

**OBTENCIÓN DE UN BIOCATALIZADOR PARA LA HIDRÓLISIS DE
RESIDUOS DESLIGNIFICADOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR.**

**ORLANDO VELASCO RIOS
JOAN SEBASTIÁN LUNA MARTÍNEZ**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI, COLOMBIA**

2018

**OBTENCIÓN DE UN BIOCATALIZADOR PARA LA HIDRÓLISIS DE
RESIDUOS DESLIGNIFICADOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR.**

**ORLANDO VELASCO RIOS
JOAN SEBASTIÁN LUNA MARTÍNEZ**

**PROYECTO DE GRADO PRESENTADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO**

**DIRECTOR DEL PROYECTO
JORGE ENRIQUE LÓPEZ GALÁN ING. QUÍMICO. DR. SCI.**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI, COLOMBIA**

2018

DEDICATORIA

*A Dios por darme la oportunidad de
vivir, por cuidarme cuando lo necesito,
por estar siempre conmigo.*

*A mi Familia, por su enorme amor y
cuidado, por sus consejos y educación,
sus sacrificios y apoyo,
que hacen de mí la persona que soy.*

*A mis amigos y compañeros,
Con los cuales viví gratos recuerdos.*

Orlando Velasco Ríos.

*Dedicado a Dios, a mi madre Gloria Yein y a mi padre Luis Emilson, por su gran apoyo. A mi
hermano Luis David, a mis abuelos, a mis amigos y compañeros de universidad, por su
aprecio y ayuda a lo largo de este importante camino.*

Joan Sebastián Luna Martínez

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a Dios, por brindarnos la fortaleza para terminar esta etapa de nuestras vidas, por guiarnos en cada paso hacia nuestras metas y por permitirnos conocer aquellas personas que han sido guía y compañía durante toda nuestra etapa de aprendizaje.

A nuestros padres por infundimos los valores y la ética, guías en nuestro día a día.

Queremos también presentar nuestros agradecimientos a todos los docentes por compartir sus conocimientos, experiencias, dedicación, tiempo y motivarnos a salir adelante.

Agradecemos especialmente al Ing. Biotecnológico Jonathan Arturo Bautista Carrillo por su asesoría e ideas a lo largo de este proyecto de grado; al grupo de Investigación GRUBIOC liderados por el Ing. Químico. Dr. SCI Jorge Enrique López Galán, quienes nos escucharon, guiaron, apoyaron constantemente, confiaron en nuestro trabajo y nos inculcaron la disciplina, compañerismo y la perseverancia ante los obstáculos.

Por el soporte institucional dado para la realización de este trabajo, a la Universidad del Valle, que nos brindó la formación para ser buenos profesionales.

A todos ellos, gracias.

Orlando V - Joan L. M.

RESUMEN

La alta producción de residuos anuales de la caña de azúcar (principalmente hojas y cogollos) que varía entre 6 a 12 millones de toneladas, es una fuente importante de biomasa lignocelulósica con contenidos promedio en base seca de celulosa 42% p/p, hemicelulosa 21% y lignina 20%. Esta caracterización permite identificar que estos residuos son ideales para la obtención de biocombustibles a partir de azúcares reductores, en un proceso hidrolítico catalizado por enzimas. La hidrólisis enzimática presenta grandes beneficios como no toxicidad, alta selectividad o la disminución de inhibidores, que son causantes de que según un estudio de la BCC Research se estime que entre los años 2015-2020, la tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) para las enzimas aplicadas a biocombustibles será del 10.4%. Este mercado nuevo de enzimas que desplaza a las anteriores, cada vez más efectivas y con menor costo de producción, plantea la necesidad de nuevos estudios.

El objetivo de este trabajo fue la definición de un cóctel enzimático para facilitar la hidrólisis de residuos pretratados de caña de azúcar (hojas y cogollos), evaluando la sinergia existente entre las actividades celulasa y hemicelulasa principalmente. Bajo las condiciones de operación estudiadas, se encontró que el porcentaje de sacarificación incrementa conforme aumenta la carga enzimática (mL de enzima/g de sustrato), y es indiferente a la relación volumétrica de las enzimas seleccionadas (Cellic CTec2 y Cellic HTec2). Se seleccionó como el mejor cóctel enzimático, aquel con un perfil de actividades enzimáticas de 86.05 FPU/mL para celulasa total, 2956.98 U/mL para xilanasa, 4.43 UI/mL para exoglucanasas y 1850 CMC/mL para endoglucanasas. Con este cóctel se lograron porcentajes de sacarificación de hasta aproximadamente un 76% en 12 horas y de hasta 90% en 48 horas para una carga enzimática cercana a 0.46 mL/g. Una reproducibilidad del doble y cuatro veces el volumen trabajado, visualizó que los resultados son extrapolables a nivel de laboratorio, además de la determinación de las constantes cinéticas $V_{\max}$ (2.036 g/h) y K_m (3.955 g/mL) del modelo de Michaelis Mentel que reflejaron que el complejo E/S está fuertemente unido. Referente al análisis económico, se observó que el escenario de altas relaciones C/S de 0.4, tiempos entre 36 y 48h, y precios de enzimas de 0.5 USD/ gal de etanol favorece la rentabilidad del proceso.

Palabras claves: Hidrólisis enzimática, residuos de caña de azúcar, Parámetros cinéticos Michaelis Menten, Cellic CTec2, Cellic Tec2 y Pectinex.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	12
2. MARCO TEÓRICO	14
2.1 MARCO CONCEPTUAL	14
2.1.1 Celulosa, hemicelulosa y lignina.....	14
2.1.2. Pretratamiento del material lignocelulósico.....	16
2.1.3. Hidrólisis enzimática.....	16
2.1.4. Azúcares Reductores (AR).	17
2.1.5. Modelo cinético de Michaelis-Menten para reacciones de hidrólisis enzimática.	17
2.1.6. Diagrama de Lineweaver-Burk.	19
2.2. ANTECEDENTES	20
3. METODOLOGÍA	22
3.1. RESIDUOS DE CAÑA (HOJAS Y COGOLLOS)	22
3.2. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN.....	22
3.3. PROCESO DE OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS.....	23
3.3.1. Deslignificación del material lignocelulósico.	24
3.3.2. Hidrólisis enzimática de los residuos deslignificados.....	26
3.3.3. Inactivación y centrifugación muestras de hidrolizado.....	27
3.3.4. Medición de azúcares reductores.	28
3.4. SELECCIÓN ENZIMAS CELULASA Y HEMICEULASA.	28
3.5. INFLUENCIA DE LAS ACTIVIDADES: CELULUSA, HEMICELULOSA Y PECTINASA EN LA SACARIFICACIÓN	29
3.7. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CÓCTEL ENZIMÁTICO.	32
3.7.1. Medición de actividades enzimáticas.....	32
3.8. COSTOS GENERALES	33
3.9. PRUEBA DE VALIDACIÓN	35
3.10. AJUSTE DE PARAMETROS CINÉTICOS.....	35

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	37
4.1. SELECCIÓN ENZIMAS CELULASA Y HEMICEULASA	37
4.2. INFLUENCIA DE LA CELULOSA, HEMICELULOSA Y LA PECTINASA EN LA SACARIFICACIÓN.....	38
4.3. INFLUENCIA DE LA RELACIÓN CELULOSA/HEMICELULOSA Y LA RELACIÓN CÓCTEL/SUSTRATO	41
4.4. COSTOS GENERALES	47
4.5. VALIDACIÓN DE RESULTADOS.....	48
4.6. DEFINICIÓN DE PARAMETROS CINÉTICOS CON EL CÓCTEL SELECCIONADO.	50
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	52
5.1. CONCLUSIONES	52
5.2. RECOMENDACIONES	53
REFERENCIAS	54
APÉNDICES	60
Apéndice A. Ensayos preliminares.	60
Apéndice B. Diseño Experimental para evaluar el efecto de la actividad pectinasa sobre la sinergia existente entre celulasas y hemicelulasas.	60
Apéndice C. Diseño experimental para definir la influencia de la relación Cóctel/ Sustrato y de la relación celulosa/hemicelulosa sobre el porcentaje de sacarificación.	65
Apéndice D. Cinética del coctel seleccionado	73
Apéndice E. Costos Globales	75
Apéndice F. Validación de resultados	78
ANEXO	72
Anexo A. Características de las enzimas empleadas.....	72
Anexo B. Método para medición de azúcares reductores	81
Anexo C. Método para medición de actividades enzimáticas	82
Celulosa Total:	82
Endo-glucanasa:	82
Exo-glucanasa:.....	83
Endo-xilanasa:	84

LISTADO DE TABLAS.

Tabla 1. Composición porcentual aproximada de los principales componentes en los residuos de la caña de azúcar de la variedad CC 8592 (Gómez, 2010).	22
Tabla 2. Condiciones deslignificación (Zambrano, 2015).	25
Tabla 3. Caracterización aproximada del sustrato deslignificado de residuos de la caña de azúcar (Zambrano, 2011).	26
Tabla 4. Condiciones operacionales de hidrólisis.	26
Tabla 5. Sustrato y método implementado para la determinación de la actividad enzimática.	32
Tabla 6. Parámetros de hidrólisis para determinación de costos.	33
Tabla 7. Escenarios de costos para las enzimas HTec2 y CTec2.	34
Tabla 8. Valores utilizados para la validación.	35
Tabla 9. Concentraciones de sustratos manejadas para la determinación de los parámetros de la ecuación de Michaelis-Menten.	35
Tabla 10. Medición celulasa y hemicelulasa de los cócteles enzimáticos.	41
Tabla 11. Caracterización de las actividades enzimática del cóctel seleccionado.	46
Tabla 12. Comportamiento del porcentaje de sacarificación a diferentes escalas de volumen.	49
Tabla 13. Parámetros cinéticos de la ecuación de Michaelis Menten (K_m y $V_{m\acute{a}x}$).	51

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de la lignocelulosa. (Rubín, 2008).	15
Figura 2. Caña de azúcar (izq). Residuos de cosecha: hojas verdes y secas (1) y cogollos (2).	15
Figura 3. Representación esquemática de la hidrólisis de la celulosa en el sistema de celulasas (Cuervo, Folch y Quiroz, 2009).	17
Figura 4. Representación Interacción Enzima-Sustrato (Segato, Demásio y Coutinho, 2014).	18
Figura 5. Velocidad de reacción Vs. Concentración de sustrato (Berg, Tymoczko y Stryer, 2008).	19
Figura 6. Representación gráfica de Lineweaver-Burk. (Berg, Tymoczko y Stryer, 2008).	20
Figura 7. Diagrama de bloques de las etapas de experimentación implementadas en esta investigación.	23
Figura 8. Diagrama de actividades	24
Figura 9. Reactor de deslignificación.	25
Figura 10. Agitador orbital marca Heidolph Incubator 1000.	27
Figura 11. Representación esquemática del diseño experimental 1 (fracciones voúmetricas). ..	29
Figura 12. Representación esquemática del diseño para determinar la influencia de la relación celulasa/hemicelulasa y cóctel/sustrato sobre el porcentaje de sacarificación.	31
Figura 13. Comportamiento del porcentaje de sacarificación para la hidrólisis con enzimas (carga cóctel / sustrato (mL/g) de 0.25).	37
Figura 14. Comportamiento del porcentaje de sacarificación para la hidrólisis de residuos deslignificados de caña de azúcar con mezclas de enzimas celulasa, hemicelulasa y pectinasa.	38
Figura 15. Graficas de contorno de mezcla para porcentaje de sacarificación en 12 y 24 h.	39
Figura 16. Gráfica de efectos principales para las enzimas Cellic CTec2, Cellic HTec2 y Pectinex Ultra para 24 horas.	40
Figura 17. Relación celulasa/hemicelulasa vs cellic HTec2/cellic CTec2.	42
Figura 18. Variación en el tiempo de 12 a 48 h del porcentaje de sacarificación para los tratamientos.	43

Figura 19. Gráfica de efectos principales para hidrólisis a 48 h.	44
Figura 20. Graficas de contorno para la hidrólisis a 12, 24, 36 y 48 horas.	45
Figura 21. Costo etanol celulósico para cuando HTec2 y CTec2 cuestan 0.5 USD/gal etanol.	48
Figura 22. Cinética de formación de azúcares reductores.	50

NOMENCLATURA

FPU/mL	Filter Paper Units per milliliter (unidades de papel filtró por papel filtro)
PGU/ml	Unidades de poligalacturonasa por mililitro
UI/mL	Unidades internacional medición Exo-glucanasa por mililitro
CMC/mL	Unidades de carboximetil celulosa por mililitro
U/mL	Unidades medición endo-xilanasa por mililitro
SC Ajust.	Suma ajustada de los cuadrados
MC Ajust.	Cuadrados medios ajustados
GL	Grados de libertad
C/S	Relación cóctel/sustrato
PETG	Polietileno tereftalato de glicol.

1. INTRODUCCIÓN

Debido a la disminución de los recursos fósiles y los problemas ambientales asociados al uso indiscriminado de los mismos, la sociedad moderna se ha planteado la búsqueda e implementación de fuentes de energía alternativa como uno de los grandes retos por afrontar.

La biomasa lignocelulósica es una opción atractiva por su amplia abundancia y su característica de ser bio-renovable. En Colombia, el incremento en el contenido de biomasa residual producto del cambio gradual del sistema de cosecha de caña quemada a caña verde, constituye todo un desafío. La alta producción (0.5 ton biomasa/ton caña), hace que se dispongan anualmente de aproximadamente 11.5 millones de toneladas de residuos. Siendo un país donde se cosecha caña durante todo el año, el aprovechamiento de esta biomasa residual ofrece claras ventajas en la generación de energía limpia y productos con un alto valor agregado.

Cerca del 95% de la caña de azúcar colombiana es cosechada mecánicamente sin quemar, generando un alto porcentaje de residuos en los campos. Estos residuos (hojas y cogollos), se componen principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. Aproximadamente la mitad del carbono orgánico en la biosfera está presente en forma de celulosa, por lo que su conversión en combustibles y productos químicos valiosos como el ácido aconítico (empleado como plastificante del PVC), goza de gran importancia (Isikgor y Becer, 2015).

El jugo extraído de los cogollos y hojas verdes de la caña es rico en azúcares reductores, y para su obtención, las enzimas desempeñan un papel crítico en el proceso de hidrólisis (biocatalizadores). El uso industrial enzimático se ha extendido gradualmente en los últimos años; la alta especificidad, selectividad, eficiencia, no toxicidad, solubilidad en agua, biodegradabilidad y condiciones operativas favorables de pH, temperatura y presión; hacen que los biocatalizadores compitan aceptablemente frente a los catalizadores inorgánicos (Balsan, Benazzi y Maugeri, 2012).

La principal limitante del proceso enzimático ha sido el costo asociado. El costo de los biocatalizadores es función de la cantidad de proteína enzimática requerida para descomponer

los azúcares poliméricos (celulosa y hemicelulosa) en monómeros fermentables (Himmel, Ding y Johnson, 2007). La producción de etanol mediante la hidrólisis de la celulosa en monosacáridos simples ha sido considerada un proceso poco rentable financieramente. Sin embargo, debido al desarrollo rápido en los últimos años, el elevado precio que antes presentaba una significativa barrera para la hidrólisis enzimática, va siendo accesible a escala industrial. Considerables esfuerzos se han realizado para reducir el costo de producción y venta de las enzimas, cuyos frutos han sido nuevos cócteles a partir de mezclas de biocatalizadores con actividades complementarias que mejoran la eficiencia del proceso hidrolítico para sustratos pretratados (Merino y Cherry, 2007). Empresas como Novozymes A/S y Genencor con sus investigaciones han logrado reducir los costos de celulasas desde 4,5 dólares por galón de etanol hasta 20 centavos por galón de etanol (Costa et al, 2008).

Las nuevas enzimas han desplazado con rapidez en el mercado a sus antecesoras, siendo necesario nuevas investigaciones para alcanzar la mayor obtención de azúcares reductores. Aunque es amplia la literatura sobre la caracterización de enzimas comerciales y extractos enzimáticos crudos que contienen celulasas y hemicelulasas (importantes para la economía general del proceso de hidrólisis de la biomasa lignocelulósica), existen pocos estudios recientes sobre la hidrólisis enzimática de residuos agroindustriales de la caña de azúcar para obtener azúcares fermentables. En este sentido, este trabajo se centra en evaluar diferentes mezclas de enzimas comerciales, para definir un cóctel enzimático dirigido a la hidrólisis de residuos pretratados de caña de azúcar (hojas y cogollos), además de: 1) examinar la incidencia de la relación celulosa/hemicelulosa y la relación cóctel/sustrato en la hidrólisis enzimática de los residuos; 2) determinar la velocidad de hidrólisis en función de la concentración del sustrato, aplicando el modelo cinético de Michaelis-Menten, y 3) calcular costos globales del proceso de hidrólisis con el cóctel seleccionado, para un posible escalamiento a nivel piloto de una unidad experimental de hidrólisis.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 MARCO CONCEPTUAL

2.1.1 Celulosa, hemicelulosa y lignina.

El material lignocelulósico está compuesto principalmente de tres diferentes tipos de polímeros, celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 1). La **celulosa** está compuesta por subunidades de D-glucosa unidas por un enlace glucosídico β 1-4, que estructuran largas cadenas lineales (microfibrillas), unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares. Estas largas cadenas forman ocasionalmente redes cristalinas resistentes a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Chen, 2014).

La **hemicelulosa** es una estructura compleja de carbohidratos, que consisten en polímeros de diferentes azúcares como xilosa y arabinosa (pentosas), manosa, glucosa y galactosa (hexosas). El componente dominante de la hemicelulosa de las plantas agrícolas es el xilano. Tiene un peso molecular más bajo que la celulosa, tiene cadenas laterales cortas que constan de diferentes polímeros de azúcares relativamente fáciles de hidrolizar. Sirve como una conexión entre la lignina y las fibras de celulosa, brindando rigidez al conjunto celulosa-hemicelulosa- lignina (Chen, 2014).

La **lignina** es, después de la celulosa y la hemicelulosa, uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza y está presente en la pared celular. El objetivo principal de la lignina es dar a la planta el soporte estructural, impermeabilidad, y la resistencia contra el ataque microbiano y el estrés oxidativo (Ortiz, 2014).

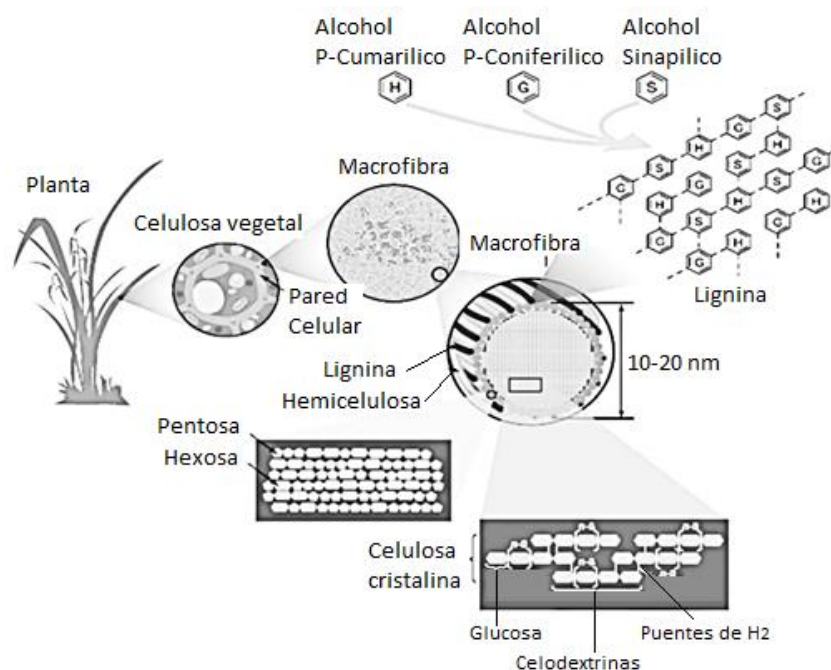


Figura 1. Estructura general de la lignocelulosa. (Rubín, 2008).

Los residuos de la cosecha de caña de azúcar: hojas y cogollos (Figura 2), constituyen alrededor del 25% de la caña limpia, poseen un promedio en peso de 42,0% ($\pm 1,5$) de celulosa, 22,1% ($\pm 0,9$) de hemicelulosa y 21,6% ($\pm 0,9$) de lignina en base seca (Gómez, 2010). El alto contenido de celulosa y hemicelulosa resulta atractivo para un aprovechamiento de estos residuos, direccionado a la obtención de azúcares fermentables.

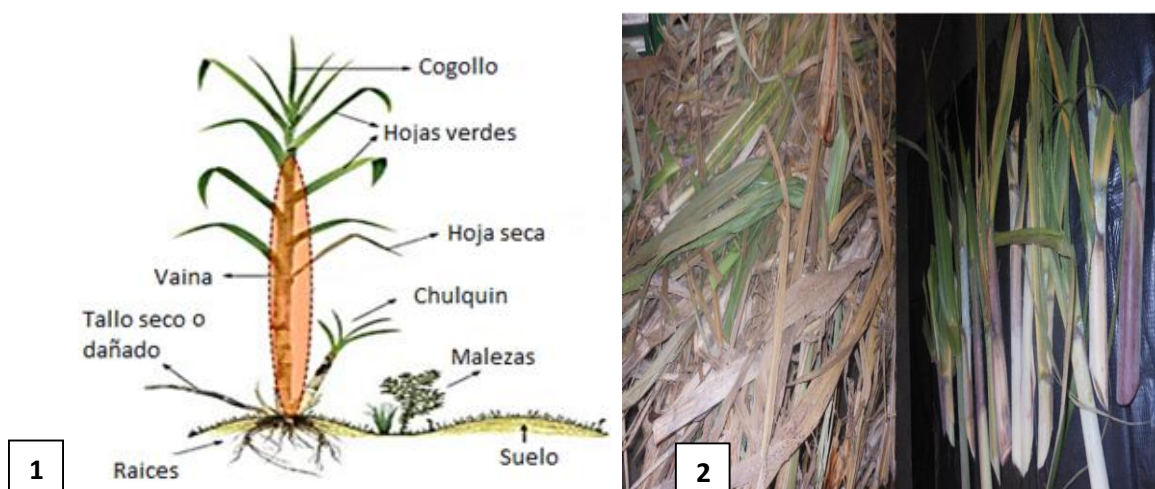


Figura 2. Caña de azúcar (izq.). Residuos de cosecha: hojas verdes y secas (1) y cogollos (2).

Existen tres pasos principales en el proceso de conversión de la lignocelulosa para la obtención de alcohol: 1) Pretratamiento: mejora el acceso de las enzimas a la celulosa; 2) Sacarificación o hidrólisis enzimática: uso de celulasas y ocasionalmente hemicelulasas; 3) Fermentación: de los azúcares liberados.

