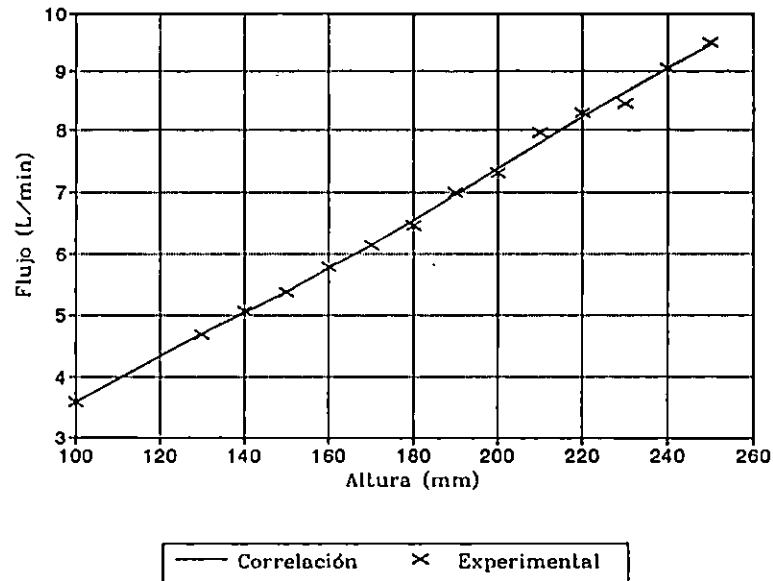


Figura E-1 Correlación para Rotámetro

## APENDICE F

DETERMINACION DEL  $klac^*$  POR EL METODO DEL SULFITO DE SODIO  
 PARA EL REACTOR DE 23 LITROS DE CAPACIDAD

La razón de transferencia de oxígeno por unidad de volumen de reactor  $Q_{O_2}$  esta dada por:

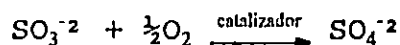
$$\begin{aligned} Q_{O_2} &= \text{razón de absorción de oxígeno} \\ &= (\text{flux})(\text{área interfacial})/(\text{volumen líquido de reactor}) \\ &= kl(c_1^* - c_1) (A/V) \end{aligned}$$

$$Q_{O_2} = kla'(c_1^* - c_1)$$

donde  $a' = A/V$ , es el área interfacial gas-líquido por unidad de volumen del líquido,  $c_1^*$  es la concentración en la fase líquida la cual está en equilibrio con la fase gaseosa,  $c_1$  es la concentración del gas en el seno del líquido y  $kl$  el coeficiente de transferencia de masa.

Si el oxígeno es consumido por reacción química en el líquido a una razón suficiente encontramos que  $c_1 \approx 0$ . Entonces, la razón de reacción química de la masa es igual a  $kla'c_1^*$ , que es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

En estudios de transferencia de masa, una contemplación común de la fase del oxígeno es la oxidación de sulfito de sodio a sulfato en presencia de iones metálicos como catalizadores, como el  $Co^{++}$ :



La cinética de la razón de oxidación de las soluciones de sul

fito a sulfato es compleja.

El método de oxidación del sulfito de sodio para la determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno  $kla'$ , se basa en la evaluación del sulfito de sodio remanente de una muestra de líquido tomado a un tiempo dado después del inicio del proceso de aireación permitiendo así la obtención de un dato sobre el sulfito de sodio transformado a sulfato y por consiguiente a través de relación estequiométrica la cantidad de oxígeno transferido por unidad de volumen y tiempo.

El procedimiento que se utiliza para evaluar el  $kla'$  se fundamenta en el método de oxidación del sulfito de sodio mencionado anteriormente, con algunas variantes, para adaptarlo a las condiciones de operación del acetador, utilizando  $Cu^{++}$  como catalizador en una concentración de  $10^{-4}$  M en lugar de  $Co^{++}$ .

La técnica analítica para determinar el sulfito de sodio transformado a sulfato es la siguiente: Se pipetea 25 ml de una solución 0.1 N de yodo en un erlenmeyer de 250 ml, se añade 1 ml de HCl 6 N y 50 ml de agua desmineralizada, luego se mide con pipeta volumétrica 10 ml de la muestra (solución de sulfito de sodio que se obtiene del reactor), que se adiciona lentamente y agitando el frasco que contiene la solución de yodo, posteriormente se agregan 5 ml de indicador de almidón. Finalmente se titula la solución con tiosulfato de sodio 0.1 N hasta que desaparece el color azul (Díaz y Díaz, 1991).

