

**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE RESIDUOS DE LA COSECHA DE LA CAÑA DE
AZÚCAR (HOJAS Y COGOLLOS) PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL**

JAIRO GUADALUPE SALCEDO MENDOZA

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2013**

**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE RESIDUOS DE LA COSECHA DE LA CAÑA DE
AZÚCAR (HOJAS Y COGOLLOS) PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL**

JAIRO GUADALUPE SALCEDO MENDOZA

**Propuesta de investigación presentada como requisito parcial para optar al
título de Doctor en Ingeniería Química**

Director: Jorge Enrique López Galán, Dr.Sci.

Codirectora: Luz Marina Flórez Pardo, Dr.Sci.

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2013**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

CALI, COLOMBIA, Mayo, 2, 2012

DEDICATORIA

A **DIOS**, por guiarme por el camino del entendimiento, por concederme la salud necesaria para continuar con este proyecto de vida

A mi Esposa **Venus**, por tener la suficiente paciencia, fe y amor para lograr conjuntamente nuestra construcción de núcleo familiar

A mis hijos, **Jairo Alberto, María Carolina y Carlos Enrique**, por estar siempre ofreciendo ese amor que tanto necesite

A mis padres, Carlos Enrique (q.e.p.d) y Carolina por ser parte de esta estructura de vida que Dios me dio

AGRADECIMIENTOS

A los profesores **Jorge Enrique López G. y Luz Marina Flórez P.** por sus aportes a este trabajo

A la **Escuela de Ingeniería Química de la Universidad del Valle, Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Autónoma de Occidente, los integrantes del grupo interinstitucional de investigación en biocombustibles “Grubioc”, la Universidad de Sucre, Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas “INZIT”, joven investigadora de universidad del Valle Ángela Sofía Parra,** y todos aquellos que hicieron posible la confección y desarrollo de este trabajo

RESUMEN

Con esta investigación se evaluó la hidrólisis enzimática de sustratos heterogéneos obtenidos en los residuos de la cosecha de caña de azúcar (hojas y cogollos) que puedan ser utilizados en la obtención de alcohol carburante. Inicialmente, definiendo una metodología para la obtención de biocatalizadores para la hidrólisis de residuos de caña de azúcar. Para este caso, se prepararon ocho sustratos, los cuales fueron obtenidos por deslignificación organosolvente, tratamiento con hidróxido de sodio, deslignificación enzimática y un sustrato al que no se le aplicó ningún tratamiento. Los diferentes sustratos fueron hidrolizados con cinco cocteles enzimáticos derivados de mezclas de enzimas comerciales. Las reacciones se llevaron a cabo a una temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, con una relación sólido/líquido de 6/100, en soluciones buffer acetato de 4.8. Se determinó el porcentaje de sacarificación, el índice de sacarificación a través de la construcción de progreso con base en la producción de azúcares reductores en función del tiempo. Se implementó un diseño experimental tipo factorial para las variables; tipo de sustrato, mezcla de enzima y relación enzima/sustrato. Con los datos recolectados, se determinó el índice de hidrólisis e índice global de hidrólisis. En el análisis de la información se utilizó estadística descriptiva usando el Software StatGraphics®. Para generar las bases para seleccionar las mezclas de actividades enzimáticas utilizando el índice global de hidrólisis, se manejó la herramienta de lógica difusa del software MATLAB®. Los resultados presentaron regiones de máximo índice global de hidrólisis para residuos de la cosecha de la caña de azúcar, los cuales se encuentran entre 20 - 30 FPU/ml y 400 - 800 p NPG U/ml de actividad betaglucosidasa y actividad hemicelulasa entre 50 y 70 UI/ml, indicando que es importante el papel de la betaglucosidasa en la hidrólisis enzimática de sustratos lignocelulósicos y que no es necesario grandes cantidades de enzimas celulolíticas, sino una buena dosificación de estas. Además. El modelo cinético que mejor ajusta los datos experimentales de la hidrólisis de los residuos de la cosecha de la caña de azúcar, es el modelo de inhibición competitiva, teniendo como inhibidor la glucosa. El análisis de los datos experimentales arrojan las siguientes constantes cinéticas: $k_m = 20.37\text{ g/L}$, $v_m = 39\text{ g/L.h}$, $K_I = 0.442\text{ g/L}$, cuando las relaciones E/S mayor de 0.5, se puede aplicar el modelo cinético de Michaelis-Menten. Para costos de enzima por encima de 1.9 US\$/L, es difícil que procesos de hidrólisis de materiales lignocelulósicos sean viables, para el caso tratado, corresponde 6.9 dolares /100000 FPU.

Palabras Claves: Residuos de cosecha de caña de azúcar, hidrólisis enzimática, lignina, inhibidores, índice global de hidrólisis

CONTENIDO

Pág

INTRODUCCIÓN	20
1. MARCO TEÓRICO	24
1.1 MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS	24
1.1.1 Celulosa.....	25
1.1.2 Hemicelulosa.....	25
1.1.3 Lignina.....	26
1.2 SISTEMAS DE DEGRADACIÓN DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS.....	27
1.2.2 Degradación de la lignocelulosa.....	31
1.2.3 Hidrólisis de la celulosa.....	34
1.3 MODELOS CINÉTICOS PARA HIDRÓLISIS DE CELULOSA.....	37
1.3.1 Descripción de modelos cinéticos.....	37
2. METODOLOGÍAS Y PROCEDIMIENTOS.....	48
2.1 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO... 48	
2.1.1 Preparación de sustrato sin ningún pretratamiento (S1.....	49
2.1.2 Preparación de sustratos tratados con enzimas deslignificantes (S2).....	49
2.1.3 Preparación del sustrato con tratamiento con hidróxido de sodio (S4).....	50
2.1.4 Preparación de sustratos por método organosolvente (S3, S5, S6, S7 y S8) .	50
2.2 PRODUCCIÓN DEL BIOCATALIZADOR.....	51
2.2.1 Medida de actividades enzimáticas en enzimas comerciales.....	51
2.2.2 Conformación y estructuración del biocatalizador	52
2.2.3 Influencia de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática	56
2.3 DETERMINACIÓN DE MODELOS CINÉTICOS.....	56
2.3.1 Determinación de los parámetros cinéticos (Michaelis – Menten) e inhibición por sustrato	57
2.3.2 Evaluación de parámetros para la inhibición por producto.....	58

2.4 RELACIÓN ENTRE EL ÍNDICE DE CRISTALINIDAD Y EL ÍNDICE GLOBAL DE HIDRÓLISIS (IGH)	65
3. ANÁLISIS Y RESULTADOS	67
3.1 SELECCIÓN DE ENZIMAS	67
3.1.1 Caracterización de residuos (hojas y cogollos).....	67
3.1.2 Composición de los sustratos pretratados	68
3.1.2.1 <i>Análisis FTIR</i>	69
3.1.3 Perfil de actividades enzimáticas y selección de los cocteles enzimáticos.	71
3.1.4 Evaluación de los biocatalizadores	73
3.1.4.1 <i>Microscopia de barrido electrónico (SEM)</i>	77
3.1.5 Selección de biocatalizadores usando Lógica Difusa	79
3.1.6 Relación entre la cristalinidad y el Índice Global de Hidólisis (IGH)	86
3.1.7 Evaluación de las condiciones de operación pH y Temperatura.....	88
3.2 MODELO CÍNETICO	90
3.2.1 Evaluación de parámetros cinéticos del modelo de Michaelis-Menten e inhibición por sustrato.....	90
3.2.2.1 <i>Análisis de modelos del grupo I</i>	94
3.2.2.2 <i>Análisis de modelos del grupo II</i>	101
3.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CONTENIDO DE LIGNINA.....	106
3.3.1 Evaluación con diferentes pretratamientos.	106
3.3.2 Evaluación de los pretratamientos con organosolventes	110
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	116
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	120
ANEXOS Y APÉNDICES	138
Anexo A. Enzimas Comerciales.....	138
Anexo B. Métodos para determinación de actividad enzimática	139
Anexo C. Curvas de progreso de porcentaje de sacarificación contra tiempo.....	144
Apéndice 1. Análisis difusional.....	152
Apéndice 2. Selección de la relación enzima- sustrato (E/S) para el sustrato S6 y enzima E5.....	164

Apéndice 3. Análisis del Modelo de inhibición competitiva.	171
Apéndice 4. Cálculos computacionales (LABVIEW®).....	177
Apéndice 5. Gráficas para evaluación de efecto de lignina.	189

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Descripción de las condiciones de los pretratamientos aplicados al material obtenido de los residuos de la cosecha de caña de azúcar	50
Tabla 2. Sustrato y métodos para la determinación de actividad enzimática de celulasas, hemicelulas y ligninasas	52
Tabla 3. Composición general de los principales componentes en los residuos de caña de azúcar.....	67
Tabla 4. Análisis composicional (porcentaje) de los sustratos de materiales pretratados a partir de residuos de cosecha de caña de azúcar	68
Tabla 5. Descripción de la intensidad de de los picos más relevantes del espectro infrarrojo para los diferentes sustratos.	71
Tabla 11. Índice de cristalinidad (Icr), conversion de Cristalinidad (CII) y grado de mercerización para los sustratos S1, S2, S3, S5, S6, S7 y S8.....	88
Tabla 12. Conversiones globales de azúcares reductores para diferentes tiempos de hidrólisis de residuos de cosecha de caña de azúcar, para concentraciones iniciales de sustrato (10, 20, 30, 40, 60, 80 y 120 g/L), para el sustrato (S6).....	91
Tabla 13. Constantes cinéticas del modelo de Michaelis- Menten e inhibición por sustrato	93
Tabla 14. Constantes cinéticas (K_i , K_{ii} g/L) de los modelos evaluados para diferentes concentraciones iniciales de Sustrato y relaciones E/S (50 °C y pH 4.2)	96
Tabla 15. Constantes cinéticas (k_i , k_1 y k_2 g/L) de los modelos IC, INC, IIC y INCM para diferentes relaciones E/S a 50 °C y pH 4.2	96
Tabla 16. Correlaciones momento producto de Pearson, entre los modelos cinéticos del grupo I y sus datos experimentales	99
Tabla 17. Comparación múltiple de conversiones, usando procedimiento LSD para las medias de las curvas de progreso (E/S=0.375,0.5, 0.75, 1.5)	100
Tabla 18. Correlaciones de Momento de Pearson de las conversiones de modelos Michaelis - Menten (XM) y datos experimentales (E) para E/S= 1.5, 0.75, 0.5, 0.375)	101
Tabla 19. Constantes cinéticas de los modelos ICGCS-A, ICGCS-I y INCGNCS-A para diferentes relaciones E/S a 50 °C y pH 4.2	103