2.1.2. Pretratamiento del material lignocelulósico.

La finalidad del pretratamiento es remover la lignina, reducir la cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad del material, mejorando la liberación de azúcares y evitando la degradación o pérdida de carbohidratos, así como la formación de compuestos inhibitorios para la posterior fermentación.

De los diversos pretratamientos, la explosión por vapor es uno de los más efectivos para las maderas duras y desechos agrícolas como el de la industria azucarera (Sánchez y Cardona, 2008). La biomasa tratada con vapor saturado durante cierto tiempo a una temperatura de 160–260°C (0.69–4.83 MPa), causan reacciones de auto hidrólisis y principalmente rompimiento de las fibras y desprendimiento de la lignina. La adición de H_2SO_4 o NaOH como catalizadores químicos, mejora la posterior hidrólisis enzimática y disminuye la producción de compuestos inhibitorios.

2.1.3. Hidrólisis enzimática.

La conversión de la celulosa y la hemicelulosa a azúcares simples (glucosa, xilosa, manosa, ribosa, galactosa y arabinosa), se hace a través de un proceso denominado hidrólisis enzimática. Las enzimas logran una elevada especificidad en relación con el sustrato y su utilización reduce la obtención de subproductos indeseables (inhibidores), que resulta beneficioso para una fermentación (Ghana Zinchenko, 2012).

Las enzimas que hidrolizan la celulosa son las celulasas. Existen tres diferentes tipos: las **endoglucanasas**, que cortan azarosamente regiones amorfas de la celulosa, generando oligosacáridos, esto causa la disminución de las cadenas y un incremento de los azúcares reductores; las **exoglucanasas o celobiohidrolasas**, actúan sobre los extremos reductor y no

reductor de las cadenas de celulosa, liberando glucosa o celobiosa, y las **β -glucosidasas** que hidroliza la celobiosa y las celodextrinas que liberan dos moléculas de glucosa (Figura 3).

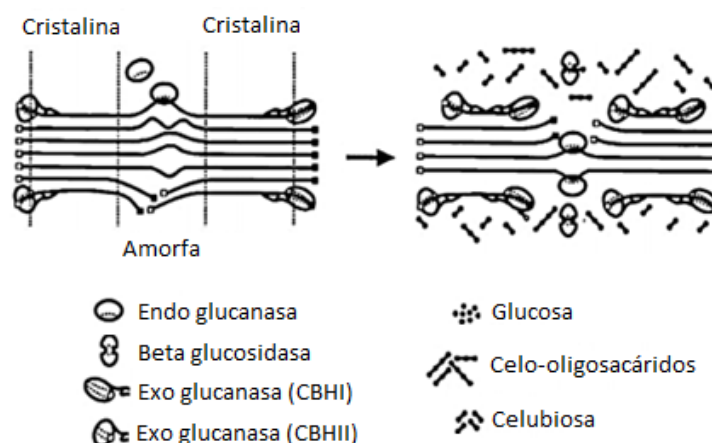


Figura 3. Representación esquemática de la hidrólisis de la celulosa en el sistema de celulasas (Cuervo, Folch y Quiroz, 2009).

Los principales factores que afectan la hidrólisis son las características de la biomasa, la temperatura, el pH, la relación mezcla de enzimas/sustratos y la composición del cóctel (Mussatto, 2016).

2.1.4. Azúcares Reductores (AR).

Se denomina técnicamente azúcares a los diferentes monosacáridos, disacáridos, y polisacáridos, que generalmente tienen sabor dulce, aunque por extensión se refiere a todos los hidratos de carbono; éstos están compuestos por carbono, oxígeno e hidrógeno (Barrow, 2000)

Los azúcares reductores son aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, y que a través de este, pueden reaccionar con otras moléculas que actúen como oxidantes.

2.1.5. Modelo cinético de Michaelis-Menten para reacciones de hidrólisis enzimática.

La mayoría de los modelos cinéticos propuestos para la reacción de hidrólisis enzimática son modelos semi-mecánicos, dentro de los cuales el más conocido es el modelo Michaelis-

Menten, usado durante mucho tiempo para caracterizar la cinética de reacciones entre un sustrato y un tipo de enzima en sistemas homogéneos; recientemente empleado para describir la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos. El modelo es válido para cuando la concentración del sustrato es mayor que la de la enzima. (Suárez, Cavalcanti, Da Costa, Et al, 2014).

La ecuación de Michaelis-Menten (Ec.1) es capaz de describir el cambio sufrido en la velocidad de reacción (V_0), catalizada por una enzima al variar la concentración del sustrato [S].

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Donde $V_{\max}$ representa la velocidad máxima, que se obtiene cuando la velocidad de reacción se hace independiente de la concentración de sustrato, K_m es la constante de Michaelis, dada por la concentración del sustrato a la mitad de la velocidad máxima. Cuanto menor es el valor de K_m , menor es la cantidad de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima, por lo que mayor será la afinidad de la enzima sobre el sustrato (Chauve et al, 2013).

La reacción que se establece entre la enzima (E) y su sustrato (S), va precedida de la formación de un complejo (ES) para la obtención del producto deseado (P) (Figura 4).

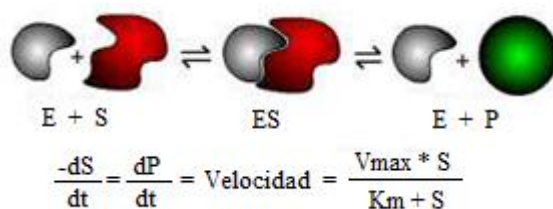


Figura 4. Representación Interacción Enzima-Sustrato (Segato, Demásio y Coutinho, 2014).

Michaelis demostró que las sucesivas adiciones de sustrato al medio de la reacción provocan un abrupto incremento de la velocidad de reacción hasta que la enzima se satura, instante en

que la adición posterior de sustrato ya no afecta a la velocidad, alcanzando la velocidad máxima de reacción (Figura 5) (Pratto y Sousa, 2016).

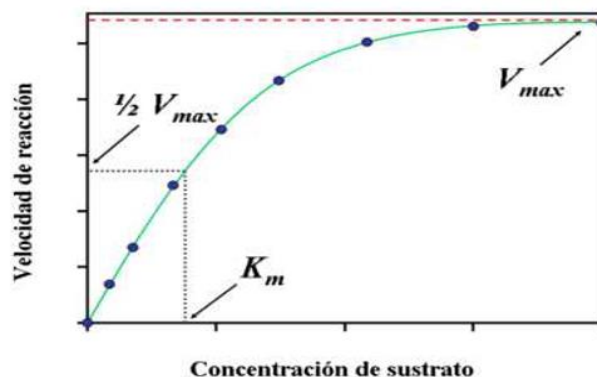


Figura 5. Velocidad de reacción Vs. Concentración de sustrato (Berg, Tymoczko y Stryer, 2008).

2.1.6. Diagrama de Lineweaver-Burk.

Este diagrama basado en la ecuación 1, se emplea como herramienta para calcular los parámetros cinéticos de una enzima. Su utilidad se basa en que el recíproco de la cinética de Michaelis-Menten, es fácilmente representable y que de él emana mucha información de interés en el campo de la bioquímica (Manuel y Carmona, 2015).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$

La representación gráfica de Lineweaver-Burk permite identificar la K_m (constante de Michaelis-Menten) y V_{max} (velocidad máxima); el punto de corte con el eje de ordenadas es el equivalente a la inversa de V_{max} , y el de abscisas es el valor de $-1/K_m$ (Figura 6).

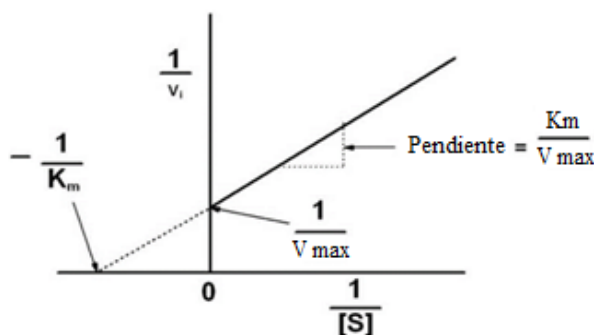


Figura 6. Representación gráfica de Lineweaver-Burk. (Berg, Tymoczko y Stryer, 2008).

2.2. ANTECEDENTES

Los avances en la biotecnología industrial ofrecen oportunidades potenciales para la conversión enzimática de residuos agroindustriales en combustibles y productos bioquímicos. Sin embargo, para que sea económicamente factible, es necesario minimizar el costo de los cócteles enzimáticos que influyen significativamente en la viabilidad del proceso global.

Estudios recientes han sido dirigidos a aumentar la eficiencia de la degradación de la biomasa por cócteles enzimáticos. Mendoza, Pardo y Galán (2011), evaluaron la hidrólisis enzimática de residuos de la cosecha de la caña de azúcar (hojas y cogollos), empleando cinco distintos cocteles elaborados a partir de: Accellerase® 1500, Accellerase® XY, Accellerase® XC, Accellerase® BG, Klerzyme 150®, Celluclast®, Optimash™ BG, Pectinex Ultra, Rapidase® ADEX, Clarex Citrus, Viscozyme® L y Citrozyme® Ultra. Encontraron porcentajes de sacarificación de hasta 78.61%, en un coctel aplicado con perfil enzimático de 25.53 FPU/mL de celulasa total, 28.23 UI/mL de xilanasa, 1782.1 CMC/mL de endoglucanasas y 0.377 UI/mL de exoglucanasas, para material lignocelulósico con contenido promedio de celulosa de 80.53%, hemicelulosa de 13.35% y lignina de 1.36%, en una hidrólisis con temperatura de 50°C y un pH entre 3.8 y 4.2.

Joshua Wallace (2013), estudió la hidrólisis enzimática en bagazo de caña para la obtención de etanol celulósico, empleando las enzimas Cellic CTec2, Cellic HTec2 y Pectinex Ultra SP. Encontró un rendimiento de etanol de hasta el 79,2% con un coctel optimizado de 0.15 mL Cellic CTec2 por gramo de sustrato y 0.213 mL Cellic HTec2 por gramo de sustrato, una

dosificación de 20 FPU/ gramo de sustrato, bajo un proceso con temperaturas de 50°C, pH DE 5 y una agitación de 100 RPM, en un sustrato con 46.2, 4.78 y 34.04% de celulosa, hemicelulosa y lignina respectivamente.

Pirota, Delabona y Farinas (2014), estudiaron la hidrólisis en diferentes muestras de bagazo de caña a partir de la enzima comercial Cellic Cetec2® y las enzimas de las cepas de *Aspergillus Oryzae* (P6B2 y P27C3A) de la selva amazónica (muestras pretratadas con vapor y con una composición final promedio en términos de celulosa, hemicelulosa y lignina, de 51.7%, 8.9% y 34,3% respectivamente). En sus investigaciones encontraron valores de conversión del 20% en términos de glucosa y 44,8% en términos de TRS (azúcares reductores totales), empleando una combinación de *A. oryzae* P27C3A con una dosis mínima en 0,05 FPU (unidades de papel filtro) por mL de la enzima comercial, a un pH de 4.8, una temperatura de 50°C y una agitación constante de 200 rpm, durante 72 horas.

Sofía Paz (2015), evaluó la hidrólisis enzimática de hojas y cogollos de la caña de azúcar (previamente tratados con organosolventes), usando diferentes cócteles de enzimas codificados de acuerdo con sus niveles de actividades celulosicas y hemicelulosicas, analizando la incidencia de las variables de composición del sustrato, composición del cóctel enzimático y relación coctel enzimático/sustrato para la hidrólisis. Sus estudios arrojaron que el preparado enzimático de una composición de 0,52 FPU de celulasas/ UI de hemicelulasas, produjo un IGH (Índice Global de Hidrólisis) de hasta 82.3, en un sustrato con composición en peso de 83%, 7% y 5% de celulosa, hemicelulosa y lignina respectivamente, bajo un pH de 4.8 y una temperatura de 40°C.

Aramrueang, Zicari y Zhang (2017), evaluaron los efectos de la carga de enzimas en la hidrólisis de hojas de remolacha azucarera para la producción de bioetanol, usando un coctel enzimático conformado por las enzimas: Cellic CTec2, Cellic HTec2 y Pectinex Ultra SP. Sus estudios encontraron una conversión de hasta el 82 % en azúcares liberados en un tiempo de 72 horas, con un coctel de 30 FPU/mL para celulasa y 150 PGU/mL para pectinasa, en una hidrólisis con condiciones de 50°C, 150 RPM en agitación y un pH de 4.8, en un sustrato con 11.0, 2.4 y 11.0% en glucanos, xilanos y ácidos poligalacturónicos respectivamente.

3. METODOLOGÍA

3.1. RESIDUOS DE CAÑA (HOJAS Y COGOLLOS)

Se utilizaron muestras aleatorias de residuos de hojas y cogollos de la caña de azúcar, correspondientes a las variedades CC 8592 (variedad más utilizada en la industria azucarera colombiana) (Josué López, 2015). El material recolectado fue lavado con agua caliente (a 96°C) con el fin de retirar impurezas y residuos provenientes del proceso de cosecha, secado a temperatura ambiente bajo el sol durante 16 horas, molido en un molino forrajero hasta obtener un tamaño de partícula de 4 cm aproximadamente y almacenado para uso posterior. La composición de los residuos se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición másica (%) aproximada de los principales componentes en los residuos de la caña de azúcar de la variedad CC 8592 (Gómez, 2010).

Componente	CC 8592
Humedad	8,15 ($\pm$ 0,095)
Hemicelulosa	21,08 ($\pm$ 0,901)
Hidrosolubles	7,20 ($\pm$ 0,212)
Celulosa	41,80 ($\pm$ 1,523)
Cenizas	3,34 ($\pm$ 0,138)
Lignina Klason	20,51 ($\pm$ 0,895)

3.2. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

Para dar cumplimiento a los objetivos específicos anteriormente planteados, se siguieron las siguientes etapas de experimentación: (1) un tratamiento de los residuos lignocelulósicos para facilitar el ataque enzimático, (2) ensayos preliminares de hidrólisis con enzimas puras sin mezclar para la selección de las mejores enzimas celulasas y hemicelulasas disponibles, (3) un diseño experimental de mezclas tipo centroide simplex que permitió establecer el comportamiento hidrolítico de diferentes cócteles conformados con las enzimas seleccionadas y la presencia de actividad pectinasa. Posteriormente se realizó (4) un diseño experimental central compuesto con el que se observó la incidencia de la relación celulosa/hemicelulosa y la

relación cóctel/sustrato sobre el porcentaje de sacarificación. Finalmente, con el cóctel seleccionado se realizó (5) la validación de resultados, (6) determinación de parámetros cinéticos y (7) una determinación de costos generales (Figura 7).

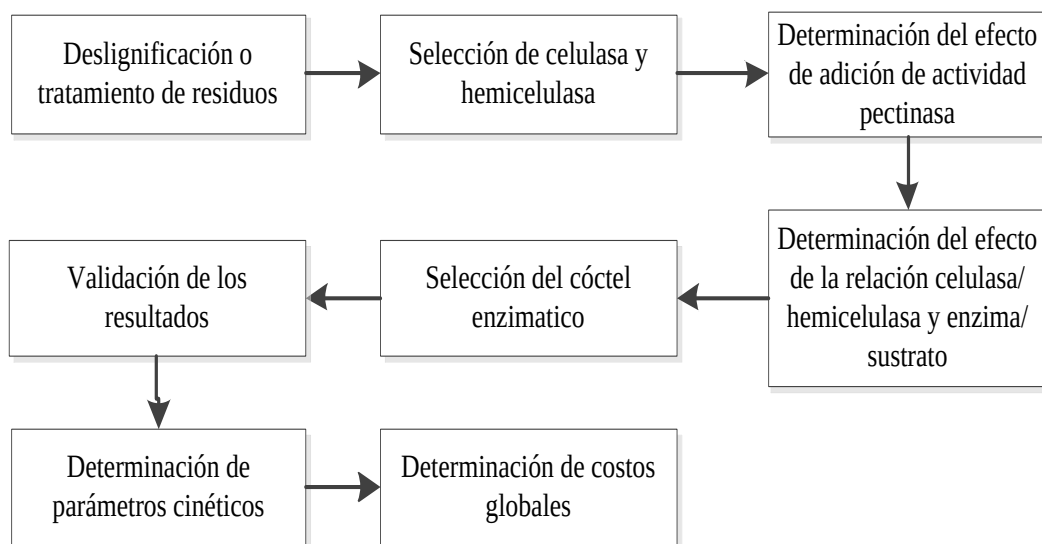


Figura 7. Diagrama de bloques de las etapas de experimentación implementadas en esta investigación.

3.3. PROCESO DE OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS

Los residuos de la caña de azúcar (hojas y cogollos) pasaron a una etapa de deslignificación para remover la lignina presente y aumentar la accesibilidad al ataque enzimático. Posteriormente se llevaron a una etapa de hidrólisis enzimática en la que se despolimerizó el material holocelulósico hasta llevarlo a azúcares fermentables (Figura 8).

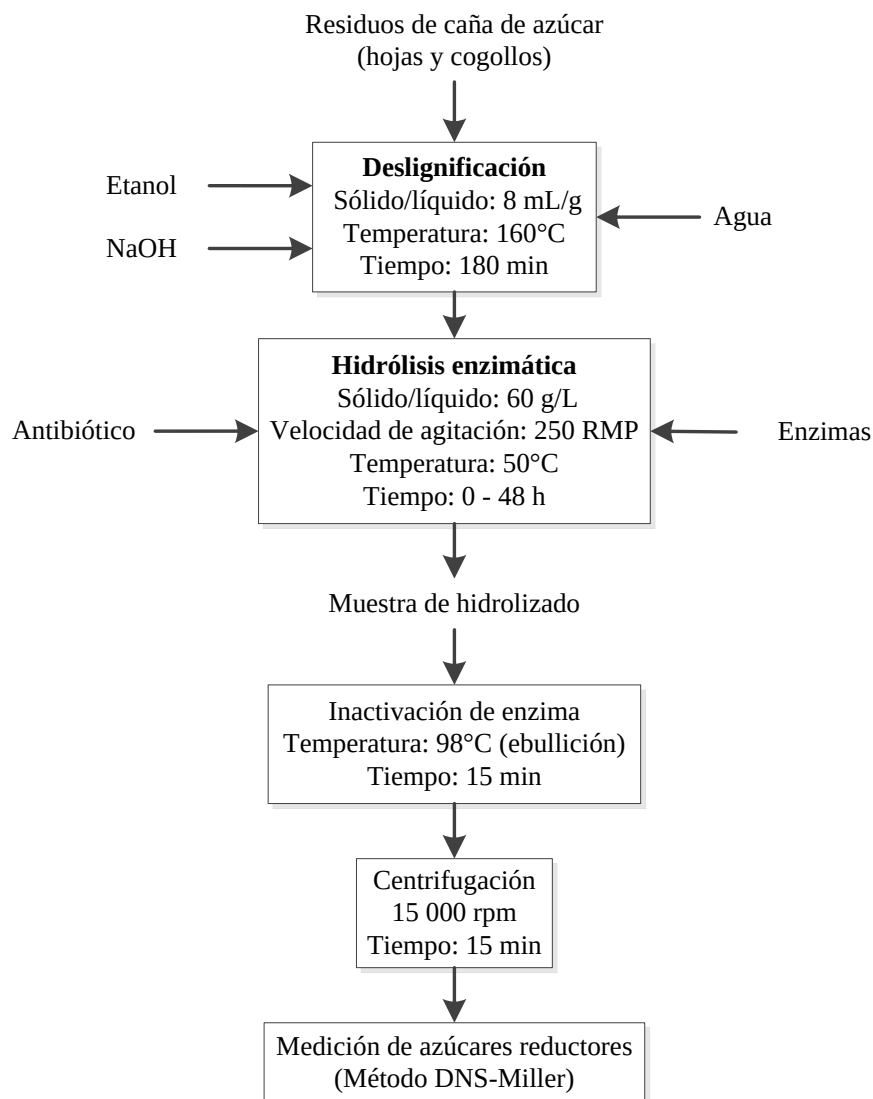


Figura 8. Diagrama de actividades

3.3.1. Deslignificación del material lignocelulósico.

Los residuos de caña fueron pasados a un pretratamiento de deslignificación por el método de explosión de vapor con etanol e hidróxido de sodio, bajo las condiciones encontradas por el grupo de investigación GRUBIOC que permite una remoción de aproximadamente del 80% de la lignina presente (tabla 2) (Zambrano, 2015).

Tabla 2. Condiciones deslignificación (Zambrano, 2015).

Condición	Valor
Etanol (% v/v)	50
Relación sólido/líquido (ml/g)	8
NaOH (% p/v)	5
Temperatura operación (°C)	160
Tiempo de operación (min)	180

La deslignificación de los residuos se realizó en un reactor de acero inoxidable enchaquetado, equipado con un manómetro, termómetro, una termocupla y un panel de control, con los cuales fue posible realizar el monitoreo de la temperatura en el tanque (Figura 9).

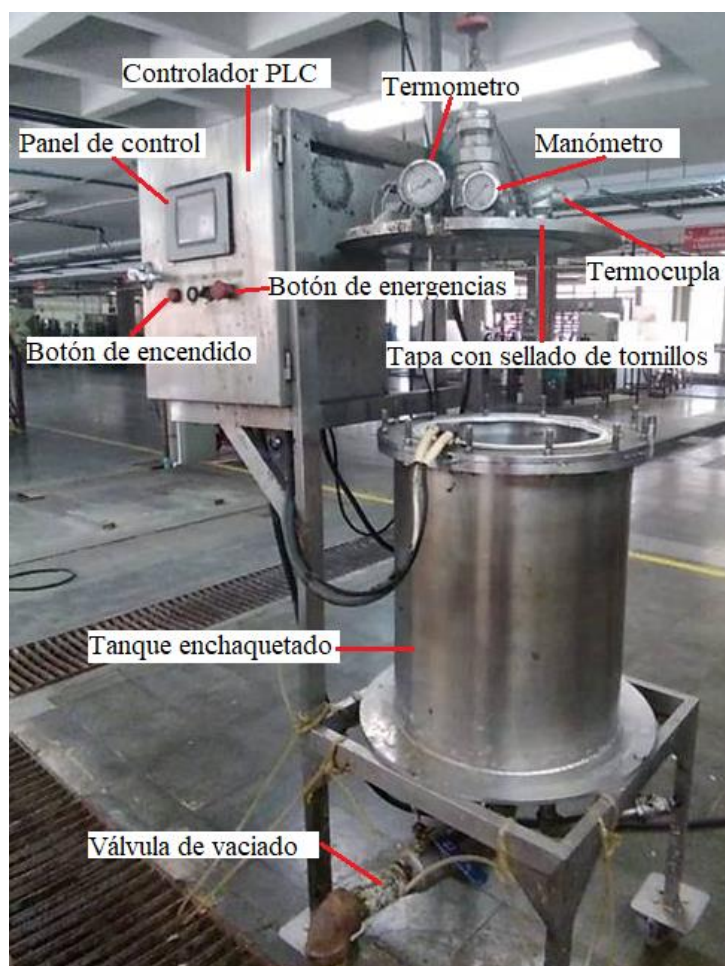


Figura 9. Reactor de deslignificación.