El cálculo del %p/v de  $Na_2SO_3$  se realiza utilizando la ecuación siguiente:

$$\% \text{ p/v} = \frac{(V_1 N_1 - V_2 N_2) * \text{meq-gr Na}_2\text{SO}_3}{V_m}$$

donde:  $V_1$  = volumen en exceso de la solución estándar de yodo

$N_1$  = normalidad de la solución de yodo

$V_2$  = volumen de la solución estándar de solución de  
tiosulfato de sodio

$N_2$  = normalidad de la solución de tiosulfato de sodio

$V_m$  = volumen de la muestra

meq-gr  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  = 0.0630215

La respuesta se obtiene en % p/v como sulfito de sodio.

El valor del  $k_{\text{lacl}^*}$  a partir de datos de concentración de sulfito de sodio remanente y tiempo, puede obtenerse analíticamente y gráficamente.

La determinación analítica del  $k_{\text{lacl}^*}$  se desarrolla aplicando la ecuación:

$$k_{\text{lacl}^*} = \frac{(C_o - C_i)}{(t_2 - t_1)} * 39.668970376$$

donde:

$C_o$  = concentración inicial de sulfito de sodio

$C_i$  = concentración final de sulfito de sodio

$(t_2 - t_1)$  = intervalo de tiempo entre ambas concentraciones (h)

39.668970376 = factor para convertir a milimoles de oxígeno absorbidos/L-h

El valor de  $k_{\text{lacl}^*}$  en forma gráfica se obtiene graficando el



%p/v de sulfito de sodio reaccionado en el eje de las ordenadas contra el tiempo en las abscisas, cuya pendiente multiplicada por  $-39.668970376$  (factor de conversión para obtener milimoles de oxígeno absorbido/L-h) dará el valor del  $klacl^*$  para las condiciones dadas como se muestra en la figura F-1 (Díaz y Díaz, 1991). Los resultados obtenidos de las pruebas de  $kla'$  efectuadas en el acetador se presenta en la tabla F-1 y las gráficas acerca del comportamiento de estos resultados en las figuras F-2 a F-9, donde la pendiente en cada gráfica es encontrada por correlación lineal tomando los puntos que presentan la mayor tendencia lineal eliminandose aquellos donde el %p/v de  $N_2SO_3$  comienza a ser constante.

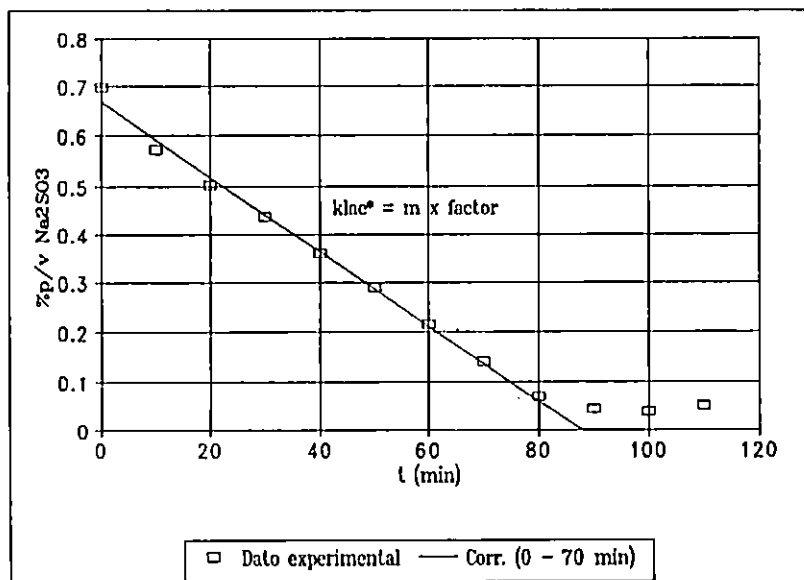


Figura F-1 Determinación de  $klacl^*$  por el método gráfico.