Tabla 20. Constantes cinéticas (k_1 y k_2 g/L) de los modelos ICGNCS-A y INCGCS-I para diferentes relaciones E/S a 50 °C y pH 4.2	104
Tabla 21. Momento de Pearson para modelos de doble inhibición, datos experimentales e inhibición competitiva para relaciones E/S de 0.187	105
Tabla 22. Análisis de pruebas de múltiples rangos para conversión en función del No de Kappa para la enzima E1.....	107
Tabla 23. Análisis de pruebas de múltiples rangos para conversión en función del No de Kappa para las enzimas E1 y E2, para condiciones de reacción de 40 °C y pH de 4.8	108
Tabla 24. Análisis de pruebas de múltiples rangos para conversión en función del No de Kappa para las enzimas E4 y E5, para condiciones de reacción de 40 °C y pH de 4.8.	110
Tabla 25. Análisis de pruebas de múltiples rangos para conversión media decimal en función del contenido de lignina (número de Kappa) utilizando la enzima E5, para sustratos pretratados por organosolvente	112
Tabla 26. Característica de enzimas comerciales	138
Tabla 27. Sustratos de referencia para determinación de actividad enzimática de celulosa	141

LISTA DE GRÁFICAS

Pág

Gráfica 6. Superficie de respuesta del IGH Hidrólisis contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad betaglucosidasa pNPG U/ml, para el sustrato S1 y una actividad de hemicelulasa de 60 UI/ml.....	80
Gráfica 7. Superficie de respuesta del IGH contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad betaglucosidasa pNPG U/ml, para el sustrato S2 y una actividad de hemicelulasa de 60 UI/ml.....	81
Gráfica 8. Superficie de respuesta del IGH contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad betaglucosidasa pNPG U/ml, para el sustrato S3 y una actividad de hemicelulasa de 60 UI/ml.....	82
Gráfica 9. Superficie de respuesta del IGH contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad betaglucosidasa pNPG U/ml, para el sustrato S4 y una actividad de hemicelulasa de 60 UI/ml.....	82
Gráfica 10. Superficie de respuesta del IGH contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad betaglucosidasa pNPG U/ml, para el sustrato S6 y una actividad de hemicelulasa de 60 UI/ml.....	83
Gráfica 11. Superficie de respuesta del IGH contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad betaglucosidasa p NPG U/ml, para el sustrato S7 y una actividad de hemicelulasa de 60 UI/ml.....	83
Gráfica 12. Superficie de respuesta del IGH contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad betaglucosidasa p NPG U/ml, para el sustrato S8 y una actividad de hemicelulasa de 60 UI/ml.....	84
Gráfica 13. Superficie de respuesta del IGH contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad betaglucosidasa pNPG U/ml, para el sustrato S5 y una actividad de hemicelulasa de 60 UI/ml.....	85
Gráfica 14. Superficie de respuesta del IGH contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad hemicelulasa UI/ml para el sustrato S3 y una actividad beta glucosidasa de 500 pNPG U/ml	86
Gráfica 15. Difractograma de rayos X para los sustratos S1, S2, S3 y S6	87
Gráfica 16. Difractograma de rayos X para los sustratos S5, S7 y S8.....	87

Gráfica 17. Diagrama de Pareto estandarizado, indicando las contribuciones del pH y Temperatura	89
Gráfica 18. Superficie de respuesta de la hidrólisis de S3 en función de la temperatura y el pH con la enzima E5	89
Gráfica 19. Medias de azúcares reductores para la hidrólisis de S3 en función del pH a 50 °C	90
Gráfica 20. Velocidad inicial de hidrólisis contra la concentración inicial de sustrato	92
Gráfica 21. Concentración inicial de sustrato S_0 /velocidad inicial de reacción (V_0) en función de concentración inicial de sustratos S_0	92
Gráfica 22. Comparación de curvas de progreso del modelo de Michaelis – Menten, con curvas de progreso obtenidas a diferentes relaciones E/S (1.5, 0.25 y 0.187)	94
Gráfica 23. Curvas de progreso de la conversión para relaciones E/S de 1.5, 0.75, 0.5, 0.375, 0.25, 0.187 y 0.125	95
Gráfica 24. Producción de glucosa durante la hidrólisis para diferentes concentraciones iniciales de sustrato S_0 (10, 20, 30, 40, 60, 80, 120), que corresponden a (1.5, 0.75, 0.5, 0.375, 0.25, 0.187, 0.125 relaciones E/S respectivamente.	95
Gráfica 25. Curvas de progreso de las simulaciones de modelos cinéticos comparada con la conversión a partir de datos experimentales X_{60} para concentración inicial de sustrato S_0 (60 g/L, E/S=0.25).....	97
Gráfica 26. Curvas de progreso de las simulaciones de modelos cinéticos comparada con la conversión a partir de datos experimentales X_{80} para concentración inicial de sustrato (80 g/L, E/S=0.187)	98
Gráfica 27. Curvas de progreso de las simulaciones de modelos cinéticos comparada con la conversión a partir de datos experimentales X_{120} para concentración inicial de sustrato S_0 (120 g/L, E/S=0.125).....	98
Gráfica 28. Curvas de progreso para relaciones experimentales (E) y simulaciones del modelo de Michaelis- Menten (XM) para relaciones E/S de 0.75 y 1.5.	99
Gráfica 29. Curvas de progreso para relaciones experimentales (E) y simulaciones del modelo de Michaelis- Menten (XM) para relaciones E/S de 0.375, 0.5.	100
Gráfica 30. Análisis cromatográfico de una muestra de solución de hidrolizada	101

Gráfica 31. Concentración de azúcares simples y celobiosa en la hidrólisis enzimática del sustrato S6 usando la enzima E5 para una relación E/S de 0.375.....	102
Gráfica 32. Curvas de progreso para producción de azúcares reductores, glucosa y solubles para una concentración de 40 g/L (E/S= 0.375).....	102
Gráfica 33. Perfil de concentraciones de solubles a diferentes relaciones E/S de 0.5, 0.375, 0.25 y 0.187	103
Gráfica 33. Curvas de progreso para modelos de doble inhibición, datos experimentales e inhibición competitiva para relaciones E/S de 0.187	105
Gráfica 34. Distribución de No de Kappa y contenido de lignina residual para los diferentes sustratos	106
Gráfica 35. Conversión medias para sustratos (contenido de lignina residual) para diferentes sustratos tratados con la enzima E1.....	107
Gráfica 36. Conversión para sustratos con diferentes contenidos de lignina residual para la enzima E3.....	109
Gráfica 37. Conversión media para sustratos con diferentes contenidos de lignina para la enzima E2.....	109
Gráfica 38. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E5 y una relación E/S=0.375, para sustratos pretratados con organosolvente	111
Gráfica 39. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E5 y una relación E/S=0.25, para sustratos pretratados con organosolvente	111
Gráfica 40. Perfil de conversión (decimal) con respecto al tiempo para E5 y una relación E/S=0.187, para sustratos pretratados con organosolvente.....	112
Gráfica 41. Conversión media obtenida en la hidrólisis de los sustratos S1, S5, S6 y S7 (lignina residual) utilizando la enzima E5.	113
Gráfica 42. Descripción del comportamiento de los diferentes sustratos basados en el contenido de lignina y el pretratamiento frente al IGH utilizando la enzima E5	114
Gráfica 43. Matriz de dispersión entre los efectos del pretratamiento (contenido de lignina, Índice de sacarificaciones) y el IGH.....	114
Gráfica 44. Curvas de progreso para el sustrato S1 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5; relaciones E/S (ml/g sustrato) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3.....	144

Gráfica 45. Curvas de progreso para el sustrato S1 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5; relaciones E/S (ml/g sustrato) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3.....	145
Gráfica 46. Curvas de progreso para el sustrato S3 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5; relaciones E/S (ml/g sustrato) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3.....	146
Gráfica 47. Curvas de progreso para el sustrato S4 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5; relaciones E/S (ml/g sustrato) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3.....	147
Gráfica 48. Curvas de progreso para el sustrato S5 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5; relaciones E/S (ml/g sustrato) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3.....	148
Gráfica 49. Curvas de progreso para el sustrato S6 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5; relaciones E/S (ml/g sustrato) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3.....	149
Gráfica 50. Curvas de progreso para el sustrato S7 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5; relaciones E/S (ml/g sustrato) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3.....	150
Gráfica 51. Curvas de progreso para el sustrato S8 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5, relaciones E/S (ml/g sustrato) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3.....	151
Gráfica 52. Perfil de viscosidades de material lignocelulósico con una concentración del 23% de sólidos insolubles para diferentes tiempos de hidrólisis con una relación E/S de 0.2 g de enzima/ g de sustrato.....	158
Gráfica 53. Perfil de coeficientes de transferencia de masa para las condiciones de operación: concentración de sustrato de 195 g/L, C_{ES} de 16 g/L, C_{EO} de 120.7 g/L, velocidad de agitación 250 rpm y un diámetro de partícula de 0.6 mm.	159
Gráfica 54. Perfil de coeficientes de transferencia de masa para las condiciones de operación: concentración de sustrato de 195 g/L, C_{ES} de 16 g/L, C_{EO} de 120.7 g/L, velocidad de agitación 50 rpm y un diámetro de partícula de 0.6 mm.	159
Gráfica 55. Perfil de coeficientes de transferencia de masa para las condiciones de operación: concentración de sustrato de 195 g/L, C_{ES} de 16 g/L, C_{EO} de 277.7 g/L, velocidad de agitación 0 rpm y un diámetro de partícula de 50 mm.	160
Gráfica 56. Perfil de conversión en el tiempo del material lignocelulósico obtenido a partir <i>Eucalyptus globulus</i> para dos velocidades de agitación 50 y 250 rpm.	162
Gráfica 57. Distribución de frecuencia de la conversión con respecto al tiempo para la hidrólisis enzimática de un material <i>Eucalyptus (Eucalitus globulus)</i>	162