El material obtenido del reactor de deslignificación se sometió a un lavado con suficiente agua hasta desalojar el NaOH y el etanol, se secó en un horno a 60°C por 20 horas, se redujo hasta obtener un tamaño de partícula de 2 mm en una trituradora con aspas y finalmente se almacenó para posterior hidrólisis. La caracterización del sustrato (Tabla 3), fue proporcionada por el grupo de investigación GRUBIOC.

Tabla 3. Caracterización aproximada del sustrato deslignificado de residuos de la caña de azúcar (Zambrano, 2011).

Característica	Valor
Hemicelulosa (% p/p)	23.80
Celulosa (% p/p)	62.30
Lignina (% p/p)	6.14
Otros (% p/p)	7.76

La determinación de la celulosa, hemicelulosa y lignina, fue calculada por Zambrano (2011), mediante el método del número Kappa (para lignina) y el método de Van Soest (para celulosa y hemicelulosa).

3.3.2. Hidrólisis enzimática de los residuos deslignificados

Las condiciones de operación para los distintos ensayos enzimáticos (Tabla 4) se eligieron basados en las recomendaciones del proveedor de las distintas enzimas (Anexo A) y a la literatura especializada. Estudios bajo condiciones similares de operación en biomasa lignocelulósica, han obtenido porcentajes de sacarificación por encima del 80% en 48h (Salcedo, 2013) (Joshua Wallace, 2013) (Aramrueang, Zicari y Zhang, 2017).

Tabla 4. Condiciones operacionales de hidrólisis.

Condición de operación	Valor
Temperatura	50 °C
Agitación	250 rpm
pH	4.8 (Buffer citrato sódico 0.5 M).
Carga cóctel/Sustrato	0.2
Carga de sustrato del deslignificado	60 g/mL
Volumen de ensayo	25 mL
Antibiótico*	Amoxicilina (2.5 mg/mL de solución)

Estudios preliminares demuestran que es necesario la adición de antibióticos para la inhibición de la contaminación microbiana, como Aramrueang et al., (2017).

Las hidrólisis se llevaron a cabo en un agitador orbital, marca Heidolph (INKUBATOR 1000) (Figura 10), el cual cuenta con un control de la temperatura y de velocidad de agitación en rpm.

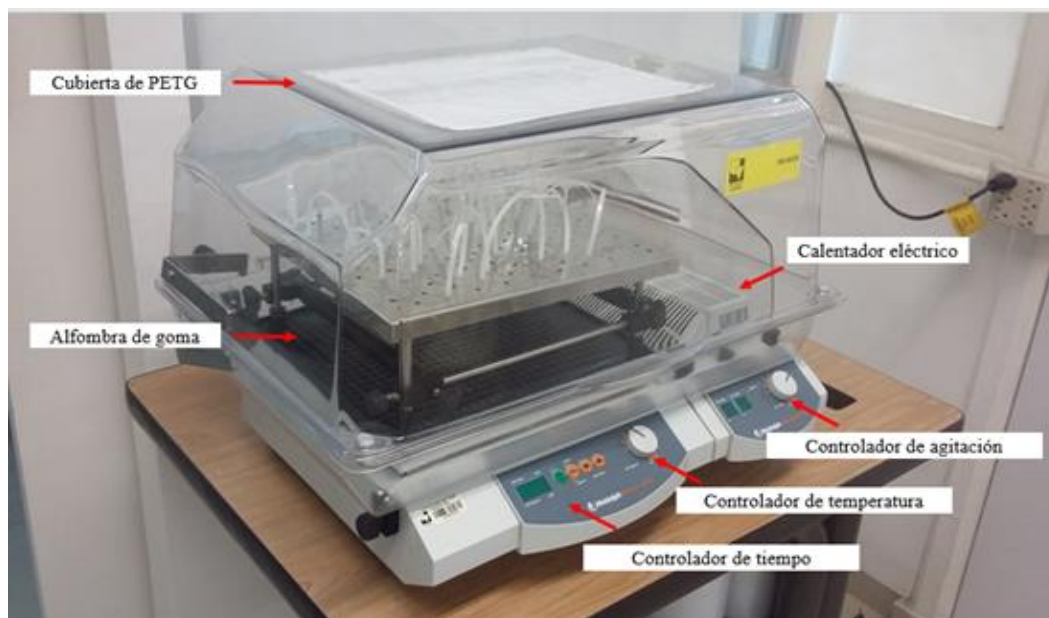


Figura 10. Agitador orbital marca Heidolph Incubator 1000.

3.3.3. Inactivación y centrifugación muestras de hidrolizado.

- Se tomó muestras del hidrolizado en diferentes horas (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 y 48 h).
- Durante 15 minutos se realizó una inactivación de las enzimas mediante un baño térmico a 96°C (agua en estado de ebullición). Las muestras tratadas se guardaron a -5°C para evitar contaminación microbiana, hasta la posterior medición de azúcares reductores.
- Se centrifugaron las muestras a 15000 rpm durante 15 minutos para precipitar los sólidos en la muestra y medir en el sobrenadante, los azúcares reductores por triplicado.

3.3.4. Medición de azúcares reductores.

Se estableció la medición de azúcares reductores (A.R) liberados, por el método del ácido DNS (Anexo B), ensayo recomendado por la Internacional Unión de Química Pura y Aplicada (IUPAC) (Saqib y Whitney, 2011). Para este paso, se utilizó un espectrofotómetro programable de amplia gama, marca SmartSpectro2, con un rango de longitud de onda de 350-1000 nm.

A partir de los resultados de los azúcares reductores, se calculó como variable de respuesta en todas las hidrólisis el porcentaje de sacarificación (%S), este valor se calculó usando la ecuación (Ec. 3) de Mandel y Stemberg (1976) cuyo factor de 0.9 está relacionado a la estequiometría de la reacción. El porcentaje de sacarificación es muy aplicado en la literatura como índice del rendimiento hidrolítico. La concentración del sustrato se tomó en base.

$$\% \text{ Sacarificación} = \frac{\text{Azúcares reductores (mg/mL)} * 0.9 * 10^2}{\text{concentración de sustrato (mg/ mL)}}$$

(3)

3.4. SELECCIÓN ENZIMAS CELULASA Y HEMICEULASA.

Se realizaron hidrólisis con diferentes enzimas del mercado; 4 enzimas con actividad predominante celulasa: Accellerase 1500, Cellic CTec2, Celulosa 2XL y Viscozyme; y 2 enzimas hemicelulasas: Cellic HTec2 y Accellerase XY, escogidas por sus características enzimáticas (anexo A) y sus aplicaciones previas en residuos holocelulósicos. Esto a fin de comparar la capacidad hidrolítica individual de cada enzima y hacer una selección inicial de las más adecuadas para la conformación del cóctel (una por cada tipo de actividad).

Las actividades celulasa y hemicelulasa se escogieron con base a que la celulosa (entre el 60 y 70%) y la hemicelulosa (entre el 15 y el 25%) son los componentes principales en residuos deslignificados de la caña de azúcar (Bautista Jonathan, 2010; Zambrano Yesid, 2015). Para la experimentación, se utilizó una carga enzima/sustrato de 0.20 mL/g acorde a trabajos previos realizados por el grupo de investigación GRUBIOC (Ramírez y Toro, 2015).

3.5. INFLUENCIA DE LAS ACTIVIDADES: CELULOSA, HEMICELULOSA Y PECTINASA EN LA SACARIFICACIÓN

Se realizó un diseño experimental de mezclas tipo centroide simplex, con las enzimas seleccionadas en el ensayo preliminar (Cellic CTec2 y Cellic HTec2) y la presencia de una enzima pectinasa (Pectinex Ultra SP), para determinar la influencia de estas enzimas sobre la sacarificación de los residuos. Estudios previos han mostrado buenos rendimientos empleando las tres actividades (celulasas, hemicelulasas y pectinasas) en la conformación de un cóctel enzimático para la hidrólisis de sustratos lignocelulósicos; rendimientos obtenidos de hasta un 82% para sustratos de hojas de remolacha azucarera (Aramrueang, Zicari y Zhang, 2017) y hasta un 79% en pretratados de bagazo de caña (Joshua Wallace, 2013). Con este diseño experimental se analizó el comportamiento y capacidad hidrolítica de los cócteles conformados por la combinación de las tres actividades.

Las enzimas se añadieron en proporciones volumétricas de acuerdo con el diseño experimental de mezcla obtenido por el software estadístico Minitab 17 (cócteles C1-C10) (Tabla A1 en apéndice A). El diseño de mezcla resulta una alternativa acertada en la formulación y optimización de las proporciones de dosificación, ya que requiere menos experimentos y menos tiempo, proporcionando una técnica más rentable (D Sel, 2015). En la figura 11, se muestra una representación esquemática del diseño experimental propuesto.

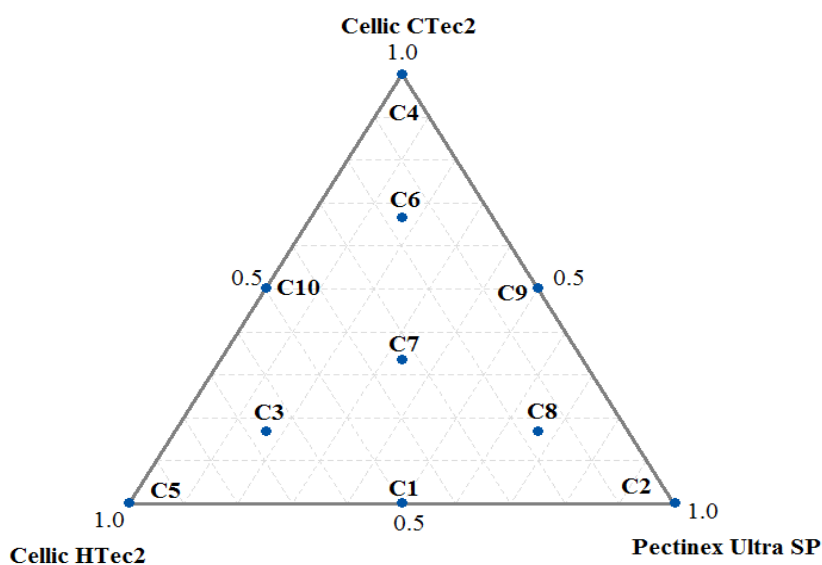


Figura 11. Representación esquemática del diseño experimental 1 (fracciones volumétricas).

Para evaluar la influencia de las enzimas en los cócteles enzimáticos se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos a las 12 y 24 horas de hidrólisis, empleando un modelo estadístico (apéndice B), de este modelo se obtuvieron las gráficas de contorno y de efectos principales obtenidos por el modelo matemático ajustado. El parámetro Valor P requerido en el análisis estadístico se fijó a un nivel de significancia del 5%, con la hipótesis nula (H_0) de que los coeficientes del modelo son iguales a cero y no influyen sobre la variable de respuesta.

La gráfica de efectos principales se realizó para analizar la significancia de los distintos factores, se conoce que una pendiente que tiende a 0 u horizontal, significa que los niveles evaluados ejercen la misma influencia sobre la variable de respuesta, en tanto que una pendiente alejada de 0, indica una fuerte diferencia entre un nivel y otro.

Para el diseño experimental I y los ensayos preliminares se fijó una relación enzima/sustrato o cóctel/sustrato de 0.20 mL/g.

3.6. DETERMINACIÓN DEL EFECTO O INFLUENCIA DE LA RELACIÓN CELULASA/HEMICELULASA Y DE LA RELACIÓN CÓCTEL/SUSTRATO EN LA SACARIFICACIÓN

Se empleó un diseño experimental central compuesto con cinco réplicas en los puntos centrales y 4 puntos estrellas, para la determinación del efecto de la relación volumétrica de las enzimas Cellic HTec2/CTec2 y la relación cóctel/sustrato (mL/g) sobre el porcentaje de sacarificación (%S) en diferentes tiempos (12, 24, 36 y 48 h).

Se fijó la relación cóctel/sustrato (C/S) en un rango de investigación de 0.038 a 0.462 mL/g; un rango mayor al utilizado en investigaciones previas como: Salcedo (2011) quien manejó valores entre 0.05 a 0.30 mL/g, y Wei, Liu y Yang (2013) quienes manejaron valores de C/S entre 0.10 y 0.25 mL/g. Lo anterior con el objetivo de abarcar un estudio más amplio.

En cuanto a la relación HTec2/CTec2 se manejó relaciones enzima Cellic HTec2/enzima Cellic CTec2 (mL/mL) de 0.38 a 4.62, este rango traduce a una composición porcentual de 72.46 a 17.79% v/v de CTec2. En la figura 12 se muestra una representación esquemática del diseño experimental empleado, donde se visualiza los distintos tratamientos y las réplicas centrales (T2, T4, T7, T9, T11 y T12). La tabla C1 del apéndice C muestra las condiciones de operación y el normalizado de las variables.

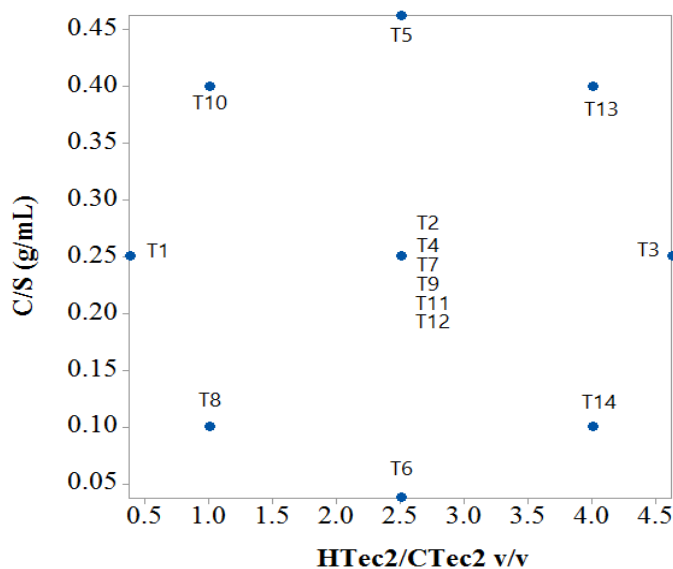


Figura 12. Representación esquemática del diseño para determinar la influencia de la relación celulosa/hemicelulosa y cóctel/sustrato sobre el porcentaje de sacarificación.

Para evaluar la influencia los tratamientos enzimáticos, se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos a diferentes horas, empleando un modelo estadístico que se ajustó a los datos obtenidos (apéndice C), de este modelo se obtuvieron las gráficas de contorno y de efectos principales. El parámetro valor P requerido en el análisis estadístico se fijó a un nivel de significancia del 5%, con la hipótesis nula (H_0) de que los coeficientes del modelo son iguales a cero y no influyen sobre la variable de respuesta.

Con base en las actividades reportadas de las enzimas puras (anexo A), se decidió fijar la cantidad de Cellic CTec2 y variar la de Cellic HTec2 en el cóctel enzimático, con el fin de “fijar” la concentración de celulosa (la contribución de Cellic HTec2 es mínima en esta actividad).

De manera indirecta se halló la incidencia de la relación celulosa/hemicelulosa expresada en FPU/U sobre el porcentaje de sacarificación, a medida que se adicionó mayor volumen de la enzima Cellic HTec2 la concentración de hemicelulasa dentro del cóctel se incrementó, disminuyendo la relación celulosa/hemicelulosa. Se denominó relación celulosa/hemicelulosa, a la razón entre el valor de la actividad celulasa total y la endo-xilanasa. Estos valores fueron medidos para los distintos cócteles trabajados.

3.7. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CÓCTEL ENZIMÁTICO.

La selección del mejor cóctel enzimático corresponderá a aquel con el mejor rendimiento logrado (porcentaje de sacarificación), se tendrá en cuenta los gráficos de efectos principales y de contorno obtenidos del tratamiento estadístico del diseño experimental II.

3.7.1. Medición de actividades enzimáticas

Para la valoración de la actividad enzimática de las enzimas y de los cócteles, se realizaron mediciones de actividades de endo-glucanasa, exo-glucanasa, Celulosa total y Endo-xilanasa, usando los métodos y sustratos descritos en la Tabla 5.

Tabla 5. Sustrato y método implementado para la determinación de la actividad enzimática.

Actividad Enzimática	Sustrato	Método
β -1,4-endo glucanasa	Carboximetil celulosa	Ghose, 1987; Wood et al, 1988; Mandels et al, 1976, IUPAC
β -1,4-exo glucanasa	Celulosa microcristalina	
Celulasa total	Papel Whatman No 1.	Mandels et al, 1976
Endo-1,4- β -Xilanasa	XylX6	Megazyme (método XyIX6)

El Anexo C se incluye la descripción de los métodos implementados para la determinación de la actividad enzimática.

3.8. COSTOS GENERALES

Para la estimación de los costos asociados a la hidrólisis de residuos deslignificados de la caña de azúcar, se consideraron los siguientes parámetros de operación (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros de hidrólisis para determinación de costos.

Parámetro	Dato
Condiciones de residuo deslignificado o de sustrato	Celulosa: 23.80, Hemicelulosa: 62.30, Lignina: 6.14 y otros: 7.76.
Humedad (%)	2.47
Concentración de enzima (L/kg)	0.038 – 0.462
Relación enzimática de HTec2/CTec2 v/v	1.0
Concentración de sustrato (kg/L)	0.06
pH	4.8
Temperatura (°C)	50
Presión (atm)	1.0
Velocidad de agitación (rpm)	250 rpm

Los costos de las enzimas son casi exclusivamente informados en términos de dólares por galón de biocombustible (etanol en particular). Un valor que depende de varios factores como: el costo de producción de la enzima, la elección de la materia prima (el sustrato a hidrolizar), la carga de enzima y el rendimiento global de hidrólisis y fermentación (Klein, Oleskowicz y Simmons, 2012).

El costo de la enzima Cellic CTec2 y HTec2, de acuerdo con lo reportado por su fabricante, se encuentra alrededor de 2 USD por galón de etanol (Novozyme, 2010). Dado que se desconoce el valor exacto de estas enzimas, se varió cada una en un rango de 0.5 a 3.0 USD/galón de etanol (0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 USD/galón etanol). Los escenarios de costos analizados se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Escenarios de costos para las enzimas HTec2 y CTec2.

Escenario N°	HTec2 (USD/galón etanol)	CTec2 (USD/galón etanol)
1	0.5	0.5
2	0.5	1.0
3	0.5	2.0
4	0.5	3.0
5	1.0	0.5
6	1.0	1.0
7	1.0	2.0
8	1.0	3.0
9	2.0	0.5
10	2.0	1.0
11	2.0	2.0
12	2.0	3.0
13	3.0	0.5
14	3.0	1.0
15	3.0	2.0
16	3.0	3.0

Para estimaciones del etanol producido por hidrolizado, se tuvo en cuenta trabajos previos de GRUBIOC, Velásquez (2015), encontró un valor de 0.6135 litros de etanol producido por kilogramo de hidrolizado de residuos de caña, en el estudio sobre fermentación con levadura (*Saccharomyces Cerevisiae*) de hidrolizados de residuos deslignificados de hojas y cogollos de caña. Se consideró un reactor discontinuo para la hidrólisis, con capacidad de 200 litros y una potencia de consumo de 0.2 kWh, teniendo en cuenta las consideraciones realizadas por Woiciechowski et. Al., (2002) para la hidrólisis de bagazo de caña. Las estimaciones de los costos fueron calculadas para una base de 10 kg de residuos deslignificados de caña, se utilizó una tasa de cambio de 1 dólar USA por 2843 pesos colombianos COP (valor promedio del dólar en el año 2018), una tarifa energética industrial de 360 COP/kWh (EMCALI, 2018), un precio de etanol de 2006 \$COP/Litro, según la Federación de Biocombustibles de Colombia para el año 2018 y unos costos de 500 USD/ton y 400 USD/ton para ácido cítrico y citrato de sodio respectivamente (de acuerdo con reportes en Alibaba, 2018), estos dos últimos tenidos en cuenta para estimar los costos del buffer.

Con estos datos se procede a hallar los costos (enzimas, buffer y consumo eléctrico) en los diferentes escenarios para producir 1 L de etanol, dicho valor se compara con el del mercado nacional y se elige las condiciones donde la rentabilidad del proceso es mayor.

3.9. PRUEBA DE VALIDACIÓN

Se realizó una validación de la hidrólisis con el cóctel enzimático seleccionado al doble y cuádruple en volumen, con el fin de observar cómo se comportan el porcentaje de sacarificación para unas condiciones de volumen extrapoladas (Tabla 8). Las condiciones operadas fueron de una relación cóctel/sustrato de 0.40 g/mL, una concentración deslignificado de 60 g/L y una relación volumétrica de Cellic CTec2/Cellic HTec2 de 1:1.

Tabla 8. Valores utilizados para la validación.

Escalado	x1	x2	x4
Volumen (mL)	25	50	100
Sustrato deslignificado (g)	1.5	3.0	6.0
Coctel (mL)	0.6	1.2	2.4

3.10. AJUSTE DE PARAMETROS CINÉTICOS

Para la medición del cálculo de los parámetros cinéticos de Michaelis Menten (V_{max} y K_m) en el tratamiento enzimático con el mejor cóctel seleccionado, se realizaron hidrólisis a diferentes concentraciones de sustrato deslignificado (Tabla 9).

Tabla 9. Concentraciones de sustratos manejadas para la determinación de los parámetros de la ecuación de Michaelis-Menten.

Coctel	Sustrato (g/L)
S1	5
S2	15
S3	30
S4	45
S5	55
S6	60
S7	75
S8	90

Las hidrólisis se hicieron empleando 1 mL del cóctel seleccionado a las concentraciones anteriores de sustrato, con el fin de identificar cómo varía la velocidad de formación de azúcares reductores a 48 h (instante donde se obtiene el mayor porcentaje de sacarificación).