TABLA F-1  
DATOS OBTENIDOS DE LA EVALUACION DEL KLA' EN EL EQUIPO DE ACETIFICACION

FLUJO DE AIRE (L/min)	9.46	8.64	7.80	6.92	6.15	5.39	4.69	4.02
yodo:	0.110486 N	0.107439 N	0.110486 N	0.124655 N	0.124655 N	0.112650 N	0.112650 N	0.107439 N
tiosulfato:	0.142563 N	0.136567 N	0.142563 N	0.201367 N	0.140509 N	0.131638 N	0.131638 N	0.153862 N
t(min)	%p/v Na <sub>2</sub> S <sub>03</sub>	%p/v Na <sub>2</sub> S <sub>03</sub>	%p/v Na <sub>2</sub> S <sub>03</sub>	%p/v Na <sub>2</sub> S <sub>03</sub>	%p/v Na <sub>2</sub> S <sub>03</sub>	%p/v Na <sub>2</sub> S <sub>03</sub>	%p/v Na <sub>2</sub> S <sub>03</sub>	%p/v Na <sub>2</sub> S <sub>03</sub>
0	0.633405	0.634200	0.613189	0.701286	0.697709	0.692212	0.677694	0.626114
10	0.496390	0.541686	0.509867	0.593418	0.573737	0.547031	0.588512	0.593996
20	0.402053	0.444868	0.411037	0.447477	0.502697	0.491033	0.505551	0.475817
30	0.312207	0.345899	0.330177	0.393543	0.436484	0.451627	0.447479	0.417637
40	0.231347	0.246929	0.258300	0.384025	0.361215	0.381111	0.395629	0.386123
50	0.128024	0.160869	0.168455	0.231740	0.290375	0.314743	0.347927	0.332792
60	0.042671	0.070506	0.092086	0.123871	0.215106	0.248375	0.294003	0.303702
70		0.057597	0.017964	0.077863 (1)	0.139838	0.196524	0.264967	0.252795
80	0.051656	0.057597	0.017964	0.033577	0.068997	0.142600	0.202746	0.204311
90				0.033577	0.042432	0.080380	0.148822	0.163101
100				0.038005	0.038005	0.049270	0.082454	0.131587
110				0.033577	0.051287	0.049270	0.057566	0.090376
120						0.049270	0.049270	0.054014
130				0.042432		0.049270	0.049270	0.012803
140							0.049270	0.007955
150								0.005531
160								0.007955

(1) tiosulfato=0.140509 N

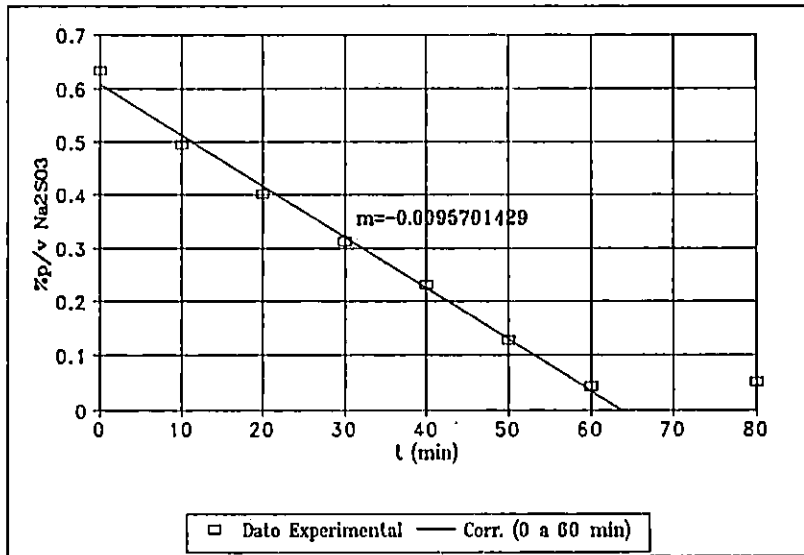


Figura F-2 Disminución del %p/v de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> con respecto al tiempo para un flujo de aire de 9.46 L/min. La línea continua representa una correlación lineal cuya pendiente es -0.00-95701429 la cual es utilizada para encontrar el valor de  $klac^*$  para este flujo de aire.

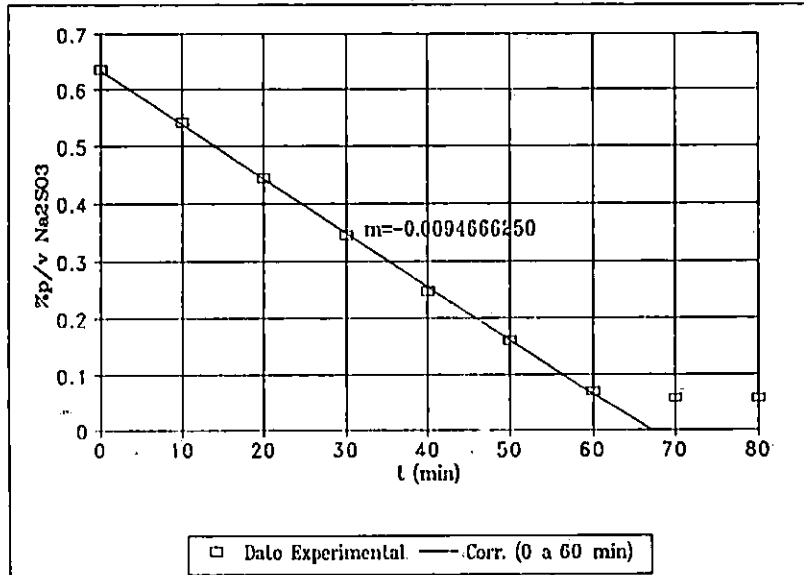


Figura F-3 Disminución del %p/v de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> con respecto al tiempo para un flujo de aire de 8.64 L/min. La línea continua representa una correlación lineal cuya pendiente es -0.00-94666250 la cual es utilizada para encontrar el valor de  $klac^*$  para este flujo de aire.