Gráfica 58. Contorno de Superficie de la diferencia entre valor comercial de jarabes de glucosa y costo de producción de jarabes de glucosa a partir de material lignocelulósico, para valores de enzimas de 4 US\$/L	167
Gráfica 59. Contorno de Superficie de la diferencia entre valor comercial de jarabes de glucosa y costo de producción de jarabes de glucosa a partir de material lignocelulósico, para valores de enzimas de 3 US\$/L	168
Gráfica 60. Contorno de superficie de la diferencia entre valor comercial de jarabes de glucosa y costo de producción de jarabes de glucosa a partir de material lignocelulósico, para valores de enzimas de 2 US\$/L	169
Gráfica 61. Contorno de Superficie de la diferencia entre valor comercial de jarabes de glucosa y costo de producción de jarabes de glucosa a partir de material lignocelulósico, para valores de enzimas de 1 US\$/L	169
Gráfica 62. Contorno de Superficie de la diferencia entre valor comercial de jarabes de glucosa y costo de producción de jarabes de glucosa a partir de material lignocelulósico, para valores de enzimas de 1 US\$/L	170
Gráfica 63. Curvas de progreso para conversión total (XT) para constantes de inhibición promedio y conversión (XR) para la constante de inhibición del modelo $k = 0.43$ ($E/S=0.375$)	172
Gráfica 64. Curvas de progreso para conversión total (XT) para constantes de inhibición promedio y conversión (XR) para la constante de inhibición del modelo $k = 0.448$ ($E/S=0.187$)	173
Gráfica 65. Curvas de progreso para conversión total (XT) para constantes de inhibición promedio y conversión (XR) para la constante de inhibición del modelo $k = 0.427$ ($E/S=0.125$)	173
Gráfica 66. Curvas de progreso para el modelo de Michaelis- Menten con relaciones E/S de 1.5 (10 g/L), 0.75 (20 g/L) y 0.5 (30 g/L).....	174
Gráfica 67. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E1 y una relación $E/S=0.05$	189
Gráfica 68. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E1 y una relación E/S de 0.1	189
Gráfica 69. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E1 y una relación E/S de 0.2	190

Gráfica 70. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E1 y una relación para E/S de 0.3	190
Gráfica 71. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E3 y una relación E/S=0.05	191
Gráfica 72. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E3 y una relación E/S=0.1	191
Gráfica 73. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E3 y una relación E/S=0.2	192
Gráfica 74. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E3 y una relación E/S=0.3	192

LISTA DE ILUSTRACIONES

	Pág
Ilustración 1. Microscopia electrónica de barrido (SEM 1600X) para los sustratos S1, S2, S3 y S6) (Realizada en el instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas INZIT)	¡Error! Marcador no definido.
Ilustración 2. Algoritmo para el cálculo del valor del azúcar basado en precio comercial	166
Ilustración 3. Representación del fenómeno de difusión de enzima hacia el sustrato celulósico	¡Error! Marcador no definido.
Ilustración 4. Reactor de mezclador Helicoidal	¡Error! Marcador no definido.
Ilustración 5. Primer pantallazo, el cual indica los datos de alimentación al software y grafica de la función objetivo “diferencia” en función del tiempo	177
Ilustración 6. Datos de entrada por defecto introducidos al programa.....	178
Ilustración 7. Opción de introducir la cantidad de enzima y sustrato, acompañado del gráfico de función objetivo “diferencia” y el slide para controlar el desarrollo de la reacción de hidrólisis	179
Ilustración 8. Datos de salida de la simulación, donde se presentan los costos y variables a evaluar.....	180
Ilustración 9. Segundo pantallazo “Reacción de hidrólisis”, donde se muestran las curvas de progreso de la conversión y concentración de glucosa g/L	181
Ilustración 10. Tercer pantallazo “análisis difusional y costos”, donde se muestra en 3D la función objetivo y la conversión en función del tiempo y la relacion E/S. además, se presenta la evaluación de los coeficientes de transferencia de masa.....	182
Ilustración 11. Funcion objetivo”diferencia” para una relacion E/S de 0.0716 y un valor de enzima de 4 U\$/L	182
Ilustración 12. Curva de progreso de conversión E/S=0.0716 y 4 U\$/L	183
Ilustración 13. Función objetivo “diferencia” en función de E/S y tiempo para un valor de enzima de 4 U\$ /L	184

Ilustración 14. Conversion en función de E/S y tiempo para un valor de enzima de 4 U\$ /L	185
Ilustración 15. Función objetivo "diferencia" para una relacion E/S de 0.239, concentración inicial de sustrato de 176 g/L y un valor de enzima de 1.57 U\$/L.....	186
Ilustración 16. Curva de progreso de conversión para una relacion E/S=0.239, Concentracion inicial de susytrato 176 g/L y valor de enzima de 1.57 U\$/L	186
Ilustración 17. Curva de progreso de concentración de glucosa para una relacion E/S=0.239, Concentracion inicial de susytrato 176 g/L y valor de enzima de 1.57 U\$/L.....	187
Ilustración 18. Función objetivo "diferencia" en función de E/S y tiempo, para una concentración inicial de sustrato 176 g/L y valor de enzima de 1.57 U\$/L.....	187
Ilustración 19. Conversión en función de E/S y tiempo, para una concentración inicial de sustrato 176 g/L y valor de enzima de 1.57 U\$/L	188
Ilustración 20. Fotos de microscopía de barrido electrónico (MEB) de residuos de cosecha (hojas y cogollo) de caña de azúcar: (S1) material sin pretratar,; (S2) después de pretratamiento enzimático: (S3), (S6), (S7) y (S8): después del pretratamiento organosolvente	¡Error! Marcador no definido.

INTRODUCCIÓN

El interés por la producción de etanol carburante se ha incrementado en los últimos años, debido a la disminución de las reservas de combustibles fósiles, los altos precios del petróleo y el cambio climático producido por el efecto invernadero. Tradicionalmente, el etanol se ha producido a partir de materiales que contienen azúcares y almidones. En la última década, las materias primas lignocelulósicas han tomado importancia, debido a su abundancia y bajo costo, surgiendo como una potencial materia prima para la producción de biocombustibles de segunda generación (Wheals *et al*, 1999, Sarrouh *et al*, 2007).

La zona de confluencia del Valle del río Cauca es la máxima productora de caña de azúcar en Colombia. En el año 2008 se cultivaron 157.495 hectáreas, que representa una producción de 19 millones toneladas. El cultivo de caña produce gran cantidad de biomasa que se encuentra disponible en los residuos que se producen al cosechar esta planta. Además, algunos de estos residuos constituidos por cogollos, porciones de tallos adheridos al cogollo, hojas verdes y secas permanecen en el campo después de la cosecha. De acuerdo con datos reportados, se estima que después de la cosecha en verde de la caña, se dejan en el terreno aproximadamente entre 50 y 150 ton/ha de residuos al año. Es decir, si toda esta caña se cosechara en verde, quedarían en el campo entre 7.87 y 23.62 millones de toneladas de residuo por año (Cenicaña, 2008), a partir de las cuales se pudieran generar más de 1.500.000 litros de etanol/día.

Actualmente los residuos de la cosecha de caña no tienen una aplicación específica, solamente se dejan en el campo. En algunos casos, los productores de caña de azúcar realizan quema a cielo abierto de los residuos, esta práctica afecta la calidad de vida principalmente de quienes viven en el área circundante a los cultivos. El humo procedente de la quema contiene partículas menores de 10 μm que pueden producir enfermedades respiratorias. Por tal razón, los organismos de control ambiental están implementando normas para el control de este tipo de emisiones.

La estructura química, el grado de entrecruzamiento de los componentes que forman los materiales lignocelulósicos, la composición de sus componentes principales (lignina, celulosa y hemicelulosa), están relacionadas con el material de origen del cual proceden. Se puede asegurar, que la naturaleza del sustrato y el método de pretratamiento usado influye sobre la eficiencia de degradación del material lignocelulósico cuando se utilizan enzimas (Singh *et al*, 2005).

Para la degradación enzimática, existe un gran espectro de enzimas degradadoras de polisacáridos que actúan en forma compleja (pectinasa, celulasas, oxiredutasas y hemicelulasas), para la bioconversión del material lignocelulósico de las plantas. La acción de una enzima depende de la accesibilidad al sustrato.

En el caso de las celulasas, disminuyen su acción sobre la celulosa por la presencia de otros polisacáridos. Además, se sabe que la combinación de enzimas degradadoras de polisacáridos actúa sinérgicamente en la degradación de la matriz de la pared celular (Beldman *et al*, 1984).

La velocidad y extensión de la hidrólisis de sustratos lignocelulósicos se ve influenciada no solamente por la eficiencia de las enzimas, sino también por las características fisicoquímicas y morfológicas, expresada en la heterogeneidad de los sustratos lignocelulósicos. Por esto, se hace necesaria la utilización de sistemas muy selectivos (catalizadores), para la degradación de este tipo de materiales. La hidrólisis enzimática puede ser una mejor alternativa que la hidrólisis ácida, teniendo un gran potencial para el desarrollo y avances de tecnologías para la producción de etanol a partir de biomasa que pueda ser competitivo con respecto a otros combustibles. Además, la hidrólisis ácida produce una serie de productos recalcitrantes perjudiciales en la fermentación a alcohol etílico (Martin y Thonson, 2007).

Para una eficiente degradación de la lignocelulosa contenida en los cogollos y hojas de los residuos del cultivo de la caña de azúcar, es posible desarrollar una combinación sinérgica de enzimas capaces de degradar la lignina o hidrolizar los materiales producidos después de la delignificación. En efecto, es claro que la naturaleza del sustrato y el método de pretratamiento tiene mucha influencia en la factibilidad de la hidrólisis enzimática, como de la eficiencia del sistema enzimático usado para conducir la hidrólisis.