Se reconoció como sustrato de liberación para la ecuación de Michaelis, los gramos de azúcares reductores liberados, por lo que la velocidad de formación de producto se tomó como gramos de azúcares reductores por hora. Para la obtención de las constantes cinéticas se utilizó el diagrama de Lineweaver-Burk.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1. SELECCIÓN ENZIMAS CELULASA Y HEMICEULASA

Se alcanzó los mayores porcentajes de sacarificación con las enzimas de tipo celulasas (entre 46.9 y 59.6% en 32 h), superando a las hemicelulasas después de 12 horas de hidrólisis. La celulasa Cellic CTec2 logró el mayor rendimiento en las diferentes horas de proceso, superando a las celulasas Accellerase 1500, Viscozyme y Cellulose 2XL en un 8; 11 y 15% respectivamente al cabo de 32 horas de hidrólisis (Figura 13). Principalmente, debido a que es la enzima con mayor actividad celulasa (112 FPU/mL) y que a diferencia de las demás, presenta actividades secundarias como hemicelulasa y glucanasa que aumentan la obtención de azúcares reductores (xilosa, glucosa, arabinosa, entre otras) (Anexo A).

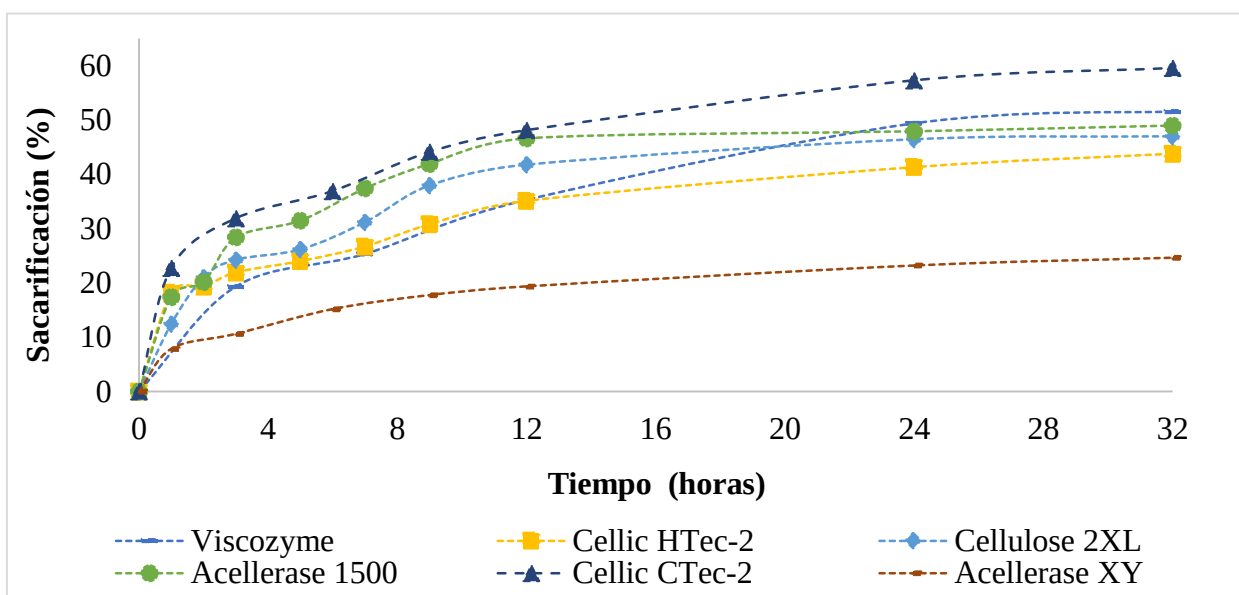


Figura 13. Comportamiento de la sacarificación para la hidrólisis con enzimas (carga cóctel / sustrato (mL/g) de 0.25).

En cuanto a las enzimas empleadas de tipo hemicelulasa, se logró sacarificaciones de 43.8 y 24.6% para las hemicelulosas Cellic HTec2 y Accellerase XY respectivamente a 32 horas. Estos valores son inferiores a los obtenidos por las celulasas, un comportamiento explicado por el alto contenido de celulosa en el sustrato (78%), en el que las enzimas celulasas logran una mayor expresión hidrolítica. La enzima HTec2 logró un mayor rendimiento respecto a la

Accellerase XY, a razón de su mayor valor en actividad secundaria de celulasa, con el que no solo hidrolizó la hemicelulosa, sino probablemente también la celulosa presente.

Con base en lo anterior, se eligió para la búsqueda del cóctel enzimático: (1) La enzima Cellic CTec2, dado que sus porcentajes de sacarificación fueron los mejores durante la hidrólisis. (2) la Cellic HTec2 por ser dentro de las hemicelulasas la que mayor rendimiento generó (una diferencia de 19.2% respecto a la Accellerase XY), y porque de acuerdo a la literatura, esta enzima maximiza la hidrólisis de los residuos lignocelulósicos en cócteles conformados junto a CTec2 (Novozyme, 2010).

4.2. INFLUENCIA DE LA CELULOSA, HEMICELULOSA Y LA PECTINASA EN LA SACARIFICACIÓN

A partir de los resultados obtenidos (Figura 14), se infiere que el efecto sinérgico presente entre las enzimas Cellic CTec2 y HTec2 fue determinante en la hidrólisis dado que el porcentaje de sacarificación se incrementó en aproximadamente 1.4 veces de 12 a 24 h de hidrólisis en los casos donde el cóctel tuvo alta presencia de actividades celulasas y hemicelulasas (Figura B1 de apéndice B).

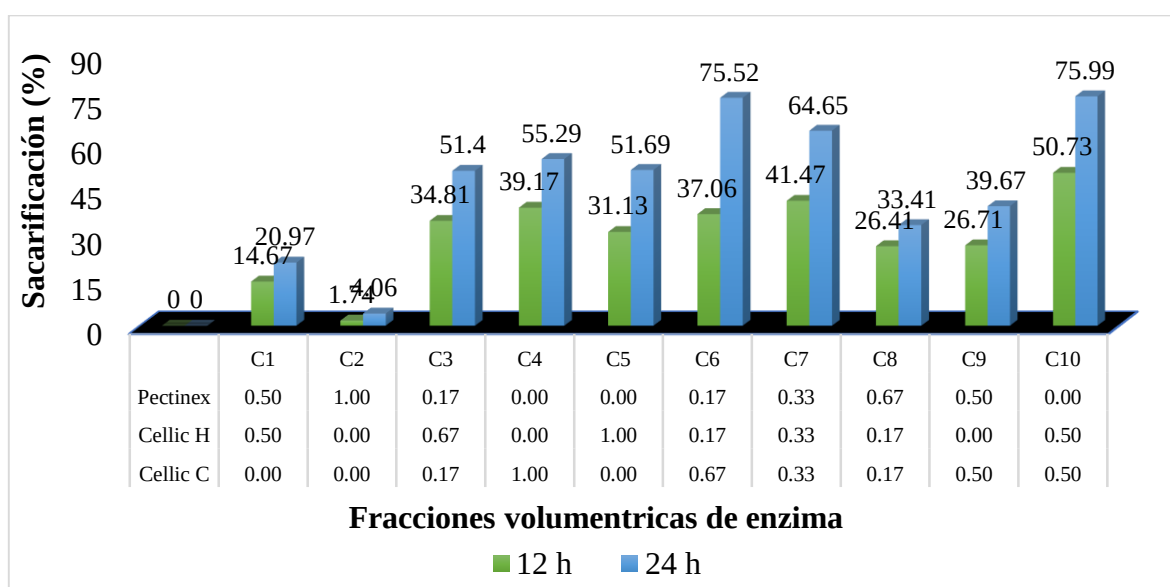


Figura 14. Comportamiento de la sacarificación para la hidrólisis de residuos deslignificados de caña de azúcar con mezclas de enzimas celulasa, hemicelulasa y pectinasa.

El efecto de la presencia de enzimas hemicelulosas en los cócteles, sugiere que la parcial o nula hidrólisis de la hemicelulosa puede restringir la hidrólisis enzimática de los residuos lignocelulósicos. Arantes y Saddler (2010) concluyen que el efecto potenciador de xilanasas es elevado en sustratos lignocelulósicos debido principalmente a la eliminación de residuos de hemicelulosa sobre las fibras de celulosa. De igual manera Qing, Yang & Wyman (2010) exponen que la deficiencia de actividades hemicelulasa puede inducir a la liberación de altas concentraciones de xilo-oligómeros, un gran inhibidor de actividad celulósica.

El cóctel C10 (mezclas 1:1 de CTec2 y HTec2), presentó el mayor porcentaje de sacarificación, de hasta un 76% en 24 horas (Figura 14). Este cóctel superó en aproximadamente un 21% el rendimiento obtenido por el cóctel conformado por solo la enzima Cellic CTec2 (C4) y en un 36% al cóctel de únicamente Cellic HTec2 (C5).

Al ajustar los resultados a un modelo matemático de la forma $A+B+C+AB$ (apéndice B), se observó que cuando se trabajaron con cantidades volumétricas similares de ambas enzimas, se obtuvo sacarificaciones por encima del 68% a 12 h y por encima del 80% en 24 horas (Figura 15).

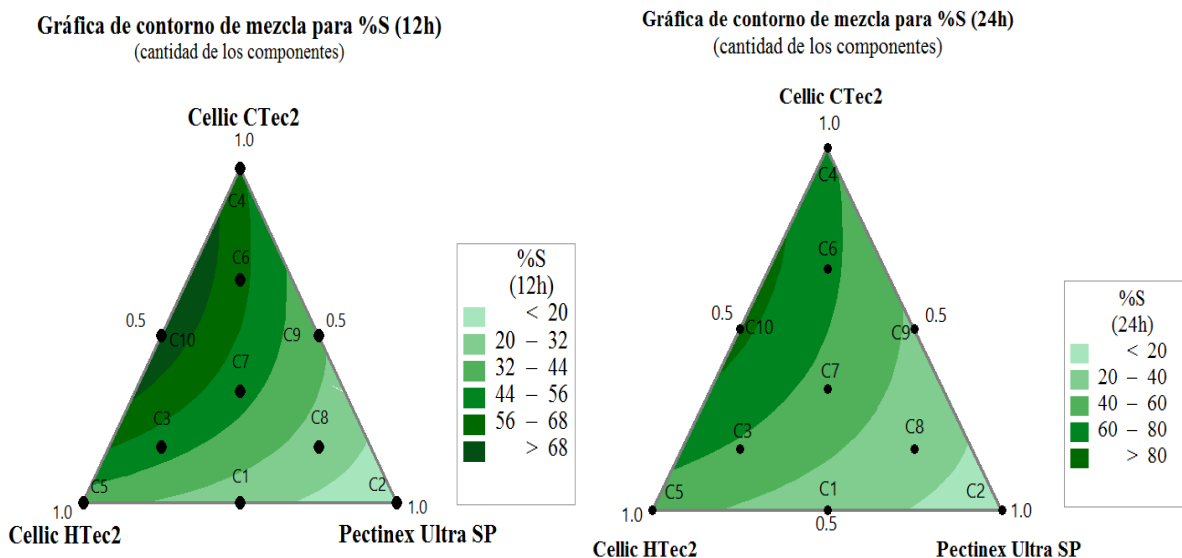


Figura 15. Graficas de contorno de mezcla para porcentaje de sacarificación en 12 y 24 h.

Resultados similares fueron hallados por Pengilly et al, (2015) quienes afirmaron que combinaciones parecidas de enzimas que incluyen diferentes actividades complementarias como celulasa y hemicelulasa, proporcionan una conversión más eficiente a azúcares reductores (aproximadamente un 20% adicional en la hidrólisis de bagazo de caña). Krishnan et al., (2010) lograron con la adición de enzimas hemicelulosicas, un incremento de aproximadamente del 15 % para la conversión de xilosa y de un 10% para la conversión de glucosa, en la hidrólisis enzimática de residuos de cosecha de la caña de azúcar (bagazo y hojas de caña).

Los cocteles con alto contenido de Pectinex Ultra, presentaron los menores porcentajes de sacarificación debido a que la enzima de alta actividad pectolítica ejerce una baja transformación hidrolítica sobre sustratos con bajo porcentaje de pectina como los residuos de la caña de azúcar (alrededor del 8%) (Figura 16).

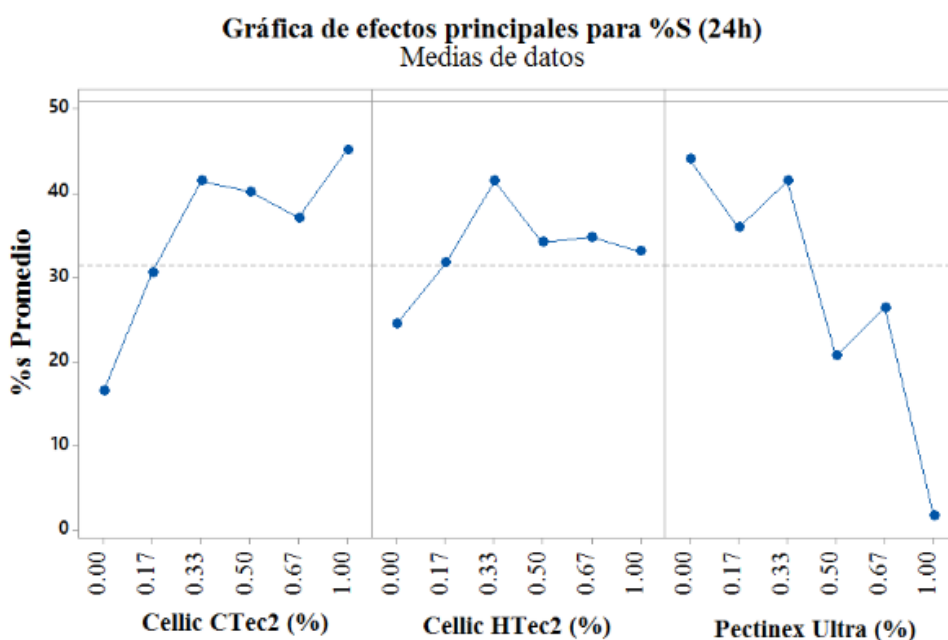


Figura 16. Gráfica de efectos principales para las enzimas Cellic CTec2, Cellic HTec2 y Pectinex Ultra para 24 horas.

No se visualizó un efecto positivo de adicionar pectinasa dado que el porcentaje de sacarificación de la mezcla celulasa-pectinasa fue inferior al obtenido por la enzima con

actividad predominante celulosa pura. Comportamiento similar a la mezcla hemicelulasa-pectinasa y la mezcla celulosa-hemicelulasa-pectinasa, cuyos rendimientos fueron menor a la enzima con actividad predominante hemicelulasa o la mezcla celulosa-hemicelulasa respectivamente. Este efecto sinérgico entre las tres actividades se ve favorecido con sustratos como las hojas de remolacha con contenidos de pectina de alrededor del 15% (Aramrueang et al, 2017).

Debido al anterior análisis se decidió descartar la presencia de la enzima Pectinex Ultra SP (con actividad pectinasa predominante), de la conformación del cóctel en la hidrólisis de los residuos deslignificados de la caña de azúcar (hojas y cogollos).

4.3. INFLUENCIA DE LA RELACIÓN CELULOSA/HEMICELULASA Y LA RELACIÓN CÓCTEL/SUSTRATO

El perfil de actividades enzimáticas caracterizado para los diferentes cócteles establecidos por el diseño experimental (Tabla 10), muestra en detalle las actividades de celulosa total y de hemicelulasa de cada uno de estos.

Tabla 10. Medición celulosa y hemicelulasa de los cócteles enzimáticos.

Relación HTec2/CTec2 v/v	Celulosa total (FPU/mL)	Endo-Xilanasa (U/mL)	Celulosa/hemicelulasa (FPU/U x10⁻²)
CTec2 pura	112.12	1994.30	5.622
0.38	100.30	3319.42	3.022
1.00	85.40	2956.98	2.888
2.50	102.69	5855.62	1.754
4.00	71.59	5692.96	1.258
4.60	45.62	5502.02	0.829
HTec2 pura	9.74	5463.12	0.178

La relación FPU/U fue graficada en función de la relación HTec2/CTec2, de la que se detalló una fuerte relación lineal (R^2 de 0.981) entre estas dos variables (Figura 17).

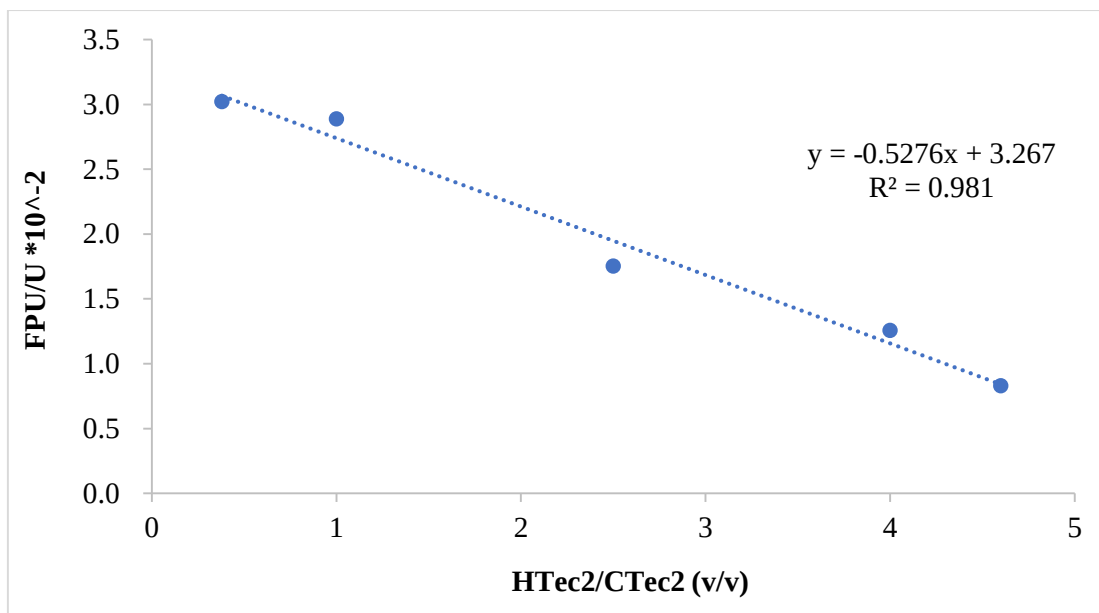


Figura 17. Relación celulasa/hemicelulasa vs Cellic HTec2/Cellic CTec2.

La relación FPU/U presentó una clara colinealidad inversa en relación con los valores de HTec2/CTec2, que permite afirmar la existencia de una equivalencia entre estos factores para los rangos estudiados. Hablar de la incidencia de la relación volumétrica HTec2/CTec2 sobre la sacarificación, es una manera indirecta de determinar la incidencia de la relación Celulasa/Hemicelulasa (FPU/U) sobre el mismo.

Se alcanzaron los mejores porcentajes de sacarificación para tratamientos enzimáticos con relaciones cóctel/sustrato (C/S) superiores a 0.25 mL/g. El tratamiento T10 con una relación C/S de 0.40 mL/g y HTec2/CTec2 de 1:1 v/v, reflejó los mayores resultados en los diferentes tiempos, logrando un rendimiento de hasta un 89.8% en 48 horas de hidrólisis. Los tratamientos T6, T8 y T14 cuyos valores de C/S fueron los más bajos (0.04, 0.10 y 0.10 mL/g, respectivamente), reflejaron los menores rendimientos (Figura 18).

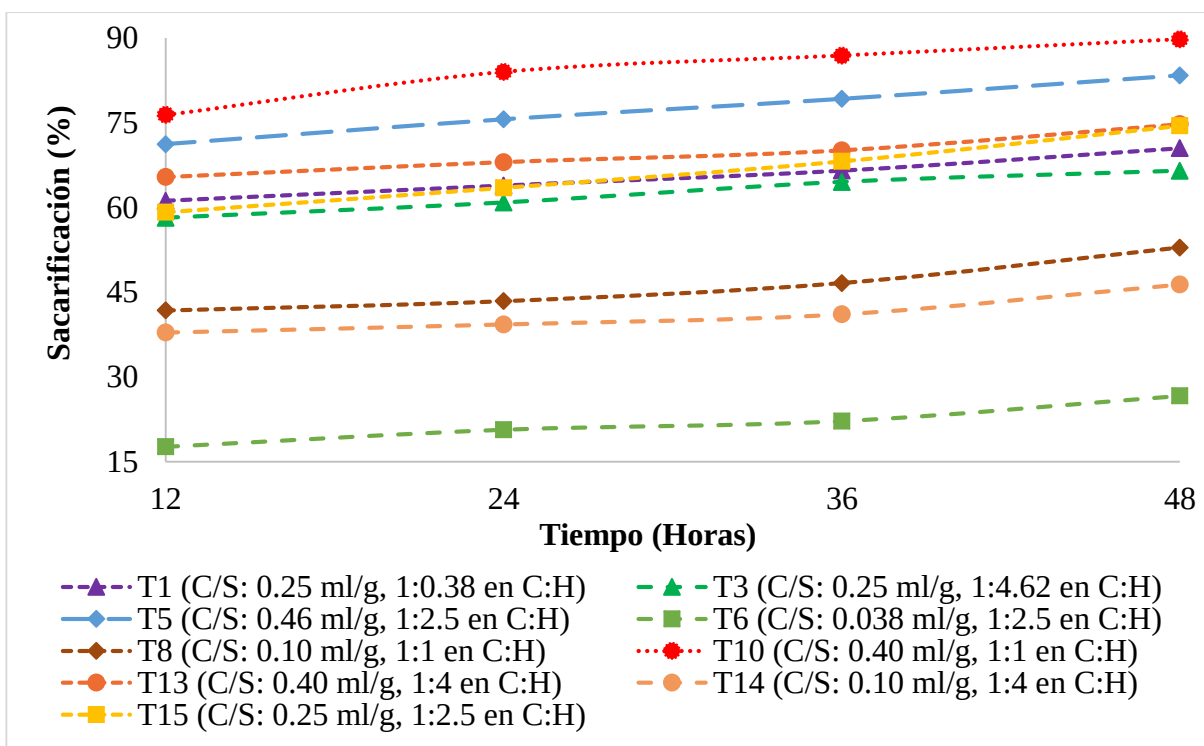


Figura 18. Variación en el tiempo de 12 a 48 h del porcentaje de sacarificación para los tratamientos.

Los tratamientos T5, T6 y T15 con relación enzimática HTec2/CTec2 de 1:2.5 v/v, reflejaron que a mayor relación C/S el porcentaje de sacarificación se ve favorecido bajo las condiciones de operación y rango trabajado. Este comportamiento fue igual para aquellos tratamientos cuyas relaciones de HTec2:CTec2 fueron de 1:4 (T13 y T14) y 1:1 (T8 y T10).