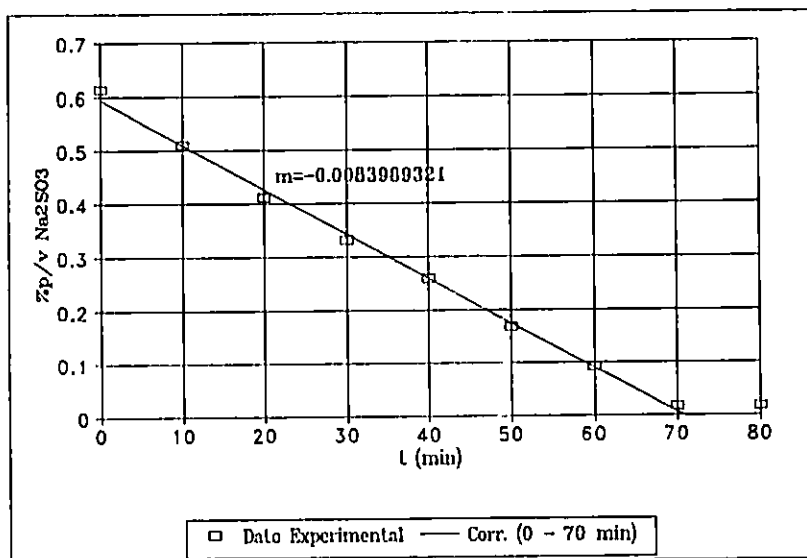


Figura F-4 Disminución del  $\%p/v$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  con respecto al tiempo para un flujo de aire de  $7.80 \text{ L/min}$ . La línea continua representa una correlación lineal cuya pendiente es  $-0.0083989321$  la cual es utilizada para encontrar el valor de  $klac'$  para este flujo de aire.

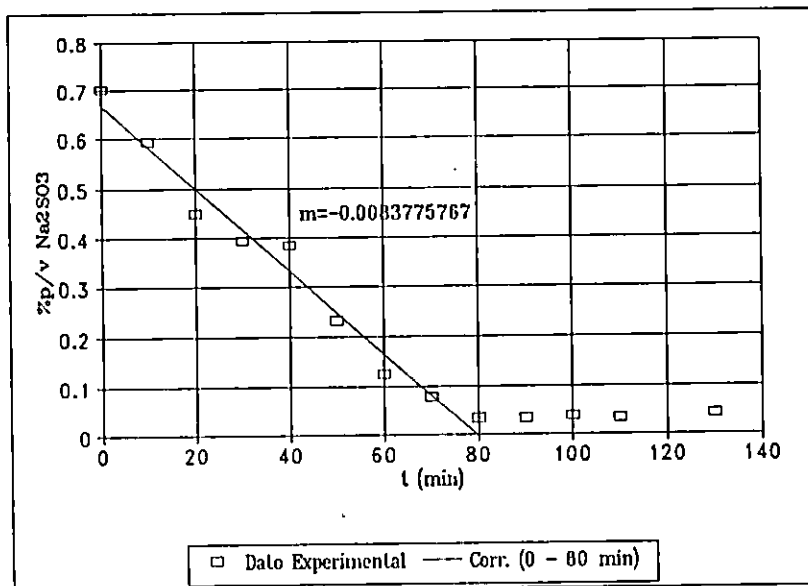


Figura F-5 Disminución del  $\%p/v$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  con respecto al tiempo para un flujo de aire de  $6.92 \text{ L/min}$ . La línea continua representa una correlación lineal cuya pendiente es  $-0.0083775767$  la cual es utilizada para encontrar el valor de  $klac'$  para este flujo de aire.

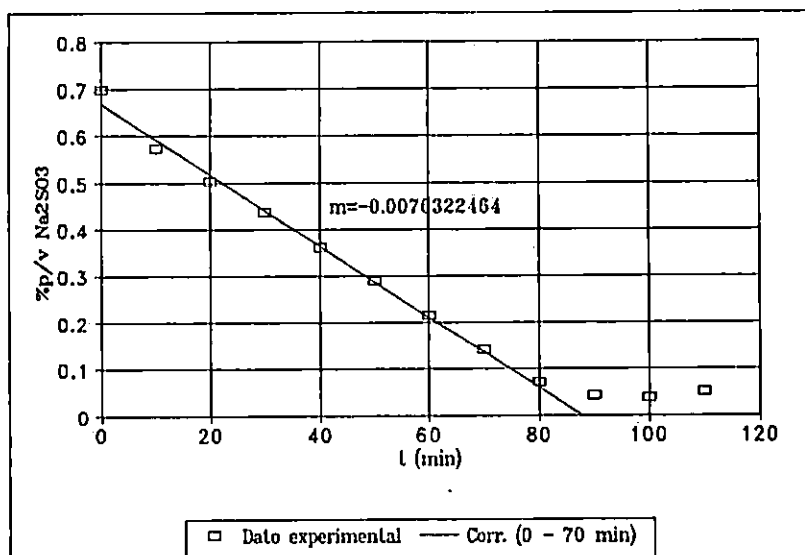


Figura F-6 Disminución del %p/v de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> con respecto al tiempo para un flujo de aire de 6.15 L/min. La línea continua representa una correlación lineal cuya pendiente es -0.0076322464 la cual es utilizada para encontrar el valor de  $klac^*$  para este flujo de aire.