Por eso, es importante definir relaciones entre los componentes que forman los sustratos (materias primas) y las enzimas que puedan actuar sobre sustratos específicos que coadyuve en la implementación de herramientas para desarrollar una combinación de enzimas que puedan ser utilizados en el diseño de biocatalizadores para la deslignificación de las hojas y cogollos o para hidrólisis de material deslignificado, que pueda ser utilizado en la producción de etanol carburante. Por lo que surgen los siguientes interrogantes.

¿Es la lignina contenida en las materias primas lignocelulósicas el componente que ofrece mayor resistencia a la hidrólisis para producir monosacáridos que puedan ser fermentados a alcohol etílico?

¿Es posible disminuir la influencia del contenido de lignina sobre velocidad de hidrólisis de celulosa y hemicelulosa, minimizándola a través de una dosificación de una mezcla de enzimas que actúen sinérgicamente sobre todos los componentes del material lignocelulósico?

¿Existen grupos de enzimas (celulasas, oxireductasas, hemicelulasas y pectinasas), que actúan sinérgicamente, degradando selectivamente a monosacáridos de los sustratos obtenidos en la deslignificación de las hojas y

cogollos de residuos del cultivo de la caña de azúcar y operan de una forma más adecuada, comparada cuando estas enzimas actúan en forma individual?

¿La velocidad de degradación de la celulosa es mayor que la velocidad de degradación de material parcialmente deslignificado obtenidos ambos a partir de los residuos de caña de azúcar, cuando se usan mezclas de enzimas (celulasas, oxireductasas y hemicelulasas) y esto puede ser representado a través de un modelo cinético?

¿Si los modelos cinéticos de hidrólisis de celulosa que se formulan se basan en sustratos selectivos (lo más puro en celulosa), es posible predecir la velocidad de hidrólisis de un material lignocelulósico de los residuos de la cosecha de caña de azúcar independiente del contenido de lignina)?

Esta propuesta está encaminada al aprovechamiento de residuos de la cosecha de la caña de azúcar como materia prima para la producción de alcohol de segunda generación amigable con el ambiente, a la disminución de la quema de estos residuos y a la producción de biocombustibles que reduzcan la acumulación de gases productores del efecto invernadero, sin afectar la seguridad alimentaria. Igualmente, se intenta hacer aportes al desarrollo de tecnologías para la producción de alcohol carburante a partir de materiales lignocelulósicos, que la hagan competitiva con materias primas de origen amiláceo y sustratos directamente fermentables.

Entre los principales problemas para la hidrólisis que presentan las materias primas de origen lignocelulósico, se encuentra su heterogeneidad y el contenido de material recalcitrante. Hecho que conduce a que los tratamientos sean específicos dependiendo del producto que se quiera obtener, lo que conduce a implementar tecnologías de desarrollo de compuestos enzimáticos para la hidrólisis de estas materias primas.

Estos argumentos, crean la necesidad de desarrollar métodos para obtener biocatalizadores (enzimas), para la hidrólisis de material lignocelulósico obtenido de los residuos de la cosecha de la caña, que aporten argumentos a nuevas tecnologías para la producción de alcohol carburante a partir de materias primas de segunda generación.

Además, producir un modelo cinético basado en el material a tratar (residuos) y no a partir de sustratos puros, genera una nueva alternativa para la obtención de modelos cinéticos que están íntimamente ligados al material primario, que pueden ser usados para el diseño, modelamiento y optimización de bioreactores.

El objetivo general de esta investigación consiste en evaluar la hidrólisis enzimática de sustratos heterogéneos obtenidos en los residuos de la cosecha de caña de azúcar (hojas y cogollos) que puedan ser utilizados en la obtención de alcohol carburante.

El trabajo de investigación se dividió en tres etapas. La primera, se relaciona con la definición de una metodología para la obtención de biocatalizadores para la hidrólisis de residuos de caña de azúcar, basado en las características de estos residuos y en el sinergismo de las actividades enzimáticas que conduzcan a la degradación a azúcares fermentables de la pared celular (hojas y cogollos). La segunda, determinó modelos cinéticos para la obtención de azúcares fermentables a partir de un material celulósico (alto contenido de celulosa) obtenido de los residuos de la cosecha de caña de azúcar, usando el biocatalizador previamente seleccionado. Por último, se evaluó la incidencia del material recalcitrante (componentes de la lignina) sobre el biocatalizador seleccionado, en la hidrólisis de la pared celular de los residuos de la cosecha de la caña de azúcar con el biocatalizador seleccionado.

Además en el Apéndice 1, se presenta un análisis difusional (incidencia de la agitación sobre la hidrólisis de materiales lignocelulósicos obtenidos de los residuos de la cosecha de la caña de azúcar). En el Apéndice 2, se hace una evaluación económica para seleccionar la relación enzima/ sustrato (E/S) para el sustrato y enzima seleccionada. En el Apéndice 3, se plantea una discusión sobre modelo de inhibición competitiva. En el Apéndice 4, se muestran las deducciones de las simulaciones para la selección de relación E/S y análisis difusional, obtenidas a través del desarrollo de un software bajo Labview[®], que permita consolidar los resultados expuestos en este estudio

}

1. MARCO TEÓRICO

La producción de alcohol a partir de materias primas lignocelulósicas, ha cobrado un gran interés en el mundo. La biomasa celulolítica es una abundante fuente de material renovable sobre la tierra, e incluye varios residuos agrícolas y agroindustriales. La investigación en la degradación de material celulósico ha ido aumentando debido a su gran disponibilidad y su inmenso potencial para la transformación en azúcares, combustibles alternativos y materias primas para procesos químicos (Krishma *et al*, 2001). Algunos de estos residuos son producto de labores agrícolas, entre los que se encuentran follajes, cascarillas, cáscaras, residuos agrícolas de cosechas de maíz y caña de azúcar, que representan una abundante, económica, rápida y disponible fuente de biomasa lignocelulósica. Las materias primas de origen celulósico disponibles desde la agricultura y otras fuentes, se encuentran en cerca de 180 millones de toneladas/año. Alrededor de 2900 millones de toneladas de cultivos de cereales, 160 millones de toneladas de leguminosas y 14 millones de toneladas de semillas de aceite, son producidas anualmente a lo ancho del mundo. Adicionalmente, hay 600 millones de biomasa de residuos lignocelulósicos de palma de aceite. Sin embargo, solo un 10% tiene un uso útil, el 90% restante es descargado como residuo. A partir de diferentes tipos de materias primas lignocelulósicas como paja de trigo, arroz, palma, mazorca de maíz, tallos de maíz etc. se estima una producción de 1.5 trillones de toneladas anuales de celulosa (Kumar *et al*, 2008).

Regularmente después de la cosecha de la caña de azúcar, se procede a la quema al aire libre de residuos; práctica que afecta la calidad de vida de quienes viven en el área circundante a los cultivos. El humo procedente de la quema contiene partículas menores de 10 micras que producen enfermedades respiratorias (Given, 1996). Una alternativa para evitar la quema a cielo abierto, es la producción de etanol a partir de residuos de la caña de azúcar. El etanol es una fuente renovable que puede ser producida desde la fermentación de biomasa celulósica (Yu y Zhang, 2004).

1.1 MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

La lignocelulosa es el mayor componente de la biomasa, comprende alrededor de la mitad del material que la planta produce por fotosíntesis y representa la mayor fuente de materia orgánica renovable del suelo. Consiste de tres tipos de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, que están fuertemente entrecruzados y químicamente enlazados por fuerzas no covalentes y entrecruzamientos covalentes (Sánchez, 2008).

1.1.1 Celulosa. Es el principal componente de la pared celular, es la molécula de origen vegetal que más abunda sobre la tierra, representa el 50% del total de la biomasa terrestre, es un polímero de unidades de β -D glucosa. Dos unidades de este monosacárido unidos por enlaces β (1-4) forma la celobiosa que por polimerización, conduce a la formación de moléculas lineales de celulosa. La regular disposición de los grupos hidroxilos hace que las cadenas vecinas se unan, creando algunas regiones con alto ordenamiento cristalino (70%), constituyendo corpúsculos llamados micelas de al menos 30 cadenas de glucosa, tanto que otras regiones se disponen desordenadamente formando celulosa amorfa (Bennett, 1991).

Las cadenas lineales de la celulosa están fuertemente unidas por enlaces de hidrógeno para formar micro fibrillas (Zykwisiska *et al*, 2005). Las unidades monoméricas de celobiosa se encuentran formando estructuras tanto cristalinas como amorfas. Existen cuatro diferentes estados polimórficos los cuales incluyen a la celulosa cristalina I (celulosa nativa) y celulosa II, como también a la celulosa amorfa III y IV (Filson y Benjamin, 2009; Quian *et al*, 2005). En una celulosa nativa, las cadenas de polímeros están juntas durante la biosíntesis formando uniones poliméricas como fibras y micro fibrillas (Larsson y Westland, 2005). Además, la celulosa I consiste de dos fases I_α y I_β , ambas se encuentran coexistiendo en la pared de la célula con celulosa amorfa (Atalla y Vanderhart, 1984). La celulosa I_α es la forma más rara que existe, se encuentra solamente en algunas algas verdes, la celulosa I_β se encuentra en forma abundante, formando micro fibrillas en los grandes arboles madereros. Se ha encontrado que la celulosa obtenida por irradiación, con ultrasonido sobre el bagazo de caña tiene una estructura celular tipo I, pero con cristalinidad más baja que el algodón y el lino (Fu Liu *et al*, 2006).