De acuerdo con el tratamiento estadístico desarrollado en el diseño experimental (apéndice C) se observó una fuerte incidencia directa de la relación C/S sobre los porcentajes de sacarificación, que se aprecia en la gráfica de efectos principales (Figura 19). En esta gráfica se muestra una idea independiente y cualitativa de efecto de los dos factores estudiados (C/S y HTec2/CTec2) sobre la respuesta (porcentaje de sacarificación). La gráfica de efectos principales para los porcentajes de sacarificación en 12, 24 y 36 horas, reflejaron tendencias similares respecto a la obtenida a 48 horas (apéndice C).

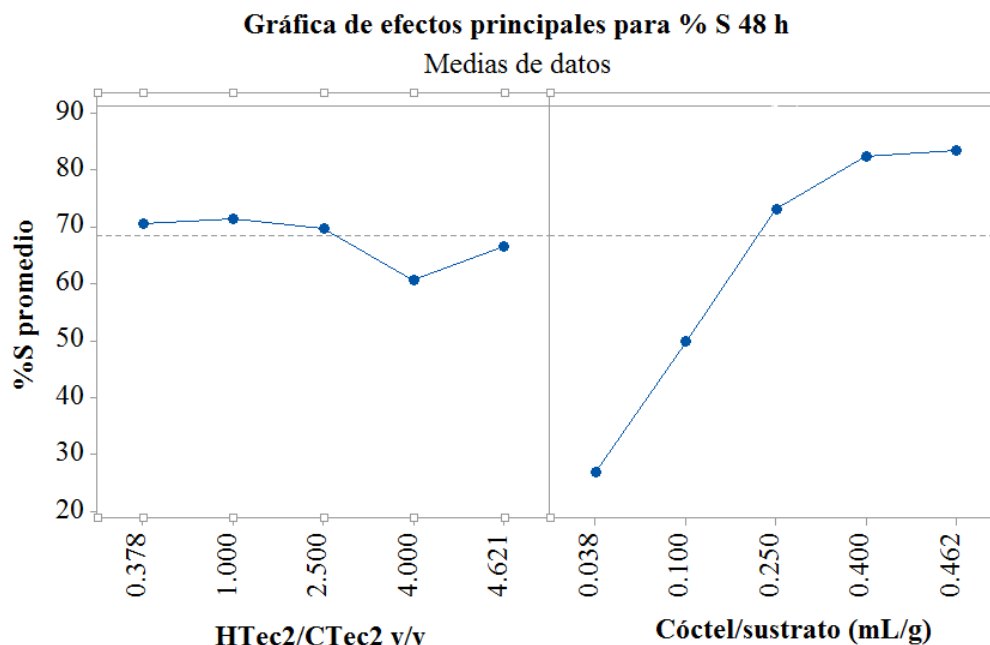


Figura 19.Gráfica de efectos principales para hidrólisis a 48 h.

El incremento en el rendimiento de la hidrólisis a favor de un aumento de la relación C/S, posiblemente se deba a una mayor cantidad de enzimas, que logran convertir de forma más rápida y en mayor grado el sustrato lignocelulósico a azúcares reductores, por efectos de una mayor cantidad de sitios atacados. Este comportamiento es consistente con estudios previos en la hidrólisis de los residuos de caña; Wei, Liu y Yang (2013) y Parra (2015) encontraron incrementos en el rendimiento hidrolítico a azúcares reductores conforme la relación C/S aumentaba de 0.10 a 0.25 mL/g, y de 0.05 hasta 0.30 mL/g respectivamente. Gaviria, Benítez y Lenis (2015) detallan que los aumentos de carga enzimática C/S deben ser justificados por una evaluación en costo/beneficio, por lo que un aumento de la cantidad de enzima a emplear por unidad de sustrato debe ser justificada por los costos implicados y la cantidad de hidrolizados logrados.

De las gráficas de efectos principales (figura 20), se detalló que el rendimiento de sacarificación se maximiza para la hidrólisis con una relación C/S de 0.40 mL/g de sustrato. Dosis mayores incrementa levemente el porcentaje de sacarificación, seguramente debido a que empieza existir una saturación de enzima para la concentración de sustrato trabajado (60 g/L).

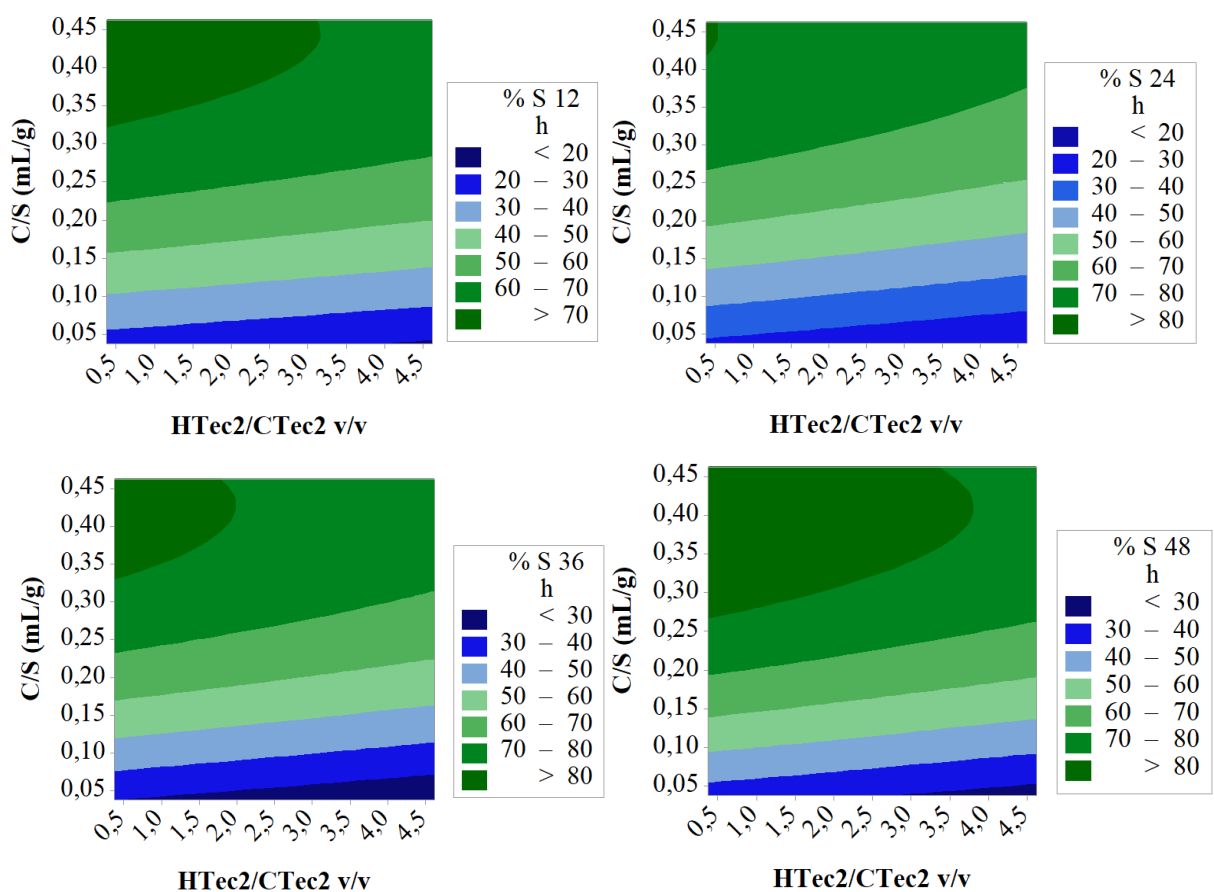


Figura 20. Graficas de contorno para la hidrólisis a 12, 24, 36 y 48 horas.

En cuanto a la relación HTec2/CTec2 (v/v) el grado de impacto de esta variable fue inferior al observado por la relación C/S, además, no se tiene una tendencia marcada sobre el porcentaje de sacarificación. Analizando los gráficos de contorno, en general el porcentaje de sacarificación no varió significativamente para diferentes relaciones celulasas/hemicelulasas a un mismo valor de C/S (Figura 20). En las primeras horas, el porcentaje de sacarificación resultó mayor cuando se trabajó con valores altos de C/S y una baja relación celulasa/hemicelulasa.

Para las 36 y 48 h se tuvo una expresión máxima de la conversión del sustrato lignocelulósico a azúcares reductores donde los valores de HTec2:CTec2 no afectaron significativamente los rendimientos de hidrólisis a una misma relación C/S.

En base a los resultados se concluye que el efecto de la relación FPU/U sobre el porcentaje de sacarificación es significativo para cuando se maneja relaciones en el rango de 3.022 y 2.888 *10⁻² FPU/U y relaciones altas de C/S (0.4 - 0.462 mL/g).

Se elige como el cóctel adecuado para la hidrólisis enzimática de los residuos deslignificados de la caña de azúcar (hojas y cogollos), aquel con una relación volumétrica cercana a 1:1 de Cellic HTec2/ CTec2 (2.88*10⁻² FPU/U). Esto debido a los altos rendimientos alcanzados con éste cóctel (86.9 y 89.8 % para 36 y 48 horas respectivamente a una relación C/S de 0.4 mL/g), y a que el porcentaje de sacarificación no varía significativamente a lo largo de las relaciones volumétricas trabajadas de enzima. Igualmente posee una fracción volumétrica no predominante de celulosa que en términos globales resulta más costosa que las hemicelulasas (Anexos Tabla A2).

El rendimiento alcanzado, ocurrió en tiempos menores que los logrados en diversos estudios realizados en el área del hidrólisis de los residuos de caña; Krishnan et. Al., (2010) obtuvieron porcentajes de conversión de hasta un 90% para hidrólisis de 72 horas, con enzimas tipo celulasas y hemicelulasas.

Se caracterizó el perfil enzimático del cóctel seleccionado (celulasa total, endo-xilanasas, endoglucanasa y exoglucanasa), a cuyo perfil se debe el buen rendimiento hidrolítico (Tabla 11).

Tabla 11. Caracterización de las actividades enzimática del cóctel seleccionado.

Actividad enzimática	Valor
Celulasa total (FPU/mL)	86.05
Endo glucanasa (CMC/mL)	1850.00
Exo glucanasa (UI/ml)	4.43
Endo Xilanasas (U/mL)	2956.98

El perfil enzimático muestra valores en actividades enzimáticas mayores a los reportados por estudios previos como Salcedo (2013), quien identificó un cóctel enzimático con actividades de 27.53 FPU/mL, 1782.1 CMC/mL y 0.377 UI/mL, para un rendimiento en porcentajes de sacarificación de 84% en 48 horas en la hidrólisis de residuos pretratados de caña.

La alta actividad de endoxilanasas aumenta la velocidad de hidrólisis evitando la unión no productiva de la endoglucanasa a la lignocelulosa, así como aumentando el área superficial accesible debido a la eliminación de hemicelulosa cuyas fibras están más expuestas que las celulasas. La segunda actividad predominante medida, fue la endoglucanasa, que ataca regiones de baja cristalinidad en la fibra de celulosa, creando extremos de cadena libres susceptibles a una etapa posterior, como la fermentación de los azúcares reductores. La exoglucanasa degradará adicionalmente el sustrato transformando unidades de celobiosa presentes a azúcares simples (Maeda, Barcelos y Melo, 2013).

4.4. COSTOS GENERALES

Los costos del etanol celulósico producido para el caso en que el precio de las enzimas fue de 0.5 USD/galón de etanol para HTec2 y CTec2, presentaron los mejores escenarios en cuanto a una posible rentabilidad del proceso. El costo del etanol lignocelulósico producido es inferior al valor comercial del etanol (2006 COP/L) logrando posiblemente competir en el mercado, dichos precios se dieron a las mayores concentraciones trabajadas y tiempos de hidrólisis recomendados de 36 y 48h (Figura 21).

Estos resultados están acorde a estudios realizados por Novozyme (2010) quienes visualizan una favorabilidad en la industria del etanol para enzimas con costos asociados menores a 0.5 USD/gal etanol.

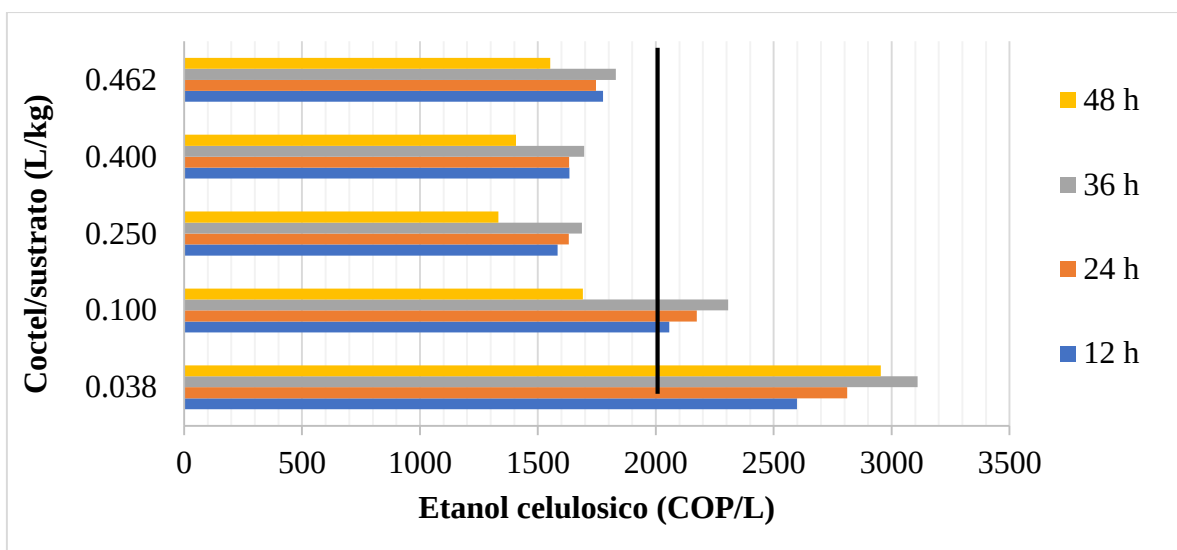


Figura 21. Costo etanol celulósico para cuando HTec2 y CTec2 cuestan 0.5 USD/gal etanol.

Se detalla que, para operaciones de hidrólisis con 48 horas, se cuenta con los mayores rendimientos a azúcares reductores y en consecuencia, las mayores cantidades de etanol lignocelulósico producido, sin embargo, los costos del etanol se incrementan por el gasto energético asociado, pudiendo verse desfavorecido la rentabilidad del proceso. Tal situación se visualiza en los diferentes escenarios estudiados y mencionados en la metodología (tablas E1-E4 en apéndice E), donde en general, a bajas relaciones C/S el costo de etanol celulósico producido se eleva a medida que el tiempo de hidrólisis incrementa de 12-36 h.

4.5. VALIDACIÓN DE RESULTADOS

Se lograron porcentajes de sacarificación relativamente similares para hidrólisis enzimáticas realizadas a diferentes volúmenes de cóctel (25; 50 y 100 mL) (Figura F1 en apéndice F).

Se observó que conforme se aumentó el volumen trabajado, el porcentaje de sacarificación disminuye levemente, tal comportamiento se atribuye al ruido experimental.

Al analizar las desviaciones estándar de los resultados (Tabla 12), se visualizó que las desviaciones estándar fueron inferiores a 8% indicando que los datos no están muy dispersos,

y los porcentajes de sacarificación no varían significativamente para el escalamiento de los volúmenes trabajados.

Los coeficientes de variación indican que los porcentajes de sacarificación obtenidos experimentalmente tienen una estimación precisa (<7%) a las 48h, mayor a la que se presenta a las 36 h (8-14%). Cuanto menor es el coeficiente de variación los resultados obtenidos son más similares entre sí (Suárez, 2013). Por lo tanto, se considera que los resultados son validables y repetitivos bajos las condiciones empleadas cuando se operan tiempos de hidrólisis altos.

Tabla 12. Comportamiento del porcentaje de sacarificación a diferentes escalas de volumen.

Validación	% Sacarificación	
	36 h	48 h
Base (25 mL)	86.93	89.81
x2 (50 mL)	74.89	84.49
x4 (100 mL)	72.35	81.69
Desviación estándar	7.79	4.12
Coefficiente de variación (%)	11	5

Para un intervalo de confianza del 95% (Figura F2 en apéndice F), se tiene que los resultados obtenidos con el cóctel enzimático 1:1 v/v de HTec2:Ctec2 a las condiciones trabajadas, están entre:

- 70.27 – 85.85 % de sacarificación para 36 h de hidrólisis.
- 81.21 – 89.45 % de sacarificación para 48 h de hidrólisis.

Ambos intervalos reflejan que el cóctel seleccionado es bastante aceptable para la hidrólisis enzimática de estos residuos dados sus altos porcentajes de sacarificación en períodos cortos de tiempo (un porcentaje de sacarificación superior al 80%).

4.6. DEFINICIÓN DE PARAMETROS CINÉTICOS CON EL CÓCTEL SELECCIONADO.

La concentración de sustrato es uno de los factores principales que afecta el rendimiento y la tasa inicial de hidrólisis enzimática. Como se infiere de la Figura 22 a medida que se eleva la concentración del sustrato el proceso se satura y la velocidad de hidrólisis tiende a estabilizarse (alcanzando un máximo). Sin embargo, una elevada concentración de sustrato puede provocar inhibición reduciendo sustancialmente la velocidad de la hidrólisis. El grado de inhibición del sustrato puede depender, de la relación entre sustrato total y enzima total (Sun y Cheng, 2002). Experimentalmente, se encontró que la inhibición del sustrato se producía cuando la relación del sustrato/cóctel enzimático fue cercana a 55 g/L.

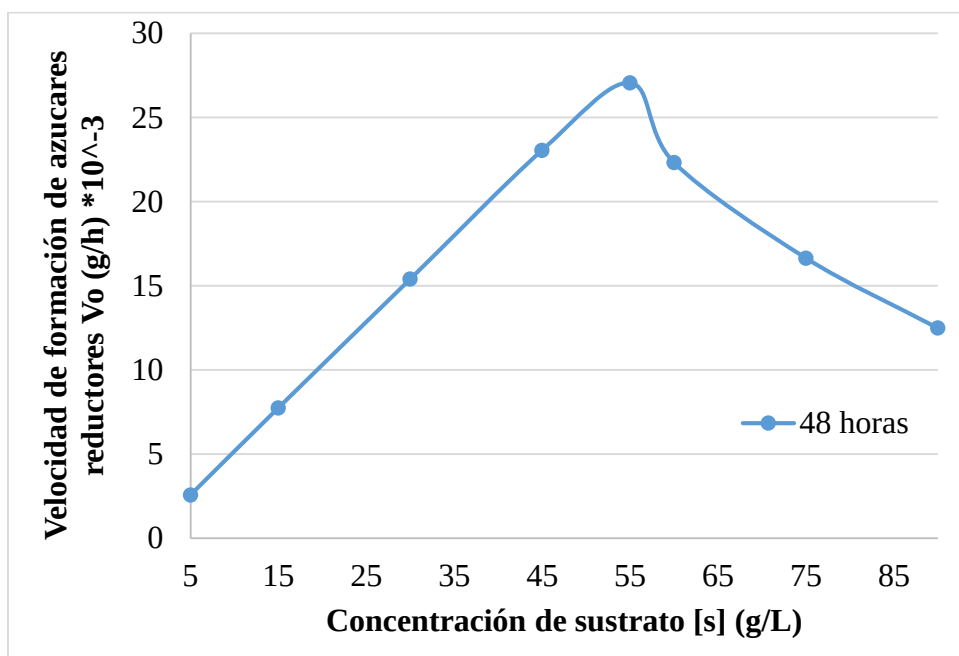


Figura 22. Cinética de formación de azúcares reductores.

A partir del diagrama de Lineweaver-Burk de la anterior figura (ver Apéndice D) se obtuvieron los parámetros cinéticos de la ecuación de Michaelis Menten teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta una concentración de 55 g/L (Tabla 12).

Tabla 13. Parámetros cinéticos de la ecuación de Michaelis Menten (K_m y $V_{m\text{áx}}$).

Dato	Valor
K_m (g/L)	3.9552
$V_{M\text{áx}}$ (g/L)	2.0362

El valor bajo de K_m ($K_m \ll [S]=55$ g/L) (indica que el complejo ES (Enzima-Sustrato) está fuertemente unido y raramente se disocia sin que el sustrato reaccione. La mayor parte de los centros activos del complejo enzima-sustrato están ocupados, principalmente debido a la poca presencia de lignina en el material a hidrolizar que suele actuar como barrera (la lignina actúa como protectora de la pared celular ante ataques químicos).

En el modelo de Michaelis-Menten obtenido en este estudio, la relación de K_m con respecto V_m es baja (1.94), lo que explica que existe una mediana afinidad de la enzima hacia el sustrato, reflejándose en bajas velocidades de hidrólisis. Tal comportamiento es similar al hallado en estudios cinéticos previos, con un sustrato de composición similar al trabajado por Salcedo, (2013), donde el valor de K_m hallado fue de 20.37 g/L y $V_m = 39$ g/L, siendo la relación V_m/K_m de 1.91.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

El cóctel enzimático más adecuado para la hidrólisis de residuos pretratados de la caña de azúcar, correspondió a aquel con un perfil de actividades enzimáticas de 86.05 FPU/mL para celulasa total, 2956.98 U/mL para endoxilanasas, 4.43 UI/mL para exoglucanasa y 1850 CMC/mL para endoglucanasa. Con este cóctel se logró tener porcentajes de sacarificación cercanos al 90%, para una relación cóctel/sustrato de 0.40 mL/g.

La adición de actividad hemicelulósica (Cellic HTec2) mezclado con celulasa (Cellic CTec2) en porcentajes volumétricos iguales, incrementó el porcentaje de sacarificación en alrededor de un 30%. La actividad pectinasa no mejoró los rendimientos hidrolíticos en mezclas con actividades celulasa y/o hemicelulasa.

El incremento de la relación cóctel/sustrato (mL/g) favorece el porcentaje de sacarificación. Mientras que trabajar en un rango de $0.178 - 5.622 \times 10^{-2}$ FPU/U no tuvo un efecto significativo sobre la cantidad de azúcares reductores obtenidos.

Las constantes arrojadas por el modelo cinético de Michaelis Menten: $K_m = 2.036$ g/mL y $V_m = 2.036$ g/h mL, indican que el complejo cóctel enzimático-sustrato (ES), raramente se disocia para que el sustrato reaccione y forme el producto.

Los resultados experimentales tienen buena reproducibilidad a nivel de laboratorio.

A partir de una carga de 55 g de sustrato/L de cóctel enzimático, parece existir una inhibición por sustrato durante la hidrólisis enzimática de los residuos deslignificados de caña de azúcar (hojas y cogollos).

Para un precio de la enzima Cellic CTec2 y HTec2 de 0.5 USD/gal de etanol, existe una posible rentabilidad del proceso de obtención del etanol celulósico.