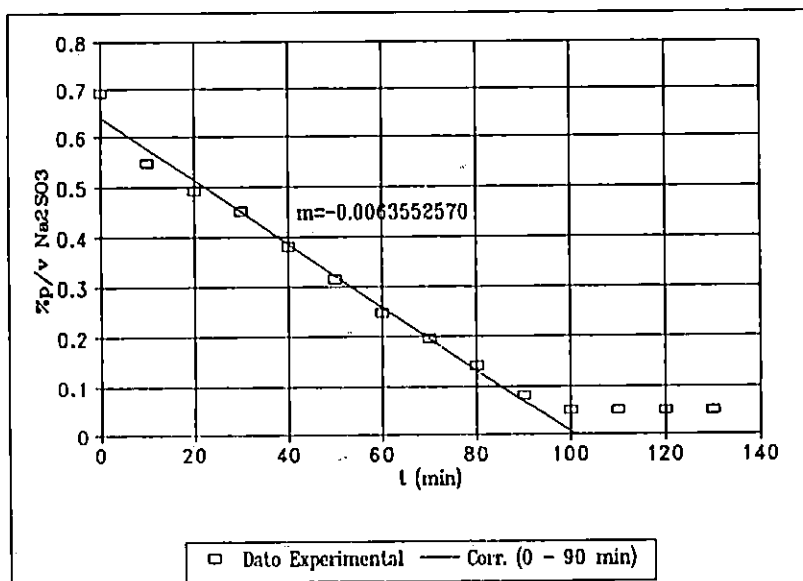


Figura F-7 Disminución del %p/v de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> con respecto al tiempo para un flujo de aire de 5.39 L/min. La línea continua representa una correlación lineal cuya pendiente es -0.0063552570 la cual es utilizada para encontrar el valor de  $klac^*$  para este flujo de aire.

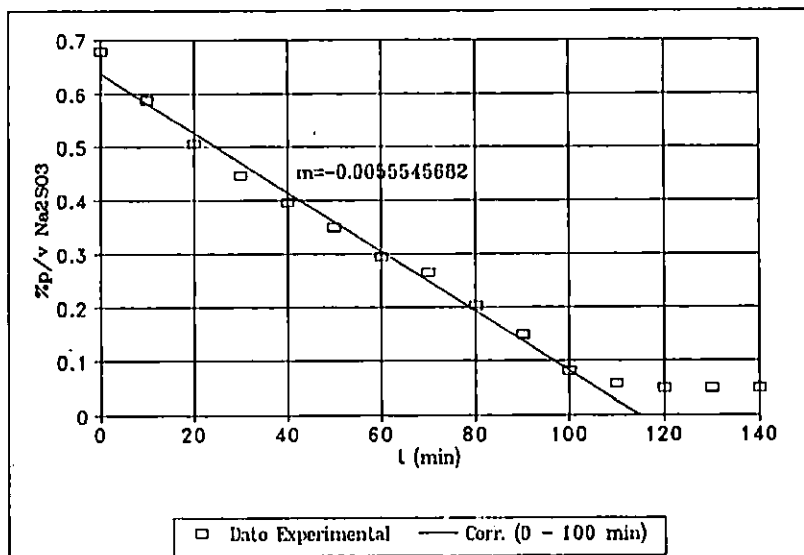


Figura F-8 Disminución del %p/v de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  con respecto al tiempo para un flujo de aire de 4.69 L/min. La línea continua representa una correlación lineal cuya pendiente es  $-0.005545682$  la cual es utilizada para encontrar el valor de  $klac^*$  para este flujo de aire.