1.1.2 Hemicelulosa. La hemicelulosa al contrario de la celulosa, es un heteropolisacárido no cristalino extremadamente ramificado. Es el segundo material renovable más abundante después de la celulosa (Sun *et al*, 2001). Todos los heteropolisacáridos presentes en la madera y plantas anuales, se encuentran interconectados con la celulosa y la lignina en la pared celular. Sin embargo, la hemicelulosa se encuentra más asociada con la celulosa por entremezclado físico, enlaces de hidrógeno y enlaces covalentes. Con la lignina estos enlaces son menores, encontrando especialmente enlaces α - benzil éter (Freudenberg, 1965)

Los polímeros ramificados que forman la hemicelulosa son de bajo peso molecular con un grado de polimerización entre 80 y 200. Su fórmula general es $(C_5H_8O_4)_n$, llamados pentosanas y hexosanas (Cai y Paszner, 1988). Se ha descrito, que la hemicelulosa está formada por residuos de azúcar, entre los que se encuentran D-xilosa, L- arabinosa, D-glucosa, D-galactosa, D- manosa y D - ácido glucorómico, 4-O – metil- D- ácido glucorómico, D – ácido galacturonico y en menor cantidad L-rhamnosa. Además, en la hemicelulosa de las plantas anuales, el arabinoxilano

es el que se encuentra en mayor cantidad. Estos contienen residuos de D-xilopiranosil, unidos por enlaces β -(1-4) glucosídicos. Por lo general, la xilosa se presenta en mayor cantidad en la hemicelulosa, seguido por la glucosa, galactosa y en menor cantidad arabinosa, rhamnosa, manosa y ácido urónico (Peng *et al*, 2009).

Se ha reportado que al tratar bagazo de caña de azúcar con solución de hidróxido de sodio entre 1% y el 3%, al separar la fracción líquida de la sólida y precipitarla con alcohol, se encuentra que la xilosa es la composición predominante (79.2- 96.7%), lo que sugiere alta presencia de xilanos, seguido de arabinosa (1.8%- 2.5%), glucosa (0.3%-5.2%) y ácidos urónicos (1.8% - 2.5%), donde se encuentran principalmente ácido 4-O- metil – D- glucorónico y en menores cantidades la galactosa (0% -2.8%), rhamnosa (0% - 0.2%) y manosa (0% – 0,5%). Esto indica que las fracciones de hemicelulosa solubles están formadas por glucorano-arabinoxilanos. La hemicelulosa no soluble que queda adherida a la pared celular del bagazo muestra un contenido de arabinosa de 2.07%, galactosa 0.33%, glucosa (64.98), xilosa (32,56%) y no se detectaron ácidos urónicos. Por otro lado, el contenido de lignina que está unida a la hemicelulosa, puede variar entre 2.24%-7.6%, teniendo como mayor componente la vanilina 26% y el siringilaldehído 43.9% del total de monómeros fenólicos (Peng *et al*, 2009).

1.1.3 Lignina. La lignina es el polímero aromático más abundante en la tierra, se encuentra en la pared celular de las grandes plantas, predominando en el tejido vascular especializado en el transporte de líquidos.

Entre los componentes de la pared celular, la lignina es probablemente el compuesto más recalcitrante sintetizado por las plantas contribuyendo a dar firmeza y fortaleza a las plantas. Un complejo enzimático compuesto por enzimas extracelulares, tales como lacasas y peroxidasas, tienen la capacidad de degradar la lignina y otros compuestos tales como moléculas aromáticas simples (Saparrat *et al*, 2008).

La lignina es altamente resistente a la degradación química y biológica, por lo que le confiere resistencia mecánica a la madera. Alta concentración de este recalcitrante polímero se encuentra en la laminilla media, donde actúa como un cemento entre las fibras de la madera, pero también está presente en las capas de la pared celular (especialmente en la pared celular secundaria), formando conjuntamente con la hemicelulosa una materia amorfa en el cual las fibras de celulosa están embebidas y protegidas contra la biodegradación (Fengel y Wenwger, 1984).

La habilidad de la lignina para resistir la degradación, puede ser atribuida a su diferente estructura polimérica. A diferencia de la celulosa, la lignina no es un polímero lineal de idéntica y repetidas subunidades; está compuesto de diferentes

subunidades o monolignoles. Su abundancia puede variar entre especies vegetales, entre individuos y el tipo de células dentro de un organismo (Ralph *et al*, 2004). Entre los más comunes molignoles se encuentran, el P-Hidroxifenil (H), Guaiacil (G) y Siringil (S) (Hosokawa *et al*, 2001).

El etanol y otros biocombustibles producidos a partir de biomasa lignocelulósica, representan una abundante fuente renovable de energía. Desafortunadamente, la presencia de lignina en las paredes de la planta impide el rompimiento de los polisacáridos en la pared celular a azúcares simples y la subsecuente conversión a biocombustibles. Recientes avances en la composición, estructura de la lignina y la regulación de su polimerización, han revelado nuevas oportunidades para la racional manipulación de la lignina en futura producción de bioenergía. Los enlaces entre los monómeros de la lignina son menos reactivos que la mayoría de los polímeros biológicos y son de suficiente diversidad química para que una sola enzima sea capaz de degradarlas. Debido, a las propiedades de la lignina y su incorporación en la pared celular, los métodos actuales para su eliminación de la biomasa son demasiados costosos, lo que hace que la producción de biocombustible por esa vía sea difícil (Weng *et al*, 2008).

Un material lignocelulósico que puede ser usado para la producción de biocombustible son los residuos de la cosecha de caña de azúcar, el bagazo tiene un contenido de celulosa (45% - 47 %), lignina (22% - 23 %), hemicelulosa (27% - 28%) y otros del 1% (Triana *et al*, 2008). Igualmente, Sun *et al*, 2004, reportó contenidos de hemicelulosa de 35.51%, de celulosa 43.65% y lignina 18.1%.

Otros materiales presentan composiciones diversas dependiendo de su origen por ejemplo: hojas de trigo (Celulosa 36%, lignina 29%, hemicelulosa 28%), mazorca de maíz (celulosa 36%, lignina --%, hemicelulosa 28%), abeto (celulosa 43%, lignina 29%, hemicelulosa 26%), pino (celulosa 44%, lignina 29%, hemicelulosa 26%), abedul (celulosa 40%, lignina 21%, hemicelulosa 39%), álamo (celulosa 51%, lignina 16%, hemicelulosa 29%), papel base (celulosa 43%, lignina 6%, hemicelulosa 13%), (Tsao G. *et al*, 1982; Rydholm 1965; Wenzl, 1970).

1.2 SISTEMAS DE DEGRADACIÓN DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS.

Las etapas que regularmente se siguen en los procesos de obtención de etanol a partir de materiales lignocelulósicos, consisten en (a) relajamiento de los componentes del material lignocelulósico (fibras) para tener acceso a las cadenas de hemicelulosa y celulosa (Pretratamiento), (b) hidrolizado de los polímeros para lograr soluciones de azúcares monoméricos, (c) fermentación de la solución de azúcares a etanol y (d) purificación del etanol.

1.2.1 Pretratamiento del material lignocelulósico. En el esfuerzo para la obtención de celulosa libre de lignina, se pueden utilizar diferentes métodos, entre los que se encuentran pretratamientos con organosolvente (etanol/agua), seguido de un postratamiento con clorito de sodio. Cuando se utiliza el bagazo de caña con un contenido inicial de glucanos de 43.7%, hemicelulosa 23.7% y lignina 28.1%, y que se somete a un pretratamiento con etanol/agua, se logra la siguiente composición: glucanos 55.7%, hemicelulosa 23.7% y lignina 14.6%. Si adicionalmente, se continua con el tratamiento con hipoclorito de sodio, se encuentra una composición final de glucanos 64.6%, hemicelulosa 21.9% y lignina 6.6% (Ruzene *et al*, 2009).

El objetivo del pretratamiento de materiales lignocelulósicos es intentar desorganizar la estructura cristalina de macro y microfibras, para liberar las cadenas poliméricas de celulosa y hemicelulosa, modificar los poros en el material para permitir a las enzimas penetrar dentro de las fibras y hacer más fácil la hidrólisis enzimática (Galbe y Zacchi, 2002). La efectividad de un pretratamiento se mide por su capacidad de degradación o pérdidas de carbohidratos y evitar la formación de productos inhibidores para la subsecuente hidrólisis y fermentación, sin perder de vista los costos que se generan en el proceso (Sun y Cheng, 2002).

Los pretratamientos generalmente han sido clasificados en biológicos, físicos y químicos, o combinación de estos.

- Pretratamientos biológicos. La degradación biológica es realizada principalmente por hongos, los más eficientes son los basidiomicetos de pudrición blanca, pero también ciertos actinomicetos. Los hongos de pudrición blanda, marrón y blanca, típicamente degradan la madera para modificar la composición de la celulosa (Ander y Ericksson, 1977).

La biodegradación de la lignina por estos organismos es un proceso metabólico secundario, que ocurre a bajas concentraciones de nitrógeno como nutriente y requerimientos de fuentes de carbono como celulosa y glucosa. Una enzima extracelular, la lignina peroxidasa (LP), puede degradar lignina en presencia de H_2O_2 . Otras enzimas implicadas en la degradación aeróbica de la lignina incluyen la Manganese peroxidasa (MnP) y la lacasa (monofenil oxidasa). Muchos hongos de pudrición blanca y algunos actinomicetos se han empleado para la producción de enzimas degradadoras de lignina y para deslignificación de materiales lignocelulósicos usando fermentación en estado sólido. Los hongos dominantes para la producción de enzimas degradadoras de lignina son conocidos como *Phanerochaete chrysosporium* y *Phlebia radiata*, los cuales producen peroxidases extracelulares (Lee, 1977).

Rolz *et al*, (1987) investigaron el crecimiento en estado sólido de 20 hongos blancos utilizando como sustrato residuos de caña de azúcar, y obtuvieron que después de 6 semanas, la pérdida de lignina fue semejante para todos los

hongos probados, para un valor promedio de 36.84% del valor original. Semejante cantidad de hemicelulosa fue degradada (32.22%), solamente dos hongos de los estudiados mostraron una gran actividad celulolítica.

Los microorganismos obtenidos del suelo de sistemas boscosos como hongos de los géneros *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*, mineralizaron la lignina molida de hojas de trigo hasta 27.4%, 23.5% y 22,6% respectivamente después de 28 días de incubación en medio líquido (Rodríguez y Sanroman, 2005).

Se han reportado tratamientos de hojas de caña de azúcar con hongos *fungalmycelium*. Las mejores condiciones se obtuvieron a los 15 días con una relación de 250 mg/ kg de hojas, lo que causó una alta descomposición. A una mayor escala se probó la degradación de la lignina (50 g de hojas), que excedió 2.4 veces al tratamiento acetosolvente llevado a 120 C°. Al final, el contenido de lignina fue 7.5% de un contenido inicial de 21% (Saad *et al*, 2008).