5.2. RECOMENDACIONES

Caracterizar los hidrolizados, particularmente azúcares como glucosa, celobiosa y xilosa, para evaluar los grados de hidrólisis de los polisacáridos en la producción de azúcares simples.

Realizar un estudio en el que se pueda evaluar cómo afecta las actividades enzimáticas (endoglucanasa, exoglucanasa, endoxilanasa y celulosa total), en el rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Estudiar valores diferentes de algunas variables que en este trabajo se dejaron fijas (temperatura, RPM y pH), con el fin de saber si se puede mejorar la eficiencia hidrolítica del cóctel que se recomienda.

Evaluar el uso de reactores en continuo en base a las constantes cinéticas halladas para disminuir tiempos de operación.

Realizar una prueba piloto para comprobar la efectividad de los resultados a nivel industrial.

REFERENCIAS

- Alibaba. (2018). Precio de citrato de sodio y precio de ácido cítrico. Recuperado de: <https://spanish.alibaba.com/g/sodium-citrate-price.html>
- Arantes, V., & Saddler, J. N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for biofuels*, 3(1), 4.
- Aramrueang, N., Zicari, S. M., & Zhang, R. (2017). Response Surface Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Sugar Beet Leaves into Fermentable Sugars for Bioethanol Production. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 8(02), 51.
- Balsan, G., Astolfi, V., Benazzi, T., Meireles, M. A. A., Maugeri, F., Di Luccio, M., ... & Mazutti, M. A. (2012). Characterization of a commercial cellulase for hydrolysis of agroindustry substrates. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(7), 1229-1237.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2008). *Enzymes: Kinetics*, Lecture 11. Chapter, 8, 216-225.
- Chen, H. (2014). Chemical composition and structure of natural lignocellulose. In *Biotechnology of lignocellulose* (pp. 25-71). Springer Netherlands.
- Chauve, M., Huron, M., Hudebine, D., Decottignies, D., Perez, S., & Ferreira, N. L. (2013). Kinetic modeling of β -glucosidases and cellobiohydrolases involved in enzymatic hydrolysis of cellulose. *Industrial Biotechnology*, 9(6), 345-351.
- Cuervo, L., Folch, J. L., & Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología*, 13(3), 11-25.

Gaviria-acosta, e. d. i. e. r., benítez-benítez, r. i. c. a. r. d. o., lenis, l., & hoyos-concha, j. l. (2015). optimization of enzymatic hydrolysis of proteins present in seeds of guandul (Cajanus cajan). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2), 114-122.

Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, 59(2), 257-268.

Gómez, C. (2010). Caracterización preliminar de los polisacáridos presentes en los residuos de cosecha (Hojas y cogollos) de tres variedades (CC8475, CC8592, V7151) de caña de azúcar (Doctoral dissertation, Tesis para optar título de Msc, Universidad del Valle, Cali, Colombia).

Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., & Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315(5813), 804-807. DOI: 10.1126/science.1137016.

Isikgor, F., & Becer, R. (2015). Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. *Polym. Chem.* (Vol. 6). BOOK. <https://doi.org/10.1039/C5PY00263J>

Jonathan Bautista, (2011). Evaluación de la Actividad Enzimática de Hongos Nativos por Fermentación en Estado Sólido Utilizando Residuos de Cosecha de Caña de Azúcar Delignificados. (Tesis para optar título de ingeniero biotecnológico, Universidad del Francisco de Paula Santander, Cúcuta, Colombia).

Klein-Marcuschamer, D., Oleskowicz-Popiel, P., Simmons, B. A., & Blanch, H. W. (2012). The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and bioengineering*, 109(4), 1083-1087.

Krishnan, C., Sousa, C., Jin, M., Chang, L., Dale, B. & Balan, V. (2010). Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol.

Biotechnology and Bioengineering, 107(3), 441-50. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20521302>

Maeda, R. N., Barcelos, C. A., Santa Anna, L. M. M., & Pereira Jr, N. (2013). Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *Journal of Biotechnology*, 163(1), 38-44.

Mandels, M., Andreotti, R., & Roche, C. (1976, January). Measurement of saccharifying cellulase. In *Biotechnol. Bioeng. Symp.:(United States)* (Vol. 6). Army Natick Development Center, MA.

Manuel, J., Nicolás, L., & Carmona, G. (2015). Los cuatro mosqueteros de la cinética enzimática. *Eubacteria. Cien Años de Avances En Ciencias de La Vida.*, 34(1697–71), 39–43.

Mendoza, J. G. S., Pardo, L. M. F., & Galán, J. E. L. (2011). Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha caña de azúcar. *Dyna*, 78(169), 182.

Merino S.T., Cherry J. (2007) Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization. In: Olsson L. (eds) *Biofuels. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol 108. Springer, Berlin, Heidelberg.

Mussatto, S. I. (Ed). (2016). *Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery*. Elsevier.

Ngiem, N.P., Ellis Jr, C. W., & Montanti, J. (2016). The effects of ethanol on hydrolysis of cellulose and pretreated barley straw by some commercial cellulolytic enzyme products. *AIMS Bioengineering*, 3(4), 441-453.

Novozyme (2010). “New enzyme turn waste into fuel”. Recuperado de; <https://www.novozymes.com/es/news/news-archive/2010/02/45713>

Ortiz, W. G. C. (2014). Tratamientos Aplicables a Materiales Lignocelulósicos para la Obtención de etanol y productos químicos. *Revista de Tecnología*, 13(1), 39-44.

Paz, Á. S. P. (2015). Efecto de enzimas comerciales en la hidrólisis de residuos de cosecha de la caña de azúcar Pretratados con órgano-solvente. Libros Editorial UNIMAR.

Pencilly, C. (2013). Study of enzymatic hydrolysis to improve sugar production from steam-pretreated sweet sorghum bagasse and triticale straw (Doctoral dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University).

Pengilly, C., García-Aparicio, M. P., Diedericks, D., Brienza, M., & Görgens, J. F. (2015). Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated sweet sorghum bagasse by combinations of cellulase and endo-xylanase. *Fuel*, 154, 352-360.

Pirota, R. D., Delabona, P. S., & Farinas, C. S. (2014). Simplification of the biomass to ethanol conversion process by using the whole medium of filamentous fungi cultivated under solid-state fermentation. *BioEnergy Research*, 7(2), 744-752.

Pratto, B., de Souza, R. B. A., Sousa, R., & da Cruz, A. J. G. (2016). Enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane Straw: kinetic study and semi-mechanistic modeling. *Applied biochemistry and biotechnology*, 178(7), 1430-1444.

Qing, Q., Yang, B., & Wyman, C. E. (2010). Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource technology*, 101(24), 9624-9630.

Rubin EM (2008) Genomics of cellulose biofuels. *Nature* 4: 841-845.

Saqib, A. A. N., & Whitney, P. J. (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono-and di-saccharide sugars. *Biomass and bioenergy*, 35(11), 4748-4750.

Salcedo Jairo G., “hidrólisis enzimática de residuos de la cosecha de la caña de azúcar (hojas y cogollos) para la producción de etanol”. Tesis doctoral Universidad del Valle, 2013.

Sanchez, O. J., & Cardona, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technology*, 99(13), 5270-5295.

Segato, F., Damásio, A. R., de Lucas, R. C., Squina, F. M., & Prade, R. A. (2014). Genomics review of holocellulose deconstruction by aspergilli. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(4), 588-613.

Sel., D. (2015). Enhancement of Palm Oil Extraction Using Cell Wall Degrading Enzyme Formulation. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 19(1), 77-87.

Sheet, F. E. A. Cellic CTec2 and HTec2- Enzymes for Hydrolysis of Lignocellulosic Materials. Novozymes A/S, Luna, (2010-01668), 01.

Suarez, C. A. G., Cavalcanti-Montañó, I. D., da Costa Marques, R. G., Furlan, F. F., e Aquino, P. L. D. M., de Campos Giordano, R., & de Sousa, R. (2014). Modeling the kinetics of complex systems: enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173(5), 1083-1096.

Suárez Ibijes, M.O., & Tapia Zambrano, F.A. (2013). Interaprendizaje de estadística básica.

Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1-11.

Toro José y Ramírez Nathalia., “Pretratamientos de residuos de cosecha de la caña de azúcar con etanol e hidróxido de sodio como catalizador y posterior hidrólisis de sus polisacáridos”. Tesis de grado, Universidad del Valle, 2015.

Velásquez Yenny. “prefactibilidad económica para una planta de obtención de etanol a partir de residuos de cosecha (hojas y cogollos) de la caña de azúcar”. Tesis de maestría, Universidad del Valle, 2015.

Wallace, J. (2013). Enzymatic hydrolysis of steam pretreated bagasse: enzyme preparations for efficient cellulose conversion and evaluation of physiochemical changes during hydrolysis (Doctoral dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University).

Yu, H., Zhang, Z., Li, Z., & Chen, D. (2014). Characteristics of tar formation during cellulose, hemicellulose and lignin gasification. *Fuel*, 118, 250-256.

Zambrano Fabian. “Pretratamientos de residuos de la cosecha de la caña de azúcar para la producción de etanol”. Tesis doctoral, Universidad del Valle, 2015.

Zinchenko, G. (2012). Optimization of enzymatic hydrolysis of fiber sludge from pulp mill.

.

APÉNDICES

Apéndice A. Ensayos preliminares.

Tabla A1. Porcentajes de sacarificación obtenidos en la hidrólisis con las diferentes enzimas utilizadas (sin mezclas realizadas), 0.20 ml coctel/g sustrato.

Enzima	% Sacarificación							
	3 h	7 h	12 h	20 h	23 h	27 h	32 h	
Pectinex Ultra SP	19.34	25.34	35.30	46.94	48.55	49.89	51.57	
Viscozyme	2.67	3.68	7.23	11.34	13.46	14.32	14.08	
	1 h	2 h	3 h	5 h	7 h	9 h	12 h	32 h
Cellic HTec2	18.23	19.34	21.95	24.03	26.73	30.81	35.13	43.81
Cellulose 2XL	12.45	21.02	24.26	26.17	31.19	37.96	41.78	44.99
	1 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	32 h	
Cellic CTec2	22.77	31.89	36.92	44.12	48.12	57.29	59.56	22.77
Accellerase XY	7.87	10.63	15.19	17.77	19.37	23.21	24.65	7.87

Apéndice B. Diseño Experimental para evaluar el efecto de la actividad pectinasa sobre la sinergia existente entre celulasas y hemicelulasas.

Se presenta en la tabla B1 las fracciones volumétricas de los diferentes cócteles establecidos según el diseño experimental.

Tabla B1. Fracciones volumétricas de los cócteles enzimáticos.

Cóctel	Cellic CTec2 (%)	Cellic HTec2 (%)	Pectinex Ultra SP (%)
C1	0.0	0.5	0.5
C2	0.0	0.0	1.0
C3	0.2	0.6	0.2
C4	1.0	0.0	0.0
C5	0.0	1.0	0.0
C6	0.6	0.2	0.2
C7	0.3	0.3	0.3
C8	0.2	0.2	0.6
C9	0.5	0.0	0.5
C10	0.5	0.5	0.0

Se presenta en la tabla B2 los porcentajes de sacarificación obtenidos para 12 y 24 horas para cada uno de los cócteles establecidos por el diseño experimental.

Tabla B2. Porcentajes de sacarificación obtenidos en la hidrólisis con los cocteles establecidos según el diseño experimental 1.

Fracción volumétrica (0 - 1)			Cóctel	% Sacarificación	
Cellic C	Cellic H	Pectinex		12 h	24 h
0.00	0.50	0.50	C1	14.67	20.97
0.00	0.00	1.00	C2	1.74	4.06
0.17	0.67	0.17	C3	34.81	51.4
1.00	0.00	0.00	C4	39.17	55.29
0.00	1.00	0.00	C5	31.13	51.69
0.67	0.17	0.17	C6	37.06	75.52
0.33	0.33	0.33	C7	41.47	64.65
0.17	0.17	0.67	C8	26.41	33.41
0.50	0.00	0.50	C9	26.71	39.67
0.50	0.50	0.00	C10	50.73	75.99

Los porcentajes obtenidos de sacarificación a 12 y 24 horas se analizaron a partir de un análisis de regresión con un modelo cubico especial. El modelo cubico especial de tipo A+B+C+AB (A= Cellic CTec2, B= Cellic HTec2 y C= Pectinex Ultra), fue el mejor modelo ajustado para los diferentes porcentajes de sacarificación.

- Modelo Cúbico Especial de la forma A+B+C+AB+AC+BC+ABC

Los datos del diseño experimental se ajustaron a un modelo de la forma: A+B+AB+AC+BC+ABC, utilizando la herramienta estadística Minitab 17. El ajuste realizado arrojó los siguientes resultados para la regresión a 12 y 24 horas:

Regresión para mezclas: %S (12h) vs. Cellic CTec2; Cellic HTec2; ...

Coefficientes de regresión estimados para %S (12h) (proporciones del componente)

Término	Coef	EE del coef.	T	P	FIV
Cellic CTec2	57.40	5.998	*	*	1.973
Cellic HTec2	49.24	5.998	*	*	1.973
Pectinex Ultra SP	4.34	5.998	*	*	1.973
Cellic CTec2*Cellic HTec2	89.32	30.191	2.96	0.060	2.375
Cellic CTec2*Pectinex Ultra SP	44.75	30.191	1.48	0.235	2.375
Cellic HTec2*Pectinex Ultra SP	-31.95	30.191	-1.06	0.368	2.375
Cellic CTec2*Cellic HTec2* Pectinex Ultra SP	435.43	199.038	2.19	0.117	2.471

S = 6.20429 PRESS = 4257.49
R-cuad. = 97.61% R-cuad. (pred.) = 11.94% R-cuad. (ajustado) = 92.83%

Análisis de varianza para %S (12h) (proporciones del componente)

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Regresión	6	4719.05	4719.05	786.509	20.43	0.016
Lineal	2	3594.96	1795.84	897.918	23.33	0.015
Cuadrático	3	939.86	492.66	164.221	4.27	0.132
Cellic C*Cellic H	1	678.65	336.91	336.910	8.75	0.060
Cellic C*Pectinex	1	259.91	84.57	84.567	2.20	0.235
Cellic H*Pectinex	1	1.30	43.12	43.117	1.12	0.368
Cúbico especial	1	184.22	184.22	184.225	4.79	0.117
Cellic C*Cellic H*Pectinex	1	184.22	184.22	184.225	4.79	0.117
Error residual	3	115.48	115.48	38.493		
Total	9	4834.53				

Figura A1. Reporte regresión para 12 h con modelo de la forma A+B+C+AB+AC+BC+ABC.

Regresión para mezclas: %S (24h) vs. Cellic CTec2; Cellic HTec2; ...

Coefficientes de regresión estimados para %S (24h) (proporciones del componente)

Término	Coef	EE del coef.	T	P	FIV
Cellic CTec2	37.312	5.282	*	*	1.973
Cellic HTec2	30.484	5.282	*	*	1.973
Pectinex Ultra SP	3.658	5.282	*	*	1.973
Cellic CTec2*Cellic HTec2	57.312	26.587	2.16	0.120	2.375
Cellic CTec2*Pectinex Ultra SP	25.141	26.587	0.95	0.414	2.375
Cellic HTec2*Pectinex Ultra SP	-4.515	26.587	-0.17	0.876	2.375
Cellic CTec2*Cellic HTec2* Pectinex Ultra SP	195.364	175.282	1.11	0.346	2.471

S = 5.46378 PRESS = 3141.78
R-cuad. = 94.96% R-cuad. (pred.) = 0.00% R-cuad. (ajustado) = 84.87%

Análisis de varianza para %S (24h) (proporciones del componente)

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Regresión	6	1685.91	1685.908	280.985	9.41	0.047
Lineal	2	1334.39	696.225	348.113	11.66	0.038
Cuadrático	3	314.43	161.132	53.711	1.80	0.321
Cellic C*Cellic H	1	241.68	138.716	138.716	4.65	0.120
Cellic C*Pectinex	1	69.87	26.694	26.694	0.89	0.414
Cellic H*Pectinex	1	2.88	0.861	0.861	0.03	0.876
Cúbico especial	1	37.08	37.085	37.085	1.24	0.346
Cellic C*Cellic H*Pectinex	1	37.08	37.085	37.085	1.24	0.346
Error residual	3	89.56	89.559	29.853		
Total	9	1775.47				

Figura A2. Reporte regresión para 24 h con modelo de la forma A+B+C+AB+AC+BC+ABC.

Se detalla en el análisis de varianza (figura A1 y A2) que el valor p son en su mayoría mayores a 0.05 para los factores del modelo, lo que implica que el coeficiente no influye en la variable de respuesta o que el termino no es significativamente estadístico, por lo que se deciden modificar el modelo matemático de regresión por uno del tipo A+B+C+AB.

- Reajuste a un modelo A+B+C+AB

Los porcentajes de sacarificación fueron ajustados a un modelo de la forma: A+B+C+AB. El ajuste realizado arrojo los siguientes resultados para la regresión a 12 y 24 horas:

Regresión para mezclas: %S (12h) vs. Cellic CTec2; Cellic HTec2; ...

Coefficientes de regresión estimados para %S (12h) (proporciones del componente)

Término	Coef	EE del coef.	T	P	FIV
Cellic CTec2	63.635	8.288	*	*	1.551
Cellic HTec2	46.961	8.288	*	*	1.551
Pectinex Ultra SP	9.970	7.156	*	*	1.156
Cellic CTec2*Cellic HTec2	115.791	42.976	2.69	0.036	1.982

S = 9.66882 PRESS = 2671.21
R-cuad. = 88.40% R-cuad. (pred.) = 44.75% R-cuad. (ajustado) = 82.60%

Análisis de varianza para %S (12h) (proporciones del componente)

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Regresión	3	4273.62	4273.62	1424.539	15.24	0.003
Lineal	2	3594.96	1860.24	930.118	9.95	0.012
Cuadrático	1	678.65	678.65	678.652	7.26	0.036
Cellic C*Cellic H	1	678.65	678.65	678.652	7.26	0.036
Error residual	6	560.92	560.92	93.486		
Total	9	4834.53				

Figura A3. Reporte regresión para 12 h con modelo de la forma A+B+C+AB.

Regresión para mezclas: %S (24h) vs. Cellic CTec2; Cellic HTec2; ...

Coefficientes de regresión estimados para %S (24h) (proporciones del componente)

Término	Coef	EE del coef.	T	P	FIV
Cellic CTec2	40.490	4.941	*	*	1.551
Cellic HTec2	30.367	4.941	*	*	1.551
Pectinex Ultra SP	7.645	4.267	*	*	1.156
Cellic CTec2*Cellic HTec2	69.099	25.623	2.70	0.036	1.982

S = 5.76478 PRESS = 485.383
R-cuad. = 88.77% R-cuad. (pred.) = 72.66% R-cuad. (ajustado) = 83.15%

Análisis de varianza para %S (24h) (proporciones del componente)

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Regresión	3	1576.07	1576.071	525.357	15.81	0.003
Lineal	2	1334.39	697.450	348.725	10.49	0.011
Cuadrático	1	241.68	241.679	241.679	7.27	0.036
Cellic C*Cellic H	1	241.68	241.679	241.679	7.27	0.036
Error residual	6	199.40	199.396	33.233		
Total	9	1775.47				

Figura A4. Reporte regresión para 24 h con modelo de la forma A+B+C+AB.

Se observa de las figuras A3 y A4, que, en el análisis de varianza a las distintas horas, los factores son significativos al 95% (valor $p < 0.05$), por lo que el modelo de tipo A+B+C+AB representa los datos obtenidos.

Los modelos definitivos son, por tanto:

Modelo de regresión ajustados para 12 horas, con R^2 de 89.48% y R^2 Ajust: 74.69%:

$$\%S (12 h) = 57.78 * \text{Cellic CTec2 (mL)} + 37.11 * \text{Cellic HTec2 (mL)} + 11.39 \\ * \text{Pecnitex Ultra (mL)} + 115.21 * (\text{Cellic CTec2} * \text{Cellic HTec2})$$

Modelo de regresión ajustados para 24 horas, con R^2 de 90.66% y R^2 Ajust: 81.04%:

$$\%S (24 h) = 44.78 * \text{Cellic CTec2 (mL)} + 31.99 * \text{Cellic HTec2 (mL)} + 6.21 \\ * \text{Pecnitex Ultra (mL)} + 62.59 * (\text{Cellic CTec2} * \text{Cellic HTec2})$$

Apéndice C. Diseño experimental para definir la influencia de la relación Cóctel/ Sustrato y de la relación celulasa/hemicelulasa sobre el porcentaje de sacarificación.

Se presenta en la tabla C1 las condiciones de operación dadas por el diseño experimental.

Tabla C1. Diseño experimental para el modelo de metodología de superficie de respuesta.

No. Tratamiento	HTec2/CTec2 v/v	Cóctel/sustrato (ml/g)
T1	0.38 (-1.0)	0.250 (0.0)
R2	2.50 (0.0)	0.250 (0.0)
T3	4.62 (+1.0)	0.250 (0.0)
R4	2.50 (0.0)	0.250 (0.0)
T5	2.50 (0.0)	0.462 (+1.0)
T6	2.50 (0.0)	0.038 (-1.0)
R7	2.50 (0.0)	0.250 (0.0)
T8	1.00 (-0.7)	0.100 (-0.7)
R9	2.50 (0.0)	0.250 (0.0)
T10	1.00 (-0.7)	0.400 (+0.7)
R11	2.50 (0.0)	0.250 (0.0)
R12	2.50 (0.0)	0.250 (0.0)
T13	4.00 (+0.7)	0.400 (+0.7)
T14	4.00 (+0.7)	0.100 (-0.7)
T15*	2.50	0.250

*T15 representa el promedio de T2, T4, T7, T9, T11 y T12 - (En paréntesis los valores normalizados).

Se presenta en la tabla C2 los porcentajes de sacarificación obtenidos para 12 y 24 horas para cada uno de los cócteles establecidos por el diseño experimental.

Tabla C2. Porcentajes de sacarificación obtenidos en la hidrólisis con los cocteles establecidos según el diseño experimental 2.