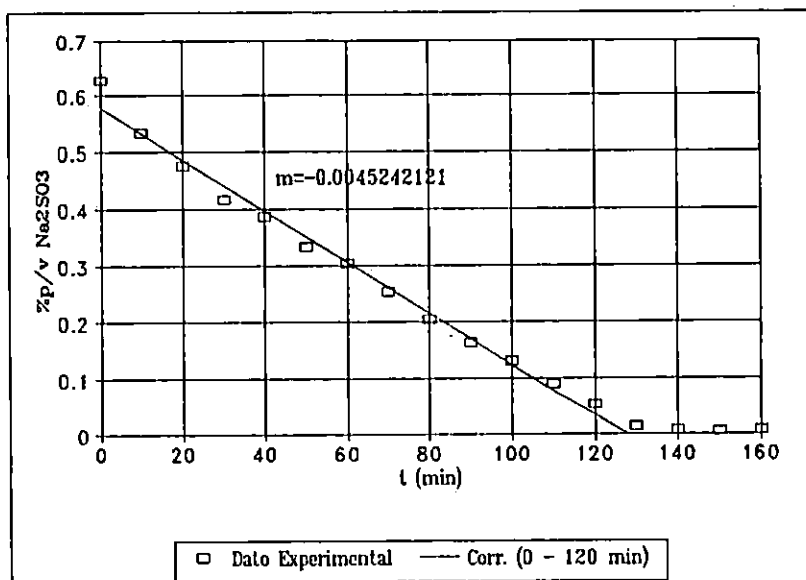


Figura F-9 Disminución del %p/v de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  con respecto al tiempo para un flujo de aire de 4.02 L/min. La línea continua representa una correlación lineal cuya pendiente es  $-0.0045242121$  la cual es utilizada para encontrar el valor de  $klac^*$  para este flujo de aire.

## APENDICE G

## DETERMINACION DEL CONTENIDO DE ACIDO ACETICO EN MUESTRAS DE VINAGRE

Para la determinación de la acidez se aplicó un método de volumetría ácido-base; sin embargo es recomendable el uso de métodos potenciométricos, conductivimétricos o de cromatografía de gases para una mayor precisión de los resultados.

En el método utilizado se miden dos ml de muestra (solución de ácido acético a cuantificar) y se introducen en un erlenmeyer de 125 ml adicionando 20 ml de agua desmineralizada; se añaden dos gotas de fenolftaleína y se titula con NaOH 0.1 N hasta que aparece el primer vire a rosado.

El resultado se obtiene como porcentaje peso/volumen expresado como ácido acético:

$$\%p/v \text{ de } CH_3COOH = \frac{V \times N \times \text{meq-gr de } CH_3COOH}{V_m}$$

donde:

V = ml consumidos de NaOH 0.1 N

N = normalidad del NaOH

meq-gr = miliequivalente gramo de ácido acético (0.06)

V<sub>m</sub> = volumen de muestra (ml)

## APENDICE H

## DETERMINACION DE ALCOHOL ETILICO POR DESTILACION

Antes de iniciar el análisis es necesario determinar un volumen aproximado de neutralización de la muestra con NaOH más o menos 0.1 N y fenolftaleína, (la fenolftaleína contiene alcohol, por eso a un volumen aparte de muestra se le mide previamente cuánto de soda se necesita para neutralizar un volumen determinado de la muestra). La muestra a la que se le medirá el contenido de alcohol ya no lleva fenolftaleína. Esta neutralización se efectúa de la manera siguiente:

Se toman 20 ml de la muestra, se le adicionan 200 ml de agua descarbonatada y se añade 1 ml de fenolftaleína. Finalmente se neutraliza con NaOH aproximadamente 0.1 N, lo cual termina hasta observar el vire a rosado pálido.

Luego para determinar el alcohol etílico presente en la muestra se procede de la siguiente manera:

Se miden 100 ml de la muestra en probeta de 100 ml y se adiciona la cantidad de NaOH 0.1 N necesaria para neutralizar; se transfiere a un balón de 500 ml usando 50 ml de agua. Se destila durante 30 - 60 minutos usando un condensador. El condensado se recibe en un frasco volumétrico que se encuentra sumergido en baño de agua fría. Se llenan dos frascos volúmetricos de 25 o 50 ml con el condensado obtenido llevándolos hasta la marca, midiendo también su temperatura. Finalmente se pesa en balanza analítica. Los datos pa-



ra cada prueba se presentan en la tabla H-1. Los datos de contenido de alcohol etílico en %v/v se obtuvieron del apéndice E-3 de Díaz y Díaz. La figura H-1 muestra el aparato de destilación empleado.

TABLA H-1

CONCENTRACION DE ETANOL FINAL ENCONTRADO DURANTE EL PROCESO DE ACETIFICACION

	CORRIDA 1	CORRIDA 2
masa balón (g):	67.7152	67.7152
temperatura (°C)	31	28
masa muestra + balón (g)	166.9175	166.8787
masa muestra (g)	99.2023	99.1635
masa agua destilada + balón (g)	167.3507	167.32
masa agua (g)	99.6355 <sup>31°C</sup>	99.6048 <sup>28°C</sup>
peso específico	0.9956 <sup>31°C/31°C</sup>	0.9956 <sup>28°C/28°C</sup>
%v/v etanol	3.05	2.10