En la fermentación en fase sólida con hongos *Pleurotus*, utilizando como sustrato residuos de caña, se evidenciaron diferencias significativas en el contenido de cenizas, fibra, detergente neutro y hemicelulosa, así como la presencia de carbohidratos estructurales, lignina, escaso contenido proteico y alto contenido de fibra bruta. Las mayores degradaciones para el sustrato resultaron a los 60 días de cultivo con un 77% para la hemicelulosa y 75% para la lignina, correspondiendo para la celulosa un 53% y así como un 47% para el balance total de bioconversión del proceso (Ortega *et al*, 2005).

- Pretratamientos físicos. Los tratamientos físicos involucran el rompimiento de la biomasa en pequeñas partículas que son más susceptibles a la hidrólisis enzimática. Los tratamientos físicos de reducción de tamaño con molinos de martillo (Millet *et al* 1979; Mais *et al*, 2002), han mostrado que mejoran los rendimientos en hidrólisis por destrucción de los cristales de celulosa y por incremento de la superficie específica, con la que se entrega un material más accesible para el ataque de la misma. Una de las ventajas del pretratamiento físico, es que tiene una relativa insensibilidad a las características físicas y químicas de la biomasa empleada. Sin embargo, demandan gran consumo energético y no remueven la lignina (Mooney *et al*, 1999; Berlín *et al*, 2006).

Otra variable a tener en cuenta es el contenido de lignina y el tamaño de poro sobre la adsorción de la celulasa e hidrólisis. Mooney, *et al* en 1998 encontraron que las pulpas Douglas-fir refinadas mecánicamente contienen un alto contenido medio de poro, producen un grado alto de hidrólisis dependiendo del contenido inicial de lignina. Lo que sugiere, que existe un impedimento estérico debido a la lignina residual que limita la velocidad de degradación de la celulosa.

La viabilidad de los pretratamientos continuos de la molienda por compresión, para la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos, basados en materias primas como: papel periódico, rastrojos de maíz, álamo y abeto oriental, aumenta significativamente la eficiencia de la hidrólisis enzimática, ajustando la humedad de la materia prima y aumentando la presión del tambor de giro. El mismo efecto sucede con la variación de la velocidad del tambor (Tassinari *et al*, 1982).

- Pretratamientos químicos y fisicoquímicos. Muchos de los pretratamientos químicos que han sido evaluados hasta ahora (típicamente basados en ácidos y bases), buscan reforzar la accesibilidad de la enzima hacia la celulosa por solubilización de la lignina y la hemicelulosa, en un grado más pequeño la disminución del grado de polimerización y la cristalinidad de los componentes celulíticos. Los tratamientos que reducen la cristalinidad de la celulosa incluyen agentes de hinchamientos suaves como el hidróxido de sodio, la hidracina y el amoníaco anhidro; entre los agentes de hinchamiento extremo están el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, entre otras (Wood y Saddler, 1988). Entre los tratamientos fisicoquímicos tenemos: explosión con vapor o autohidrólisis, explosión de la fibra con amonio (AFEX), explosión con CO₂ y SO₂. Entre los procesos de pretratamientos químicos se pueden enumerar: ozonólisis, hidrólisis con ácidos diluidos, hidrólisis alcalina, deslignificación oxidativa y proceso con organosolvente (Taherzadeh y Karimi, 2007).

En el pretratamiento de *Pinus radiata* con organosolventes (acetona- agua), a condiciones de 195 C⁰, 5 minutos, pH 2.0 y a una relación de agua acetona (1/1) para la producción de etanol, resultó una producción de 99.5% de rendimientos a etanol (Araque *et al*, 2008). Pulpas de bagazo de caña tratadas con organosolventes (etanol/agua y acetosol), fueron tratadas con *Humicola grisae* var. *Thermoidea*, y comparada con la xilanas cartazyme HS. Las pulpas tratadas con *H. grisae* presentaron una reducción del 23% del número de kappa para un tratamiento entre cuatro y ocho horas. El tratamiento con cartazyme HS, resultó en una reducción entre 55% y 44% para cuatro y ocho horas en el número de kappa (Moriya *et al*, 2005).

En la identificación de las condiciones óptimas en el proceso de explosión de vapor de bagazo de caña de azúcar se reportan rangos de temperatura de operación entre 188 y 243 °C y tiempos de residencia entre 0.5 a 44 min, en un reactor por cochadas de 10 litros. En las muestras de bagazo tratadas se observó una recuperación entre 78% y 99% de la masa inicial de materia prima. Igualmente, las pérdidas de agua debido a la extracción variaron desde el 9% al 28%, el contenido de furfural en el agua extraída fue mayor para condiciones altas de temperatura. También se determinó, que la conversión de glucosa en la hidrólisis estuvo entre 41% y 67%, presentando un máximo a 216 C⁰, la conversión a xilosa se ubicó entre el 17% y 25%, y se aumenta a condiciones de baja temperatura (Kaar *et al*, 1998).

Muchas estrategias se han desarrollado para reducir el problema de la lignina en maderas blandas que puedan proveer un medio para el mejoramiento de otros sustratos lignocelulósicos. La madera blanda es considerada una de las materias primas con mayor resistencia a la producción de azúcares para la fermentación. El grupo de productos biotecnológicos de la Universidad de Columbia ha estado desarrollando procesos para la producción de alcohol a partir de maderas blandas utilizando explosión de vapor catalizado con SO₂ y pretratamiento organosolvente con etanol. La lignina obtenida por la explosión es baja comparada con el alto valor obtenida por organosolvente (Mabee. *et al*, 2006).

Tratamientos con lacasa obtenida desde *Coriolopsis rígida* y *Trametes villosa*, de hojas pretratadas de trigo por explosión de vapor a 190 °C por 10 minutos y 12 bar de presión, bajo condiciones suaves (impregnación con agua) o condiciones severas (impregnación con ácido sulfúrico diluido al 1% p/p), mostraron que bajo condiciones severas, la explosión de vapor tiene mucha influencia en la eficiencia de desintoxicación de fenoles. Se produce una reducción del efecto tóxico de los compuestos fenólicos por tratamiento con lacasa de estos materiales, debido a la polimerización de fenoles libres. La lacasa remueve 70% de los compuestos fenólicos bajo condiciones suaves y el 75% cuando es tratado con ácido sulfúrico. Estos resultados muestran una reducción de inhibidores de la fermentación, debido a que se produce un aumento en la producción de etanol, 2.7 veces para condiciones suaves y 2.0 para tratamientos con ácido (Jurado *et al*, 2009).

1.2.2 Degradación de la lignocelulosa. Los celulosomas son complejos enzimáticos que actúan sinérgicamente para catalizar la hidrólisis de la celulosa, están formados esencialmente por varios tipos de celulasas que están soportadas en una unidad estructural. Los celulosomas se encuentran unidos entre sí formando policelulosomas, que se observan como una protuberancia en la superficie celular de las bacterias celulíticas. El celulosoma se ha descrito como uno de los sistemas enzimáticos más complejos. Está constituido por múltiples cadenas de polipéptidos cuyo número varía de un microorganismo a otro e incluso difiere entre cepas.

Las enzimas celulosomales son muy parecidas a las células libres degradadoras de material lignocelulósico. Ambas, contienen dominios catalíticos muy parecidos. La principal diferencia estriba en que las células celulosomales tienen un dominio de anclaje, el cual ayuda a la integración de la enzima dentro del complejo celusómico, mientras que las libres no (Santoyo *et al*, 1999).

El primer estudio sistemático sobre enzimas celulosómicas tuvo como objetivo resolver el problema de la descomposición de materiales basados en la celulosa en condiciones tropicales. Más tarde, se pensó en el potencial de la celulosa en la

producción de azúcares fermentables. A través de la historia, se observó que algunos microorganismos podían degradar celulosa nativa, mientras que otros solo podían degradar derivados de celulosa soluble, lo que llevó a la conclusión que existían dos categorías de enzimas celulolíticas: C1 y Cx. El componente C1 se sugirió que es producido únicamente por organismos celulíticos y que no tenían actividad catalítica y de separación de las cadenas o uniones que forman la celulosa. Sin embargo, intentos por purificar un factor con las propiedades asignadas a C1 ha sido frustrante, lo que llevó al aislamiento de enzimas hidrolíticas que producían mucha celobiosa a partir de celulosa nativa, pero que no tenían actividad sobre celulosa soluble. Estas enzimas se llaman β - 1-4 D glucan celobiohidrolasas y actúan sinérgicamente con enzimas Cx produciendo una endo/exo cooperación.

Es ampliamente aceptado que el mecanismo de la hidrólisis enzimática de la celulosa involucra la acción sinérgica de endoglucanasas, exoglucanasas o celobiohidrolasas y β - glucosidasas. En bacterias estas enzimas son a menudo producidas en pequeñas cantidades (menor que 0.1 g/L). En el caso *Clostridium thermocellum* forman un ajustado complejo multienzimático, el cual es difícil de organizar sin las pérdidas de sus componentes individuales. Las celulasas fúngicas están disponibles en grandes cantidades (más de 20 g/L), y no parecen formar complejos físicos entre sí, por esta razón la pureza de las enzimas es importante para el esclarecimiento de la actividad enzimática, ya que trazas de otro tipo de actividad pueden sesgar los resultados (Henrissat, 1994; Knowles. et al , 1987; Teeri 1997; Zhang y Lynd, 2003).

Las enzimas deslignificantes producidas por hongos basidiomicetos tienen la habilidad de degradar o modificar la lignina (Zabel y Morrel 1992). Las enzimas oxidativas extracelulares (oxireductasas tales como lignina peroxidasa (LiP), Manganese peroxidasa (MnP), lacasa o monofenil oxidasa (Lac) y oxidasas productoras de H_2O_2 , secretadas por hongos están involucradas en los componentes de la pared celular. La enzima LiP, en presencia de H_2O_2 , puede degradar la lignina por el rompimiento oxidativo de la estructura C-C, oxidación e hidroxilación de grupos metilen benzílicos etc. La MnP oxida Mn^{+2} a Mn^{+3} , actúa como un par redox, que oxida sustratos fenólicos a radicales fenoxi. Al igual que la lacasa, no producen reacciones posteriores para la generación de productos posteriores. La actividad de MnP y LiP se incrementa por el uso de alcohol veratrílico mientras que la lacasa, mejora su actividad en presencia de alcohol benzílico y ácido verátrico (Lee, 1997).