Tratamiento	Coctel/sustrato (g/mL)	HTec2/CTec2 v/v	Porcentaje de Sacarificación			
			12 h	24 h	36 h	48 h
T1	0.250	0.379	61.21	63.91	66.55	70.52
T2	0.250	2.500	59.54	62.81	67.95	73.73
T3	0.250	4.621	58.21	60.91	64.55	66.52
T4	0.250	2.500	57.97	60.49	69.44	79.25
T5	0.462	2.500	71.24	75.63	79.25	83.41
T6	0.038	2.500	17.66	20.68	22.21	26.67
T7	0.250	2.500	59.94	63.18	66.33	71.46
T8	0.100	1.000	44.80	46.45	49.65	52.93
T9	0.250	2.500	57.14	64.51	67.9	73.06
T10	0.400	1.000	76.42	84.04	86.93	89.81
T11	0.250	2.500	61.30	64.24	67.52	76.88
T12	0.250	2.500	59.29	65.88	69.99	72.48
T13	0.400	4.000	65.43	68.07	70.15	74.76
T14	0.100	4.000	37.88	39.32	41.11	46.38
T15	0,250	2.500	59.20	63.52	68.19	74.48

*T15 representa el promedio de T2, T4, T7, T9, T11 y T12

Los porcentajes obtenidos de sacarificación a 12, 24, 36, 48 horas, se ajustaron a un modelo cuadrático completo de la forma: $A+B+AB+A^2+B^2$, utilizando la herramienta estadística Minitab 17. El ajuste realizado arrojó los siguientes resultados para la regresión a 12 y 24 horas:

Regresión de superficie de respuesta: % S 12 h vs. ... c2 v/v; C/S (mL/g)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	2772,18	554,44	63,36	0,000
Lineal	2	2424,41	1212,20	138,52	0,000
HTec2/CTec2 v/v	1	45,85	45,85	5,24	0,051
C/S (mL/g)	1	2378,55	2378,55	271,81	0,000
Cuadrado	2	335,28	167,64	19,16	0,001
HTec2/CTec2 v/v*HTec2/CTec2 v/v	1	8,65	8,65	0,99	0,349
C/S (mL/g)*C/S (mL/g)	1	316,60	316,60	36,18	0,000
Interacción de 2 factores	1	12,50	12,50	1,43	0,266
HTec2/CTec2 v/v*C/S (mL/g)	1	12,50	12,50	1,43	0,266
Error	8	70,01	8,75		
Falta de ajuste	4	59,18	14,80	5,47	0,064
Error puro	4	10,82	2,71		
Total	13	2842,19			

Figura C1. Regresión para 12 h con modelo de la forma $A+B+AB+A^2+B^2$

Regresión de superficie de respuesta: % S 24 h vs. ... 2 v/v; C/S (mL/g)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	3160,94	632,19	62,68	0,000
Lineal	2	2777,07	1388,54	137,66	0,000
HTec2/CTec2 v/v	1	74,07	74,07	7,34	0,027
C/S (mL/g)	1	2703,00	2703,00	267,98	0,000
Cuadrado	2	348,82	174,41	17,29	0,001
HTec2/CTec2 v/v*HTec2/CTec2 v/v	1	0,69	0,69	0,07	0,801
C/S (mL/g)*C/S (mL/g)	1	343,71	343,71	34,08	0,000
Interacción de 2 factores	1	35,05	35,05	3,47	0,099
HTec2/CTec2 v/v*C/S (mL/g)	1	35,05	35,05	3,47	0,099
Error	8	80,69	10,09		
Falta de ajuste	4	74,89	18,72	12,92	0,015
Error puro	4	5,80	1,45		
Total	13	3241,64			

Figura C2. Regresión para 24 h con modelo de la forma $A+B+AB+A^2+B^2$

Regresión de superficie de respuesta: % S 36 h vs. ... 2 v/v; C/S (mL/g)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	3390,77	678,15	59,43	0,000
Lineal	2	2891,06	1445,53	126,68	0,000
HTec2/CTec2 v/v	1	79,06	79,06	6,93	0,030
C/S (mL/g)	1	2812,00	2812,00	246,43	0,000
Cuadrado	2	468,12	234,06	20,51	0,001
HTec2/CTec2 v/v*HTec2/CTec2 v/v	1	2,25	2,25	0,20	0,669
C/S (mL/g)*C/S (mL/g)	1	468,10	468,10	41,02	0,000
Interacción de 2 factores	1	31,58	31,58	2,77	0,135
HTec2/CTec2 v/v*C/S (mL/g)	1	31,58	31,58	2,77	0,135
Error	8	91,29	11,41		
Falta de ajuste	4	82,91	20,73	9,90	0,024
Error puro	4	8,38	2,09		
Total	13	3482,05			

Figura C3. Regresión para 36 h con modelo de la forma $A+B+AB+A^2+B^2$

Regresión de superficie de respuesta: % S 48 h vs. ... 2 v/v; C/S (mL/g)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	3324,37	664,87	38,22	0,000
Lineal	2	2739,24	1369,62	78,74	0,000
HTec2/CTec2 v/v	1	92,87	92,87	5,34	0,050
C/S (mL/g)	1	2646,37	2646,37	152,14	0,000
Cuadrado	2	567,07	283,53	16,30	0,002
HTec2/CTec2 v/v*HTec2/CTec2 v/v	1	27,53	27,53	1,58	0,244
C/S (mL/g)*C/S (mL/g)	1	555,20	555,20	31,92	0,000
Interacción de 2 factores	1	18,06	18,06	1,04	0,338
HTec2/CTec2 v/v*C/S (mL/g)	1	18,06	18,06	1,04	0,338
Error	8	139,16	17,39		
Falta de ajuste	4	95,62	23,91	2,20	0,232
Error puro	4	43,53	10,88		
Total	13	3463,52			

Figura C4. Regresión para 48 h con modelo de la forma $A+B+AB+A^2+B^2$

Se detalla en el análisis de varianza (figura A1 y A2) que los valores de P son en su mayoría mayores a 0.05 para los factores del modelo, lo que implica que el coeficiente no influye en la variable de respuesta o que el termino no es significativamente estadístico, por lo que se deciden modificar el modelo matemático de regresión por uno del tipo $A+B+B^2$.

Se analizaron usando un análisis de regresión múltiple para un modelo cuadrático completo. El modelo cuadrático modificado $A+B+B^2$ se encontró como el mejor modelo ajustado para los diferentes porcentajes de sacarificación, en las siguientes figuras se muestra el análisis de varianza a las distintas horas.

Regresión de superficie de respuesta: % S 12 h vs. ... c2 v/v; C/S (mL/g)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	2751,04	917,01	100,60	0,000
Lineal	2	2424,41	1212,20	132,99	0,000
HTec2/CTec2 v/v	1	45,85	45,85	5,03	0,049
C/S (mL/g)	1	2378,55	2378,55	260,94	0,000
Cuadrado	1	326,63	326,63	35,83	0,000
C/S (mL/g)*C/S (mL/g)	1	326,63	326,63	35,83	0,000
Error	10	91,15	9,12		
Falta de ajuste	6	80,33	13,39	4,95	0,072
Error puro	4	10,82	2,71		
Total	13	2842,19			

Figura C5. Regresión para 12 h con modelo de la forma $A+B+B^2$.

Regresión de superficie de respuesta: % S 24 h vs. ... 2 v/v; C/S (mL/g)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	3125,21	1041,74	89,48	0,000
Lineal	2	2777,07	1388,54	119,26	0,000
HTec2/CTec2 v/v	1	74,07	74,07	6,36	0,030
C/S (mL/g)	1	2703,00	2703,00	232,16	0,000
Cuadrado	1	348,14	348,14	29,90	0,000
C/S (mL/g)*C/S (mL/g)	1	348,14	348,14	29,90	0,000
Error	10	116,43	11,64		
Falta de ajuste	6	110,63	18,44	12,72	0,014
Error puro	4	5,80	1,45		
Total	13	3241,64			

Figura C6. Regresión para 24 h con modelo de la forma $A+B+B^2$.

Regresión de superficie de respuesta: % S 36 h vs. ... 2 v/v; C/S (mL/g)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	3356,94	1118,98	89,43	0,000
Lineal	2	2891,06	1445,53	115,53	0,000
HTec2/CTec2 v/v	1	79,06	79,06	6,32	0,031
C/S (mL/g)	1	2812,00	2812,00	224,75	0,000
Cuadrado	1	465,88	465,88	37,24	0,000
C/S (mL/g)*C/S (mL/g)	1	465,88	465,88	37,24	0,000
Error	10	125,12	12,51		
Falta de ajuste	6	116,74	19,46	9,29	0,025
Error puro	4	8,38	2,09		
Total	13	3482,05			

Figura C7. Regresión para 36 h con modelo de la forma $A+B+B^2$.

Regresión de superficie de respuesta: % S 48 h vs. ... 2 v/v; C/S (mL/g)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	3278,77	1092,92	59,16	0,000
Lineal	2	2739,24	1369,62	74,13	0,000
HTec2/CTec2 v/v	1	92,87	92,87	5,03	0,049
C/S (mL/g)	1	2646,37	2646,37	143,24	0,000
Cuadrado	1	539,54	539,54	29,20	0,000
C/S (mL/g)*C/S (mL/g)	1	539,54	539,54	29,20	0,000
Error	10	184,75	18,47		
Falta de ajuste	6	141,22	23,54	2,16	0,238
Error puro	4	43,53	10,88		
Total	13	3463,52			

Figura C8. Regresión para 48 h con modelo de la forma $A+B+B^2$.

Se observa de las figuras C5, C6, C7 y C8, que, en el análisis de varianza a las distintas horas, los factores son significativos al 95% (valor $P < 0.05$), por lo que el modelo de tipo $A+B+B^2$ es estadísticamente significativo.

Los modelos definitivos son, por tanto:

Modelo de regresión ajustados para 12 horas, con R^2 de 96.79% y R^2 Ajust: 95.83%:

$$\%S (12 h) = 16.70 - 1.596 * \frac{HTec2}{CTec2} + 262.3 * \frac{C}{S} - 294.7 * \left(\frac{C}{S}\right)^2$$

Modelo de regresión ajustados para 24 horas, con R^2 de 96.41% y R^2 Ajust: 95.33%:

$$\%S (24 h) = 19.13 - 2.029 * \frac{HTec2}{CTec2} + 274.7 * \frac{C}{S} - 304.3 * \left(\frac{C}{S}\right)^2$$

Modelo de regresión ajustados para 36 horas, con R^2 de 96.41% y R^2 Ajust: 95.33%:

$$\%S (24 h) = 19.84 - 2.096 * \frac{HTec2}{CTec2} + 301.0 * \frac{C}{S} - 352.0 * \left(\frac{C}{S}\right)^2$$

Modelo de regresión ajustados para 48 horas, con R^2 de 96.67% y R^2 Ajust: 93.07%:

$$\%S (24 h) = 24.98 - 2.27 * \frac{HTec2}{CTec2} + 310.6 * \frac{C}{S} - 378.8 * \left(\frac{C}{S}\right)^2$$

Se presenta a continuación las gráficas de efectos principales obtenidas por el modelo seleccionado.

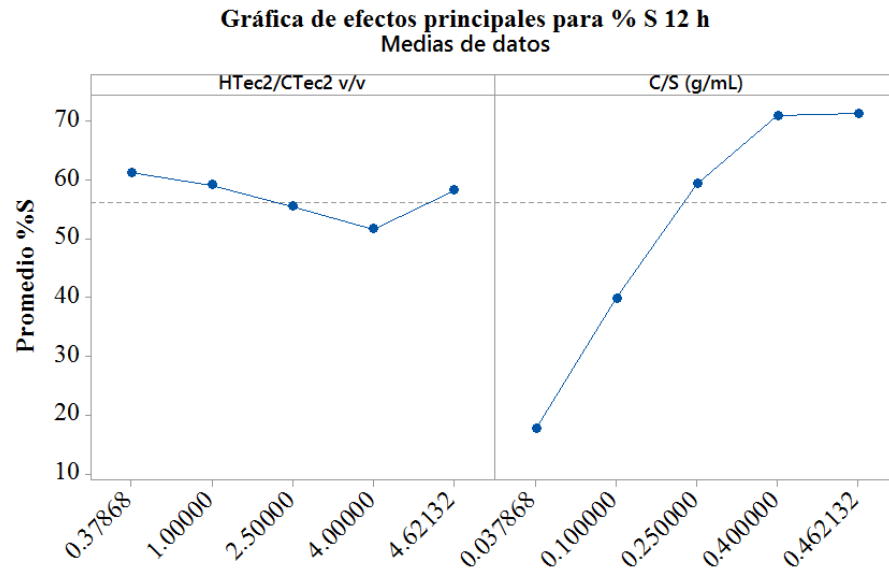


Figura C9. Grafica de efectos principales para % S a 12 horas.

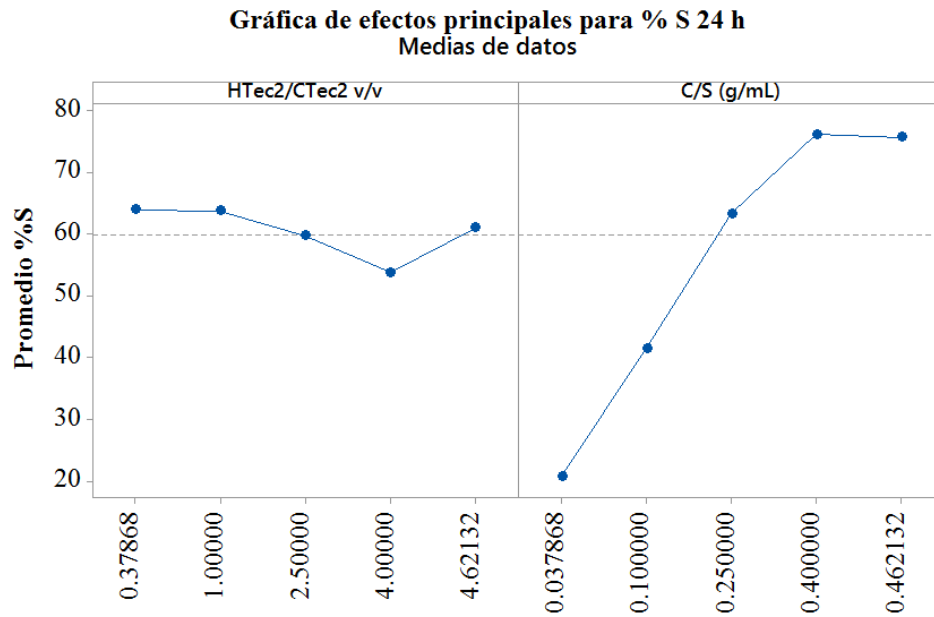


Figura C10. Grafica de efectos principales para % S a 24 horas.

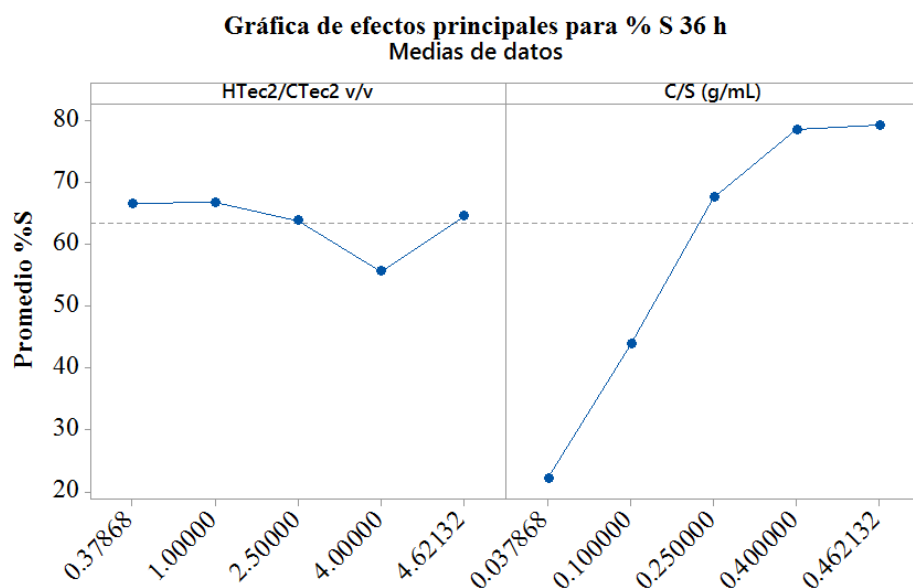


Figura C11. Grafica de efectos principales para % S a 36 horas.

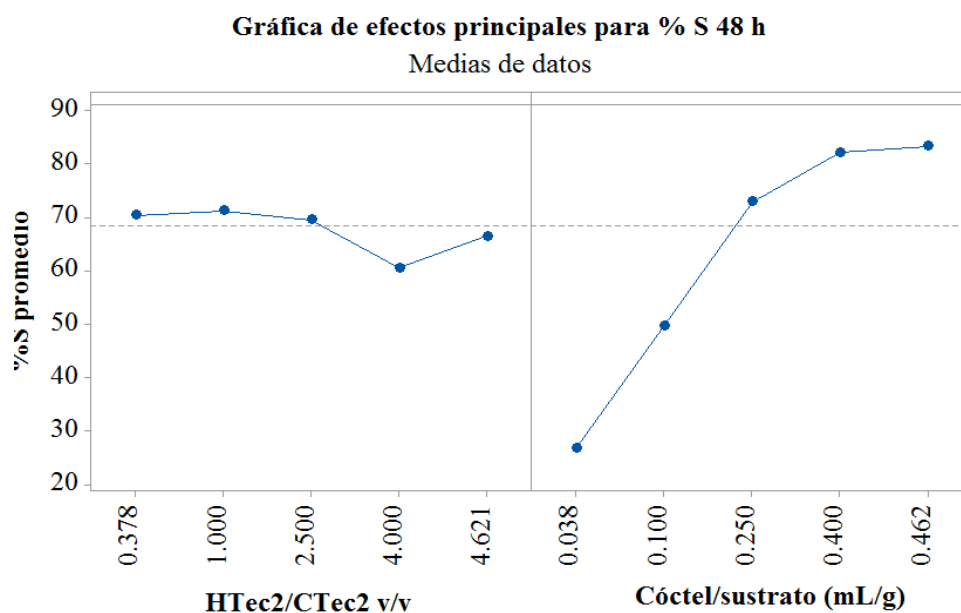


Figura C12. Grafica de efectos principales para % S a 48 horas.

Apéndice D. Cinética del coctel seleccionado

Se presenta en la tabla C2 los porcentajes de sacarificación obtenidos para 12 y 24 horas para cada uno de los cócteles establecidos por el diseño experimental.

Tabla D1. Porcentajes de sacarificación obtenidos para 48 horas.

Concentración sustrato (g/L)	Porcentaje de Sacarificación
	48 h
5	4.93
15	14.87
30	29.56
45	44.26
55	51.94
60	42.85
75	31.95
90	23.97

Tomando únicamente los datos antes de 55 g/L se procede a realizar el gráfico de Lineweaver-Burk en la determinación de las constantes cinéticas en la ecuación de Michaelis Menten a 48h (tiempo donde el porcentaje de sacarificación es máximo).

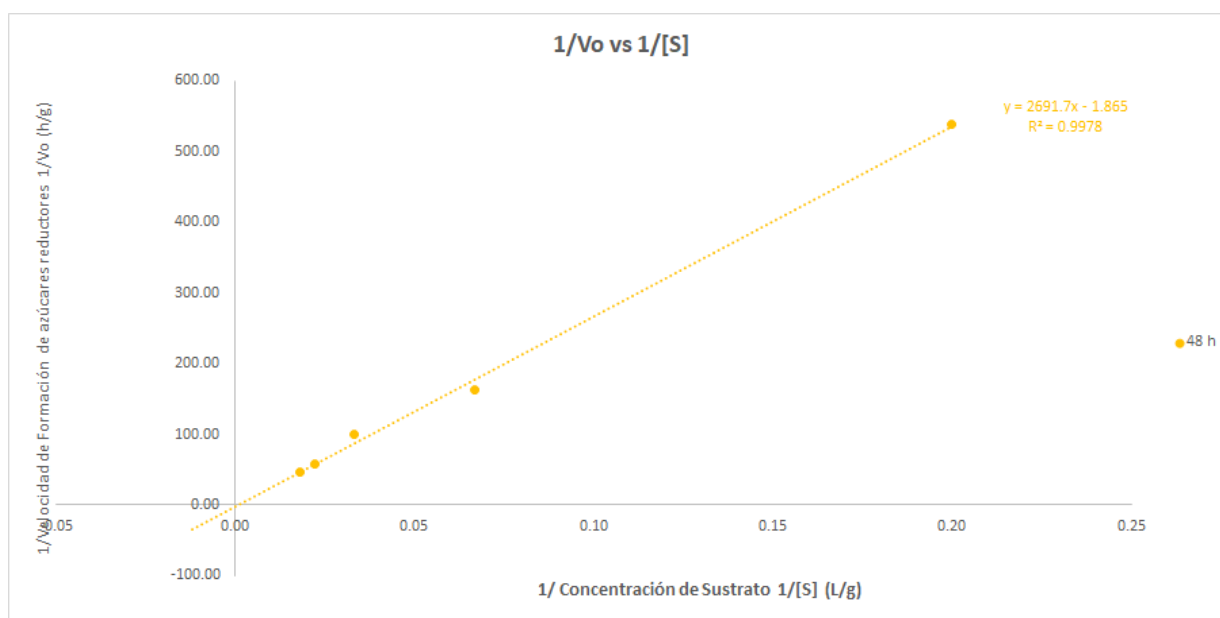


Figura D1 Velocidad de formación de azúcares reductores Vs. 1/concentración de sustrato.

Ecuación de la recta: $Y = 1.9424X + 0.4911$.

Dónde:

- $X = 1/[S]$.
- $Y = 1/[V_0]$
- $1/V_{\text{Máx.}} = 0.4911$
- $V_{\text{Máx.}} \text{ (g/h)} = 2.036245$.

Cuando $1/V_o = 0$.

- $1/[S] = -1/K_m = X$
- $1/V_o = (K_m/V_{max}) * (1/[S]) + 1/V_{max}$
- $-1/K_m = -0.25283 \rightarrow K_m \text{ (g/L)} = 3.955203$

Reemplazando se obtiene la expresión final de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_o \left(\frac{g}{h} \right) = \frac{2.036245 \left(\frac{g}{h} \right) * [S]}{3.955293 \left(\frac{g}{L} \right) + [S]} \quad \text{Donde [S] está en g/L.}$$

Apéndice E. Costos Globales

Se fijó una cantidad de 10 Kg de residuos deslignificados para los cálculos, con un volumen de ensayo de hidrólisis de 166.67 litros (0.06 kg/mL de solido/liquido), un valor de 4.208 gramos/l y de 3.741 de ácido cítrico y citrato de sodio respectivamente por volumen de buffer (pH 4.8). Se tuvo en cuenta los porcentajes de sacarificación obtenidos teóricamente para cada condición de acuerdo con los modelos matemáticos representativos de los datos encontrados (apéndice C). Teniendo en cuenta lo anterior se presenta en las tablas E1, E2, E3 y E4, los costos (en pesos colombianos COP) asociados para los diferentes escenarios de costos de enzimas.

Tabla E1. Costos asociados para HTec2 de 0.5 USD y CTec2 en un rango de 0.5 a 3 USD.