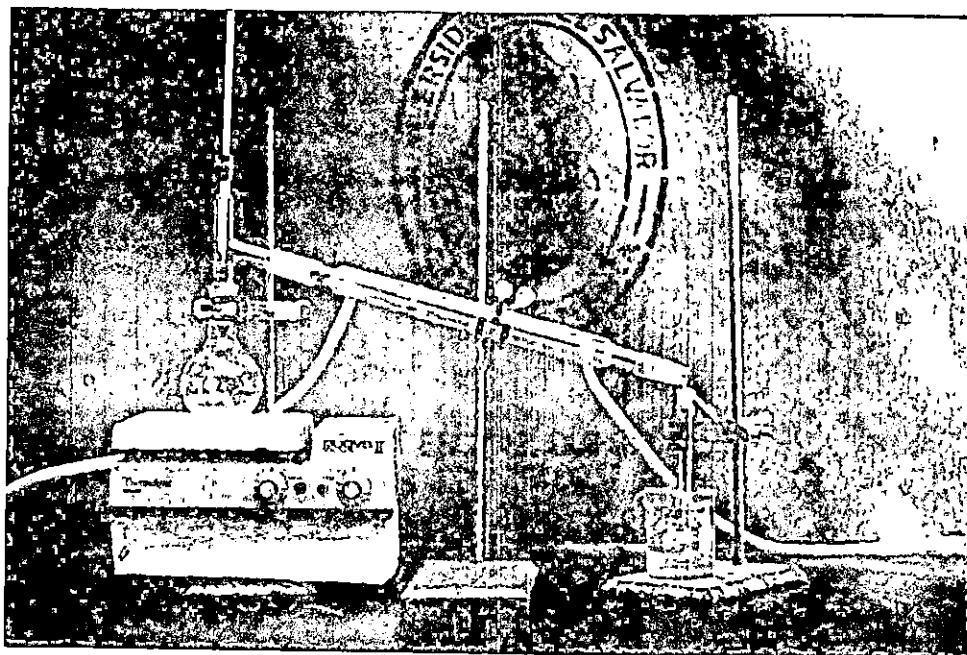


Figura H-1. Aparato de destilación

## APENDICE I

"PLANTEAMIENTO DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA OPTIMIZACION DEL PROCESO DE PRODUCCION DE ACIDO ACETICO A PARTIR DE ALCOHOL ETILICO INDUSTRIAL"

## OBJETIVO DE LA INVESTIGACION

La etapa siguiente a la investigación de la efectividad de un proceso<sup>7</sup>, es la de llevarlo a una forma que puede ser la base experimental para el diseño de ingeniería de la planta de producción.

El objetivo del establecimiento de esta base experimental es el de desarrollar modelos o ecuaciones de pronóstico que lo describan, y que permitan a la vez, encontrar los valores óptimos de las variables de operación; el logro de este objetivo implica:

- 1- Selección de variables más significativas del proceso (variables efectivas). Luego que los objetivos de la investigación han sido definidos, el próximo paso es reducir el número de variables potenciales que pudieran resultar, a solo aquellas que sean efectivas, es decir, las que influyan en los resultados del experimento.

En el proceso de producción de ácido acético planteado en este estudio se han identificado las siguientes variables poten-

---

<sup>7</sup>Para el caso, obtención de ácido acético a partir de alcohol etílico industrial, utilizando un reactor de células *Acetobacter* sp. inmovilizadas sobre piedra pómez

ciales: temperatura, flujo de oxígeno, tiempo espacial, diámetro de la partícula del material de empaque, concentración de etanol en el sustrato y la especie de cepa bacteriana a utilizar.

De estas variables se considera que las efectivas a evaluar en un trabajo de optimización son:

- flujo de oxígeno
  - tamaño de partícula del material de empaque y
  - la concentración de etanol en el sustrato a alimentar
- 2- Hipótesis a plantear sobre el efecto de las variables. La búsqueda de los resultados que conduzcan a la evaluación de los valores óptimos de las variables efectivas debe basarse en las siguientes hipótesis:
- a. Existe un efecto significativo de cada variable seleccionada sobre el proceso; y
  - b. Existe una interdependencia significativa entre al menos dos de las variables.
- 3- El diseño del experimento. El desarrollo de un diseño experimental para un estudio de optimización debe abarcar:
- a. Definición de la variable respuesta.

La variable respuesta recomendada para este estudio de optimización es el rendimiento en ácido acético, ya que este permite evaluar el grado de transformación de la materia prima (alcohol etílico) en el producto deseado (ácido acético).

- b. Rangos de variación de las variables.

Los rangos de variación propuestos para las variables se presentan en la tabla I.1

TABLA I-1

VARIABLE	RANGO	DATO DE REFERENCIA
Flujo de oxígeno	T <sup>a</sup> +100% - T+600%	T + 200%
Diámetro de partícula (mm)	12.7 - 19 y 25.4 - 38.1	12.7 - 19
Tiempo espacial (días)	4 - 6	6
Concentración de etanol	5% - 12% v/v	11% v/v

<sup>a</sup> Valor aún no determinado.

c. Selección del diseño del experimento.