La lacasa es una enzima que cataliza la oxidación de compuestos aromáticos, específicamente fenoles y anilina, mientras que simultáneamente reducen el oxígeno molecular del agua. Las lacasas se originan de hongos, la existencia de esta enzima fue demostrada por Yoshida (1883), presentándose en más de 60 cepas de hongos pertenecientes a diversas clases, en diferentes plantas superiores. La molécula de lacasa, como una forma de holoenzima activa, es una

glucoproteína dimérica o tetramérica que por lo general contiene cuatro átomos de cobre por monómero, enlazados a tres sitios redox, permite la oxidación directa solamente de unidades ligno fenólicas, el cual comprende un 10% de todo el polímero. El interés de la lacasa para aplicaciones biotecnológicas se ha incrementado con el descubrimiento de la habilidad de oxidar sustratos de alto potencial redox en presencia de mediadores sintéticos (Bourbonnais y Paice, 1990; Gianfreda *et al*, 1999)

La lacasa es una fenoloxidasa que tiene bajo potencial redox, que permite la oxidación directa solamente de unidades ligno fenólicas, el cual comprende un 10% de todo el polímero. El interés de la lacasa para aplicaciones biotecnológicas se ha incrementado con el descubrimiento de la habilidad de oxidar sustratos de alto potencial redox en presencia de mediadores sintéticos (Bourbonnais y Paice, 1990).

Además, las lacasas y las peroxidasas lignolíticas (LiP y MnP) que son producidas por hongos de podredumbre blanca oxidan el polímero de la lignina, lo que genera radicales aromáticos que actúan sobre reacciones no enzimáticas, incluyendo rupturas C-4 éter, en la división de anillos aromáticos, en rupturas C α -C β , en demetoxilación, liberación de aldehídos aromáticos C α - C β por ruptura de la lignina, producen sustratos para generación de H₂O₂ por la reacción cíclica redox aril alcohol oxidasa (AAO) en la que también participa la aril alcohol deshidrogenasa (AAD) y radicales fenoxi producidos del rompimiento C-4 éter. En la repolimerización de lignina, los compuestos fenólicos formados pueden ser reoxidados por lacasa y peroxidasas los radicales fenoxi están sujetos a rompimiento de C α -C β , y producción de P- quinonas (Sánchez, 2008).

Las hemicelulosas son polímeros más heterogéneos y diferentes enzimas son necesarias para su degradación. Para el rompimiento de los componentes principales de la hemicelulosa (mannanos, xilanos, arabinanos, galactanos), se necesitan enzimas como: mannanasa y xilanasas de las cuales la β - xilosidasas degradan los xilo- oligosacáridos, la α - arabinosidasa y la α - galactosidasa liberan moléculas de arabinosa y galactosa, mientras acetil xilan esterasa (AXE) rompe los grupos acetil desde unidades de xilanos, la α - glucoronidasa, separa principalmente el ácido urónico a partir de (arabino) glucoronoxilanos y la α - arabinofuronosidasa, arabinosa de arabino (glucorano) xilanos (Margolles-Clark, *et al*, 1997; Kubicek y Penttilä 1998; Juha'sz *et al*, 2005). Muchas especies comerciales de celulasas son producidas por especies de *Trichoderma* y especies de *Aspergillus* (Cherry y Fidantsef, 2003).

Las endoglucanasas hidrolizan enlaces intramoleculares β -1-4 glucosídicos de las cadenas de celulosa, para producir nuevas cadenas terminales; las exoglucanasas rompen progresivamente las cadenas finales de celulosa, liberando celobiosa soluble o glucosa; y la β - glucosidasa hidroliza la celobiosa a glucosa. Para eliminar la inhibición por celobiosa, los tres procesos de hidrólisis

se deben producir simultáneamente. La primera hidrólisis ocurre sobre la superficie del sólido liberando azúcares solubles con un grado de polimerización (DP) por encima de 6. El paso de depolimerización enzimática ejecutado por la endogluconasa y exogluconasa, es la velocidad limitante en todo el proceso de hidrólisis. La hidrólisis secundaria que ocurre en fase líquida involucra la hidrólisis de la celobiosa a glucosa por β -glucosidasa que también hidroliza algunas ciclodextrinas (Zhang y Lynd, 2004).

Compañías como Genecor International y Novozymes Biotech, han reportado desarrollos de tecnologías que han reducido los costos de celulasas desde 4.5 dólares por galón de etanol a 20 centavos por galón de etanol (Morreira, 2005). Dos estrategias fueron tenidas en cuenta. La primera, tiene en cuenta un mejoramiento en la producción de celulasas al reducir los costos por gramo de enzima en el proceso y en las mejoras de cepas, y una segunda en mejorar el desempeño, al reducir los gramos de enzima necesario para la hidrólisis. El desarrollo de mezclas de celulasas extraídas de diferentes especies, han generado nuevas actividades para el avance de la hidrólisis de materiales lignocelulósicos (Knauf and Moiruzzaman, 2004). La reconstitución de mezclas activas de celulasas (una endoglucanasa y dos celobiohidrolasas), obtenidas de *Ácidothermus cellulolyticus*, *Trichoderma reesei*, *Thermomonospora fusca*, y *Thermotoga neapolitana* sobre sustratos insolubles, ha mejorado la velocidad de hidrólisis o la alta digestibilidad de la celulosa (Baker et al, 1998).

Las complejas interacciones entre endogluconasas, exogluconasas y los cambios en las características de los sustratos durante la hidrólisis han sido simuladas, los modelos sugieren que es prácticamente imposible predecir el desarrollo de la hidrólisis de mezclas de celulasas de un sustrato sólido a otro, debido a la diferencia en concentración de celulosa, razón de endo/exocelulasas y características del sustrato. Sin embargo, las recombinaciones de enzimas pueden ser hechas para mejorar su desarrollo en un sustrato específico (Knauf y Moniruzzaman, 2004; Zhand y Lynd, 2004).

Los diferentes métodos para la determinación de la actividad enzimática de las diferentes enzimas usadas en la hidrólisis de materiales lignocelulósicos se muestran en el anexo A.

1.2.3 Hidrólisis de la celulosa. Varios factores afectan la hidrólisis de la celulosa, la presencia de materiales extraños tales como lignina y hemicelulosa impiden la acción de las celulasas (Mansfield et al, 1999). Los pretratamientos (físicoquímicos, biológicos, o combinaciones), han recibido atención debido a su disponibilidad de producir sustancias inhibitoras de la hidrólisis de la biomasa celulósica. Por eso, es importante determinar cuál de las características de los sustratos limita la hidrólisis y que método de pretratamiento lo maximiza.

La hidrólisis enzimática de la celulosa, se lleva a cabo a condiciones de pH entre 4.5 y 5.0 y rangos de temperatura de 40 a 50 °C. En la hidrólisis enzimática de la celulosa hay adsorción de la celulasa sobre la superficie de la celulosa, produciendo la biodegradación de la celulosa a azúcares simples y la desorción de la celulasa. La degradación enzimática de la celulosa a glucosa, está acompañada por la acción sinérgica de tres enzimas: endo- glucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas (Wyman, 1996).

Especificar un método que permita cuantificar cada una de estas enzimas cuando están presentes simultáneamente en una mezcla, ha sido un problema a resolver. El método de actividad enzimática no permite distinguir entre endo y exo glucanasas, para lo que es necesario el uso de un sustrato específico como por ejemplo carboximetil celulosa; en estos casos los resultados pueden estar afectados por la presencia de actividad de las celobiohidrolasas. Hasta el momento, no se ha encontrado un sustrato que permita la determinación específica de la actividad de las celobiohidrolasas. Sustratos sintéticos cromogénicos como el p - nitrofenol β -D glucosida, la celobiosa o la celotriosa han sido usadas para medir la actividad de las celobiohidrolasas en presencia de actividad endoglucanasa. Sin embargo, estos sustratos también son hidrolizados en cierta medida por la β -glucosidasa, β - galactosidasa, algunas endoglucanasas y endoxilanasas. Actualmente, se sigue trabajando en métodos mucho más delimitados que permitan la separación y cuantificación de celulosas y hemicelulosas, como la electroforesis de capilaridad (Jorgensen *et al*, 2003)

Es conocido que la naturaleza física y química del material lignocelulósico, influyen de manera compleja sobre el sistema de enzimas usado para romper los componentes del sustrato en monosacáridos fermentables. Típicamente, después de una rápida fase inicial, la velocidad de hidrólisis decrece rápidamente durante el proceso de sacarificación, que resulta en una baja producción de glucosa y largos tiempos de proceso, debido, en muchos casos a la acumulación de material recalcitrante que genera una hidrólisis incompleta del sustrato. Entre los factores que pueden afectar la hidrólisis, se encuentran: la presencia de lignina y hemicelulosa que impiden la acción de las celulasas, la cristalinidad de la celulosa y el grado de polimerización (DP). La lignina y el tipo de lignina tienen un efecto significativo sobre la hidrólisis de varios sustratos celulósicos, actuando como una barrera física, restringiendo el acceso de la celulasa a la celulosa, y como un atrayente de las celulasas, produciendo enlaces no productivos (Chandra *et al*, 2007; Mansfield *et al*, 1977).

Se ha planteado que el incremento de los grupos fenólicos de la lignina y la hidrofobicidad, son responsables de la inhibición de celulasas. Las interacciones hidrofóbicas de enlaces no productivos de celulasas y lignina evidencian el papel que desempeñan en la velocidad de hidrólisis. Se ha mostrado que la adición de surfactantes como Tween a la hidrólisis celulolítica mejora su rendimiento. Similarmente, la adición de agentes como BSA (Suero fetal bovino), gelatina y

PEG (polietilen glicol), también reducen la inhibición de celulasas causada por lignina (Kim *et al*, 2001; Cullis *et al*, 2004).