HTec2 (USD/gal et)	0.5	0.5	0.5	0.5
CTec2 (USD/gal et)	0.5	1	2	3
	12 h	12 h	12 h	12 h
C/S: 0.38	2598.06	3037.08	3915.11	4793.14
C/S: 1.00	2057.11	2534.93	3490.56	4446.19
C/S: 2.50	1583.09	2037.14	2945.23	3853.33
C/S: 4.00	1633.76	2164.05	3224.63	4285.21
C/S: 4.62	1776.00	2380.13	3588.39	4796.65
	24 h	24 h	24 h	24 h
C/S: 0.38	2810.89	3174.13	3900.60	4627.07
C/S: 1.00	2174.12	2582.46	3399.14	4215.82
C/S: 2.50	1630.49	2025.47	2815.43	3605.39
C/S: 4.00	1632.49	2092.00	3011.02	3930.04
C/S: 4.62	1746.37	2266.96	3308.15	4349.34
	36 h	36 h	36 h	36 h
C/S: 0.38	3109.37	3433.67	4082.28	4730.89
C/S: 1.00	2306.19	2664.57	3381.32	4098.06
C/S: 2.50	1687.13	2036.33	2734.75	3433.16
C/S: 4.00	1695.94	2116.55	2957.76	3798.98
C/S: 4.62	1830.46	2318.18	3293.64	4269.09
	48 h	48 h	48 h	48 h
C/S: 0.38	2953.41	3184.41	3646.42	4108.43
C/S: 1.00	1690.70	1972.51	2536.11	3099.71
C/S: 2.50	1333.00	1632.22	2230.68	2829.13
C/S: 4.00	1407.39	1784.94	2540.03	3295.13
C/S: 4.62	1552.31	1998.57	2891.10	3783.62

Tabla E2. Costos asociados para HTec2 de 1.0 USD y CTec2 en un rango de 0.5 a 3 USD.

HTec2 (USD/gal et)	1	1	1	1
CTec2 (USD/gal et)	0.5	1	2	3
	12 h	12 h	12 h	12 h
C/S: 0.38	3037.08	3476.09	4354.13	5232.16
C/S: 1.00	2534.93	3012.74	3968.37	4924.01
C/S: 2.50	2037.14	2491.18	3399.28	4307.38
C/S: 4.00	2164.05	2694.34	3754.92	4815.50
C/S: 4.62	2380.13	2984.26	4192.52	5400.78
	24 h	24 h	24 h	24 h
C/S: 0.38	3174.13	3537.36	4263.84	4990.31
C/S: 1.00	2582.46	2990.80	3807.48	4624.16
C/S: 2.50	2025.47	2420.45	3210.41	4000.36
C/S: 4.00	2092.00	2551.51	3470.53	4389.55
C/S: 4.62	2266.96	2787.56	3828.74	4869.93
	36 h	36 h	36 h	36 h
C/S: 0.38	3433.67	3757.98	4406.58	5055.19
C/S: 1.00	2664.57	3022.94	3739.69	4456.44
C/S: 2.50	2036.33	2385.54	3083.95	3782.36
C/S: 4.00	2116.55	2537.16	3378.37	4219.59
C/S: 4.62	2318.18	2805.91	3781.36	4756.82
	48 h	48 h	48 h	48 h
C/S: 0.38	3184.41	3415.42	3877.42	4339.43
C/S: 1.00	1972.51	2254.31	2817.91	3381.51
C/S: 2.50	1632.22	1931.45	2529.90	3128.35
C/S: 4.00	1784.94	2162.49	2917.58	3672.67
C/S: 4.62	1998.57	2444.83	3337.36	4229.88

Tabla E3. Costos asociados para HTec2 de 2.0 USD y CTec2 en un rango de 0.5 a 3 USD.

HTec2 (USD/gal et)	2	2	2	2
CTec2 (USD/gal et)	0.5	1	2	3
	12 h	12 h	12 h	12 h
C/S: 0.38	3915.11	4354.13	5232.16	6110.19
C/S: 1.00	3490.56	3968.37	4924.01	5879.64
C/S: 2.50	2945.23	3399.28	4307.38	5215.48
C/S: 4.00	3224.63	3754.92	4815.50	5876.08
C/S: 4.62	3588.39	4192.52	5400.78	6609.04
	24 h	24 h	24 h	24 h
C/S: 0.38	3900.60	4263.84	4990.31	5716.79
C/S: 1.00	3399.14	3807.48	4624.16	5440.84
C/S: 2.50	2815.43	3210.41	4000.36	4790.32
C/S: 4.00	3011.02	3470.53	4389.55	5308.57

C/S: 4.62	3308.15	3828.74	4869.93	5911.11
	36 h	36 h	36 h	36 h
C/S: 0.38	4082.28	4406.58	5055.19	5703.80
C/S: 1.00	3381.32	3739.69	4456.44	5173.19
C/S: 2.50	2734.75	3083.95	3782.36	4480.78
C/S: 4.00	2957.76	3378.37	4219.59	5060.80
C/S: 4.62	3293.64	3781.36	4756.82	5732.27
	48 h	48 h	48 h	48 h
C/S: 0.38	3646.42	3877.42	4339.43	4801.43
C/S: 1.00	2536.11	2817.91	3381.51	3945.12
C/S: 2.50	2230.68	2529.90	3128.35	3726.80
C/S: 4.00	2540.03	2917.58	3672.67	4427.77
C/S: 4.62	2891.10	3337.36	4229.88	5122.41

Tabla E4. Costos asociados para HTec2 de 3.0 USD y CTec2 en un rango de 0.5 a 3 USD.

HTec2 (USD/gal et)	3	3	3	3
CTec2 (USD/gal et)	0.5	1	2	3
	12 h	12 h	12 h	12 h
C/S: 0.38	4793.14	5232.16	6110.19	6988.22
C/S: 1.00	4446.19	4924.01	5879.64	6835.27
C/S: 2.50	3853.33	4307.38	5215.48	6123.57
C/S: 4.00	4285.21	4815.50	5876.08	6936.66
C/S: 4.62	4796.65	5400.78	6609.04	7817.30
	24 h	24 h	24 h	24 h
C/S: 0.38	4627.07	4990.31	5716.79	6443.26
C/S: 1.00	4215.82	4624.16	5440.84	6257.52
C/S: 2.50	3605.39	4000.36	4790.32	5580.28
C/S: 4.00	3930.04	4389.55	5308.57	6227.58
C/S: 4.62	4349.34	4869.93	5911.11	6952.30
	36 h	36 h	36 h	36 h
C/S: 0.38	4730.89	5055.19	5703.80	6352.41
C/S: 1.00	4098.06	4456.44	5173.19	5889.93
C/S: 2.50	3433.16	3782.36	4480.78	5179.19
C/S: 4.00	3798.98	4219.59	5060.80	5902.02
C/S: 4.62	4269.09	4756.82	5732.27	6707.73
	48 h	48 h	48 h	48 h
C/S: 0.38	4108.43	4339.43	4801.43	5263.44
C/S: 1.00	3099.71	3381.51	3945.12	4508.72
C/S: 2.50	2829.13	3128.35	3726.80	4325.25
C/S: 4.00	3295.13	3672.67	4427.77	5182.86
C/S: 4.62	3783.62	4229.88	5122.41	6014.93

Apéndice F. Validación de resultados

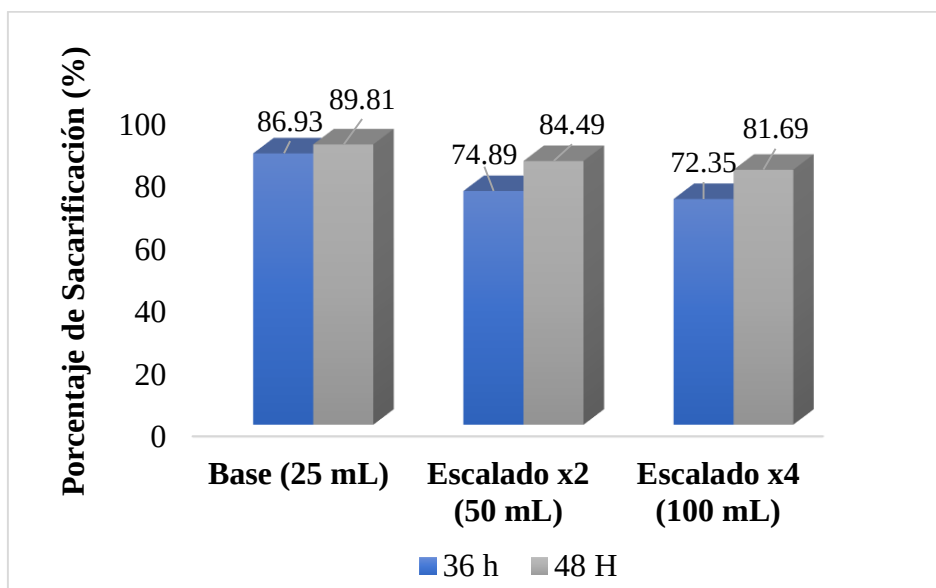


Figura F1. Validación de resultados para 36 y 48 horas

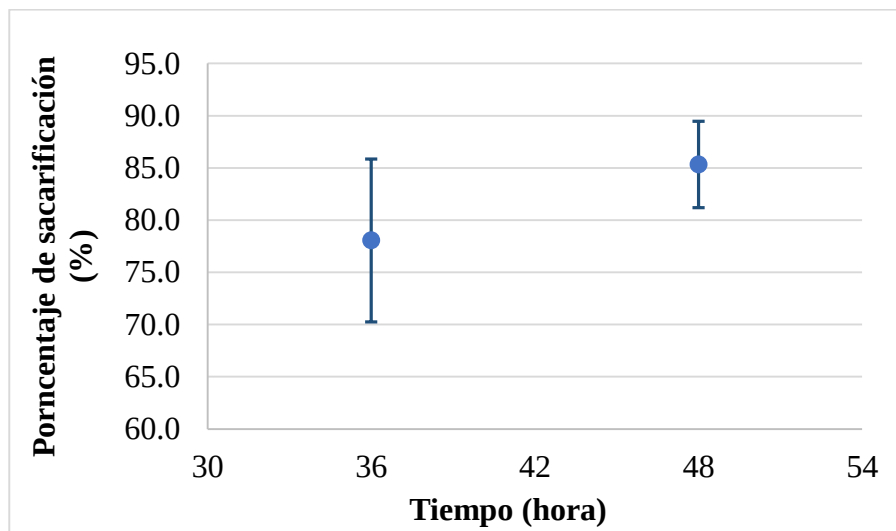


Figura F2. Gráfica de intervalos para 36 y 48 horas.

ANEXO

Anexo A. Características de las enzimas empleadas

Se reporta las características relevantes de las enzimas usadas en este estudio (tabla A1).

Tabla A1. Características relevantes de las enzimas

Nombre comercial de la enzima	Fabricante	Actividad principal	Actividades enzimáticas	Temperaturas óptimas de operación (°C)	pH's óptimos de operación
Accellerase 1500	Genencor	Celulasa	76.5 FPU/mL, 2200-2800 CMC/g, 269 UI/mL (Nghiem, Elis y Montanti, 2016)	50-65	4.0-5.0
Accellerase XY	Genencor	Hemicelulasa	0.16 FPU/mL, 37 CMC/mL, 102.50 UI/mL (Salcedo, 2015)	50-75	4.5-7.0
Cellic CTec2	Novozyme	Celulasa	125 FPU/mL, 4621 XU/mL (Aramrueang, Zicari y Zhang, 2017)	50-55	4.5-5.5
Cellic HTec2	Novozyme	Hemicelulasa	2731 U/g de β -glucanasa (Hsieh et al., 2015)	45-50	4.5-5.5
Cellulose 2XL	Protech	Celulasa	41 FPU/mL, 9685 XU/mL (Aramrueang, Zicari y Zhang, 2017)	45-65	4.0-6.0
Pectinex Ultra SP.	Novozyme	Pectinasa	-	Alrededor de 50	3.5-6.0
Viscozyme L	Novozyme	Celulasa	0.37 FPU/mL, 176.1 U/mL, 9500 PGU/mL (Pengilly et al., 2012)	Alrededor de 50	3.3-5.5
			25 FPU/mL, 225 XU/mL (Davison, Finkelstein y Wyman, 2012)		

Se presenta una descripción más detallada de las enzimas Cellic CTec2 y Cellic HTec2 (Tabla A2).

Tabla A2. Descripción Cellic CTec2 y HTec2 y sus características (adaptado de Novozyme).

Producto	Cellic CTec2	Cellic HTec2
Especificaciones técnicas / descripción	-Complejo de celulasa para la degradación de celulosa a azúcares fermentables. - Una mezcla de - Celulasas agresivas - Alto nivel de β-glucosidasas - Hemicelulasa	- Endo-xilanasas con alta especificidad hacia hemicelulosa soluble
Características	-Alto rendimiento de conversión - Eficaz en altas concentraciones de sólidos - Inhibidor tolerante - Compatible con múltiples materias primas y pretratamientos - Alta concentración y estabilidad	- Puede mejorar la hidrólisis de celulosa cuando se combina con CTec2 - Ayuda en caso de pretratamiento alcalino o ácido leve - Convierte la hemicelulosa en azúcares fermentables.
Beneficios	-Hasta un 50% menos de dosis de enzima - Menores costos operativos y de capital por la optimización del proceso, por ejemplo, mayor carga total de sólidos y mayor título de etanol - Permitir un bajo costo de etanol - Mayor flexibilidad de proceso	- Costo de uso de enzima 20% menor - Permite mayores rendimientos de etanol - Proporciona una mayor flexibilidad para la tecnología de pretratamiento.
Condiciones óptimas	Temperatura entre 45–50 °C and pH entre 5.0–5.5.	Temperaturas entre 45–50 °C con un pH 5.0.

Anexo B. Método para medición de azúcares reductores

- Se tuvo en cuenta los tiempos de hidrólisis para 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 y 48 horas se tomaron muestras del hidrolizado de alrededor de 1 mL, inferiores al 10% del volumen de ensayo.
- Se realizó una inactivación de las enzimas mediante un baño térmico a 96°C (punto de ebullición del agua) durante 15 minutos. Las muestras tratadas se guardaron a -5°C para evitar contaminación microbiana, hasta su posterior medición de azúcares reductores.
- Se centrifugaron las muestras a 10000 RPM durante 15 minutos para precipitar los sólidos en la muestra y medir por triplicado en el sobrenadante los azúcares reductores.

El ensayo DNS permite medir la concentración de azúcares reductores totales obtenidos como resultado de la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica. Es el ensayo más común para la determinación de la acumulación de azúcares reductores.

Preparación de reactivo DNS: Para la preparación de 700 ml de reactivo, a 350 mL de agua destilada se adicionan 11.2 gramos de NaOH, seguido se adicionan lentamente 306.6 g de tartrato de sodio y potasio y se mezcla hasta total dilución. A la solución se agregan 7 gramos de DNS y se adiciona agua destilada hasta completar 700 mL. Se debe cubrir el recipiente de los rayos de luz una vez agregado el DNS.

Para la medición de azúcares reductores: 0.5 de muestra a analizar son adicionados en tubos de ensayo (protegidos a la luz), se adiciona 1.0 mL de reactivo DNS y se lleva el tubo a un baño maría a 98°C (punto de ebullición) durante 5 minutos exactos, finalizados los 5 minutos se lleva inmediatamente a un baño agua-hielo, se deja atemperar por un tiempo aproximado de 15 minutos y se mide la absorbancia a 540 nm. Se realizará una curva patrón, con diferentes soluciones de glucosas a determinadas concentraciones.

Anexo C. Método para medición de actividades enzimáticas

La actividad catalítica de las enzimas se mide de diferentes métodos de acuerdo con el tipo de actividad a medir, según el sistema de unidades SI. La actividad se mide por katal que es igual a una mol de sustrato transformado por segundo. Sin embargo, la unidad no es ampliamente aceptada ya que la magnitud de la unidad es demasiado grande y adecuada solo para la reacción a escala industrial. En consecuencia, se aceptó otra unidad, que es la Unidad Internacional (UI). Es igual a un micromol de sustrato transformado por minuto en condiciones definidas. (Faber 2011). A continuación, se describe los métodos empleados para la medición de las actividades.

Celulosa Total: Para la determinación de la actividad total de la celulasa, es importante el ensayo recomendado por IUPAC, que se basa sobre una cantidad fija (2 mg) de glucosa obtenida desde 50 mg de papel filtro. El procedimiento consiste en adicionar un mililitro de tampón 0.05 M de citrato, pH 4.8 a tubos de prueba de aproximadamente 25 ml de capacidad. Seguidamente se agregan 0.5 ml de enzima diluida en el mismo tipo de buffer. El sustrato consta de tiras 1X6 cm de papel filtro Whatman No 1, el cual se agrega de tal forma que garantice que todas las tiras queden sumergidas en la solución. Al menos dos diluciones de enzimas deben ser usadas para garantizar que sea capaz de liberar más de 2 mg de glucosa. La mezcla de reacción se incuba a 50°C por 30 minutos, posteriormente se adicionan 3 ml de DNS y se somete a ebullición durante 5 minutos, se procede a enfriar rápidamente. Al final se agregan 20 ml de agua destilada, los tubos son mezclados por inversión, se dejan sedimentar por 20 minutos, y se mide la absorbancia a 540 nm. El blanco de enzimas, blanco de reactivos y solución de glucosa estándar, deben ser medidos de la misma forma (Ghose, 1987; Wood y Batchl, 1988; Mandels *et al*, 1976).

$$\text{Actividad de Celulosa} = \frac{0,3700}{\text{concentración de enzima que libera 2 mg de glucosa}} \text{ FPU/ml}$$

Endo-glucanasa: La enzima este tipo de actividad se caracteriza por hidrolizar los enlaces glicósidos interiores de las cadenas de celulosa. Para su medición la IUPAC recomienda el método usando carboximetil celulosa, el cual se describe a continuación: 0.5 ml de la muestra

de enzima se diluye en una solución tampón de citrato pH 4,8. Al menos dos diluciones deben ser realizadas de cada muestra de enzima investigada, a tal que se logre encontrar la dilución que libere 0.5 mg de glucosa. A las muestras de enzima se le adiciona 0.5 ml de solución de sustrato (CMC 2% w/v disuelta 0.05 M de buffer de citrato de sodio pH 4.8) en tubos de ensayo de 25 mL y se incuban posteriormente a 50°C por 30 minutos. Después transcurrido el tiempo de reacción, se adicionan 3 ml de DNS, se lleva a ebullición por 5 minutos y a un baño de agua-hielo por el mismo tiempo. Seguidamente, se adicionan 20 ml de agua destilada, agitando para asegurar que las sustancias del fondo se alcancen a solubilizar y se separen del fondo. La solución obtenida se lee en espectrofotómetro a 540 nm, Los blancos, espectro cero y solución estándar tienen el mismo tratamiento que las muestras (Ghose, 1987; Wood y Bhat, 1988; Mandels et al, 1976).

$$\text{Actividad de Celulosa} = \frac{0.185}{\text{concentración de enzima que libera 0.5 mg de glucosa}} \text{ CMC/ml}$$

Exo-glucanasa: esta actividad se caracteriza continuar la acción de las endoglucanasas sobre misma cadena (que tiene extremos libres como resultado de la acción de esta enzima). Para su medición la IUPAC recomienda el método usando avicel, el cual se describe a continuación:

2.0 ml de la muestra de enzima se diluyen en una solución tampón de citrato pH 4.8. Al menos dos diluciones deben ser realizadas de cada muestra de enzima investigada, a tal que se logre encontrar la dilución que libere de 2.0 mg de glucosa. A las muestras de enzima se le adiciona 3.0 ml de solución de sustrato (avicel 0.5% p/w disuelta 0.05 M de buffer de citrato de sodio pH 4.8) en tubos de ensayo de 25 mL y se incuban posteriormente a 50°C por 60 minutos. Después transcurrido el tiempo de reacción, se adicionan 3 ml de DNS, se lleva a ebullición por 5 minutos y a un baño de agua-hielo por el mismo tiempo. Seguidamente, se adicionan 5.0 ml de agua destilada y se agita para asegurar que las sustancias del fondo se alcancen a solubilizar y se separen del fondo. La solución obtenida se lee en espectrofotómetro a 540 nm, Los blancos, espectro cero y solución estándar tienen el mismo tratamiento que las muestras (Ghose, 1987; Wood y Bhat, 1988; Mandels et al, 1976).

$$\text{Actividad de Celulosa} = \frac{0.093}{\text{concentración de enzima que libera 2 mg de glucosa}} \text{ IU/ml}$$

Endo-xilanasa: Para la medición de este tipo de actividad, se empleó el método XylX6 de Megazyme. Se utilizó un kit de medición especial para esta medición.

Se realizaron dos diferentes buffers para la dilución de la enzima según el método; Buffer A y Buffer B. Para el buffer A se adiciona 60 g de ácido acético glacial (1.50 g/mL) A 800 mL de agua destilada. A esta esta solución se adiciona una solución 5 M de NaOH hasta alcanzar un pH de 4.5 y se ajusta el volumen hasta completar 1 litro con agua destilada. Para el buffer B se adiciona 100 mL del Buffer A a 800 mL de agua destilada. A esta esta solución se adiciona una solución 2 M de NaOH hasta alcanzar un pH de 4.5, se diluye 0.5 g de BSA y 0.2 g de azida sódica y se ajusta el volumen hasta completar 1 litro con agua destilada.

Se prepara un reactivo de parada (Buffer Tris), disolviendo 20 g de reactivo Tris en 900 mL de agua destilada, A esta esta solución se adiciona una solución 1 M de NaOH hasta alcanzar un pH de 10.0, y se ajusta el volumen hasta completar 1 litro con agua destilada.

Se adiciona 1.0 mL de enzima liquida en 49 mL de Buffer B, y sobre esta se toma nuevamente 1 mL y se diluye en determinada cantidad de Buffer B hasta ser adecuada para el método (esta última solución se denomina solución de endo-xilanasa).

Se dispensa 0.05 mL de alícuota de la solución del reactivo XylX6 en un tubo de 13 mL y se pasa a incubación durante 3 min a 40°C, a cada tubo se adiciona 0.05 mL de la solución de endo-xilanasa (previamente incubada por 3 minutos a 40°C), se mezcla por vortex y se incuba a 40°C por exactamente 10 min. Pasados los 10 minutos se agregan 1.5 mL del reactivo de parada (Buffer Tris), se lee la absorbancia de esta solución a 400 nm y se resta con la absorbancia del blanco (sin enzima).

La solución de endo-xilanasa será adecuada para el método, hasta lograr tener una dilución tal que no exceda una absorbancia generada de 1.00 (después de restada el blanco).