La selección de un diseño experimental adecuado debe basarse en la conjugación de los siguientes aspectos:

- Hipótesis planteadas sobre el experimento.
- Número de variables efectivas a considerar.
- Número de niveles de variación de cada variable.
- Tiempo asignado para la etapa experimental.

De acuerdo a lo anterior, se propone como diseño experimental base, un diseño factorial. La selección del diseño factorial adecuado debe tomar como referencia la tabla I-2, en la cual se presenta un resumen de los diseños factoriales que pueden ajustarse a este estudio; también se especifican, el número de experimentos y el tiempo de realización que involucra cada diseño, tomando un número de dos y tres repeticiones por experimento se tiene:

TABLA I-2. DISEÑO FACTORIAL

TIPO DE DISEÑO	N° DE EXPERIMENTOS		TIEMPO DE REALIZACION (DIAS) <sup>a</sup>	
	2R	3R	2R	3R
Tres variables				
3 <sup>3</sup>	54	81	324	486
3x3x2	36	54	216	324
3x2x2	24	36	144	216
2 <sup>3</sup>	16	32	96	144

<sup>a</sup> Considerando un promedio de 6 días por experimento.

R:Repeticiones.

### c.1 Evaluación de resultados.

La evaluación debe hacerse en base a un diseño factorial completo en bloques completamente al azar con dos o tres repeticiones.

En caso que el diseño seleccionado sea del tipo 2<sup>3</sup> con dos repeticiones se recomienda aplicar el diseño factorial fraccionado de Yates.

#### 4- Determinación del modelo matemático de comportamiento del proceso y optimización.

Se ha establecido que el método de análisis de los resultados que da más información de un experimento factorial depende de la naturaleza de los factores. Si todos los factores representan variables cuantitativas, es natural pensar en las respuestas o rendimiento (Y) como una función de los niveles de estas variables. Se puede escribir (Cochran, W. G., et. al., 1978):

$$Y_u = \phi(x_{1u}, x_{2u}, \dots, x_{ku}) + e_u$$

Donde  $u=1, 2, \dots, n$ ; que representa las  $n$  observaciones en el experimento factorial y  $x_{iu}$  representa el nivel del  $i$ -ésimo factor en la  $u$ -ésima observación. A la función  $\phi$  se le llama superficie respuesta. El residuo  $e_u$  mide el error experimental de la  $u$ -ésima observación. Un conocimiento de la función  $\phi$  da un resultado completo de los resultados de los experimentos y permiten predecir las respuestas para los valores de las  $x_{iu}$  que no fueron probados en el experimento.

Cuando no se conoce la forma matemática de  $\phi$ , la función puede aproximarse satisfactoriamente dentro de la región experimental por un polinomio de las variables  $x_{iu}$ .

El estudio de éstas superficies de respuesta permite optimizar las variables para maximizar o minimizar la respuesta particular que se busca.

Los modelos de pronóstico pueden desarrollarse en dos etapas. La primera da como resultado un modelo limitado de la superficie respuesta y esta basado típicamente en experimentos factoriales a dos niveles. Este modelo se puede considerar como una gráfica de contorno de una superficie plana que representa los efectos lineales y las interacciones. La expresión matemática contiene una constante, términos lineales y términos de productos cruzados:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_{1u} + \beta_2 x_{2u} + \dots + \beta_k x_{ku} + e_u$$

El modelo de la segunda etapa es más refinado y se basa en

diseños factoriales de tres niveles. Este modelo proporciona pronósticos de más calidad y se puede considerar como una gráfica de contorno de una superficie curva. Las representaciones matemáticas típicas son polinomios de segundo orden con términos cuadráticos:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_{1u} + \beta_2 X_{2u} + \beta_{11} X_{1u}^2 + \beta_{22} X_{2u}^2 + \beta_{12} X_{1u} X_{2u} + e_u$$

## APENDICE J

## COSTOS INVOLUCRADOS EN LA ELABORACION DEL PROYECTO

RUBRO	COSTO (¢)
Fotos	318.65
Material y accesorios de construcción de la torre	1,155.44
Papel aluminio	8.00
Acido clorhídrico	264.00
Análisis de hierro cobre y zinc	120.00
Reactivos	861.00
Agua desmineralizada	595.60
Gas propano	73.90
Combustible	442.60
Mascarillas	6.30
Papelería (fotocopias, anillados, diskettes, cinta para impresor)	1384.70
Recipientes plásticos	113.00
Llamadas telefónicas y Fax	40.00
Alcohol etílico	285.00
Cristalería de laboratorio	46.20
Bombas tipo pecera	110.00
Material de limpieza	70.00
Mangueras y varillas	143.85
TOTAL	6,661.34



GE ARQ