El efecto del contenido de hemicelulosa sobre el alcance y la velocidad de hidrólisis de materiales lignocelulósicos, es de menor intensidad que el de la lignina. Sin embargo, se acepta que, similarmente a la lignina, la hemicelulosa actúa como una barrera dentro de la matriz lignocelulósica restringiendo el acceso de las celulasas a la celulosa. La digestibilidad de la hemicelulosa va acompañada de la producción de inhibidores para la fermentación. El papel de la β -glucosidasa es una ayuda para disminuir la inhibición del producto final. Presumiblemente, la xilanasas mejora la hidrólisis de la celulosa por remoción de la hemicelulosa de la celulosa en la superficie de la fibra (Heitz *et al*, 1987; Berlin *et al*, 2006).

La inhibición de la actividad de la celulasa puede presentarse también por acumulación de azúcares, principalmente por celobiosa y glucosa. A concentraciones de celobiosa alrededor de 6 g/L, la actividad de la celulasa se reduce en un 60%. La glucosa a niveles de concentración de 3 g/L, produce inhibición en la β -glucosidasa, reduciendo su actividad en un 75% (Philippidis y Smith 1995; Philippidis *et al*, 1993).

En los hidrolizados lignocelulósicos se pueden encontrar una variedad de compuestos que puede inhibir la fermentación, estos se pueden dividir en diferentes grupos que dependen de la materia prima, de los procedimientos de la prehidrólisis e hidrólisis y del proceso de recirculación. Entre estos compuestos se hallan el ácido acético, productos de la degradación de azúcares (furfural, 5-hidroximetil furfural), productos de la degradación de la lignina (cinamaldehído, p – hidroxibenzaldehído, siringaldehído), productos de la fermentación (acetaldehído, etanol, ácido fórmico, ácido láctico) y remanentes tales como cromo, cobre, hierro, níquel (Olson y Hahn – Hagerdal, 1996).

El ácido acético en concentraciones de 1.4 a 4.3 g/L inhibe el crecimiento de la *Saccharomyce cerevisae* en un 50% dependiendo del pH (Van Zyl *et al*, 1991). Igualmente el ácido acético en concentraciones de 8 g/L, inhibe el crecimiento de la *Pichia stipitis* entre 25 y 98% dependiendo del pH (Martin *et al*, 1992). Concentraciones de furfural de 1 g/L o de 3 g/L hidrometil furfural inhiben el crecimiento de la *P.stipitis* hasta un 47% y 69% respectivamente. Concentraciones de acetaldehído de 5 g/L o concentraciones del 38 g/L de ácido láctico inhiben el crecimiento de la *S. cerevisae* en un 80% (Brown *et al*, 1981). Concentraciones de etanol de 120 g/L inhiben el crecimiento de la *S. cerevisae* en un 100% (Watson *et al*, 1984).

1.3 MODELOS CINÉTICOS PARA HIDRÓLISIS DE CELULOSA.

La hidrólisis de la celulosa, debido a su naturaleza heterogénea, involucra más pasos que las cinéticas clásicas de enzimas convencionales, entre los que se encuentran: a.) Adsorción de celulasas sobre el sustrato a través del dominio de uniones o enlaces b.) Localización de un enlace susceptible a hidrolizar sobre la superficie del sustrato c.) Formación del complejo enzima sustrato d.) Hidrólisis de los enlaces β - glucosídicos y simultáneo deslizamiento de la enzima a lo largo de la cadena de celulosa e.) Desorción de celulasas desde el sustrato f.) Hidrólisis de celobiosa a glucosa por β - glucosidasa, si está presente en la mezcla de enzima. Diferentes modelos empíricos han ayudado a la cuantificación de los efectos de la hidrólisis, y han sido generalmente usados para correlacionar la hidrólisis con las propiedades estructurales del sustrato con el tiempo. Los modelos empíricos no son aplicados a condiciones diferentes a las que fueron desarrollados en su investigación, y no pueden proveer el mecanismo detallado del proceso o reacción (Bansal *et al*, 2009).

1.3.1 Descripción de modelos cinéticos. Se han referenciado muchos modelos de hidrólisis de materiales lignocelulósicos. Una expresión simple y empírica de la velocidad de hidrólisis de la celulosa pura (avicel), la cual se llevó a cabo en reactor por lotes a 50 C° y pH 4.8, utilizando celulasa de *Trichoderma viride*. Ohmine *et al*, (1983), mostraron los efectos de la cristalinidad, la inhibición por productos (celobiosa, glucosa) y la desactivación térmica sobre la hidrólisis. También, encontraron que el efecto de la cristalinidad expresada como cristalinidad relativa (CrI) sobre la velocidad de hidrólisis, obedece al modelo de Michaelis - Menten. Determinaron que la velocidad máxima (V_m) varía con CrI, de acuerdo con la Ecuación 1, con valores entre 27.9 y 15.1 mM/h, mientras que los valores de K_m permanecen constantes alrededor de 154 mM.

$$V_m = -40.5 CrI + 53.2 \quad (1)$$

El efecto de la inhibición por celobiosa se basó en un modelo de inhibición competitiva (Ecuación 2). Donde V_m (mM/h) = 27.9, K_m (mM) = 154 y K_{ic} (mM) = 11.4.

$$v = \frac{V_m S}{K_m \left(1 + \frac{C}{K_{ic}}\right) + S} \quad (2)$$

Además, la velocidad de hidrólisis de celulosa presenta el siguiente modelo cinético (Ecuación 3).

$$v = \frac{V_{mc}C}{[K_{mc}(1+G/K_{IG})+C]} \quad (3)$$

En donde: K_{mc} =2.35 mM, V_{mc} = 9.30 mM/h y K_{IG} = 0.63 mM., S= concentración de sustrato, C= concentración de celobiosa y G= concentración de glucosa.

El modelo cinético de una exoglucanasa obtenida desde *Trichoderma resei* fue investigada en presencia de celobiosa y 24 diferentes relaciones enzima/avicel por 47 horas a 40 °C y un pH de 4.8, en orden a establecer cuál de las ocho modelos cinéticos (modelos sin inhibición, modelo de inhibición mezclada con inhibición parabólica, modelo de inhibición mezclada con inhibición por sustrato, modelo de inhibición mezclada, modelo de inhibición competitiva, modelo de inhibición no competitiva y modelo de inhibición incompetitiva), se ajustaba mejor a los resultados experimentales. Los modelos expuestos están incluidos en la Ecuación 4, la cual representa un modelo de inhibición lineal (total) con inhibición de sustrato y parabólica (Bezerra y Diaz, 2004).

$$v = \frac{V_m S_o}{K_m \left[\left(1 + \frac{S_o}{K_{is}} \right) + \frac{P}{K_{ic}} \left(1 + \frac{P}{K_{ip}} \right) + S_o \left(1 + \frac{P}{K_{iu}} \right) \right]} \quad (4)$$

Donde

V_m = velocidad máxima

S= Concentración de sustrato

Índice (0)= concentraciones iniciales

P= concentración de producto (celobiosa)

K_m , K_{is} , K_{iu} , K_{ip} son constantes cinéticas

La integración de la Ecuación 4, manteniendo constante la concentración del sustrato, es representada por la Ecuación 5.

$$t = \frac{1}{V} \left\{ \left(\frac{K_m}{S_o} + \frac{K_m}{K_{is}} + 1 \right) (P_t - P_o) + \left(\frac{K_m}{S_o K_{ic}} + \frac{1}{K_{iu}} \right) \frac{1}{2} (P_t^2 - P_o^2) + \left(\frac{K_m}{K_{ic} K_{ip} S_o} \right) \frac{1}{3} (P_t^3 - P_o^3) \right\} \quad (5)$$

Donde, P_t es la concentración de producto en cualquier instante.

La relación entre los datos experimentales y el modelo propuesto (Ecuación 4), usando una regresión validada con mínimos cuadrados no lineales en la reacción

catalítica heterogénea estudiada, mostró que la hidrólisis de la celulosa toma en cuenta el modelo de inhibición competitiva por celobiosa $K_m = 3.8 \text{ mM}$; $K_{ic} = 0.041 \text{ mM}$; $K_{cat} = 2 \text{ h}^{-1}$. Los otros modelos como son: la inhibición tipo mixto, la incorporación de las mejoras relativas a la inhibición por sustrato y la inhibición parabólica incrementan muy poco la modulación del rendimiento. Los resultados soportan la hipótesis que los complejos enzima sustrato no productivo, la inhibición parabólica y la inactivación de la enzima no son las restricciones principales en la hidrólisis enzimática de la celulosa (Bezerra y Días, 2004).

También, la cinética de la hidrólisis enzimática de la celulosa está significativamente afectada por las características estructurales de la celulosa, como la cristalinidad y el área superficial. En un estudio realizado por Lee y Fan (1982), para la hidrólisis enzimática de celulosa pura insoluble, usando enzimas producidas por cultivos purificados de *Trichoderma reesei* (endo- β -1,4 glucanasa, β -1,4 glucan glucohidrolasas, β -1,4 glucan celobiohidrolasas y β -glucosidasa) estudiaron los cambios en la velocidad de hidrólisis y el grado de adsorción de proteínas durante el avance de la reacción. La velocidad de hidrólisis se redujo durante las primeras horas de reacción, debido a la transformación de la celulosa a una forma menos digestible y productos de inhibición. La transformación estructural puede ser explicada parcialmente por los cambios en el índice de cristalinidad y el área superficial. La inhibición por producto fue causada por la desactivación de la proteína soluble adsorbida por el producto, lo que se puede representar por una inhibición competitiva. Los resultados mostraron que la inhibición de la β -glucosidasa es producida por una inhibición competitiva por la glucosa.

El complejo enzimático obtenido de la *Trichoderma* en esta investigación, exhibió una actividad de papel filtro de 1,3 UI/ml, una actividad de CMC 14.8 UI/ml y una actividad de β glucosidasa de 0.072 UI/ml. Los sustratos usados fueron solka floc® (celulosa en polvo) y pulpa molida blanqueada con sulfito como fuente de celulosa. Asimismo, celobiosa (Sigma Co) fue usada como sustrato en el estudio de la cinética de la β -glucosidasa. La reacción se llevo a cabo a una temperatura de 50 °C, pH 4.8, 250 rpm y concentración de celulosa del 5%. En este estudio concluyeron lo siguiente:

- La concentración de azúcares reductores aumenta en los periodos iniciales de la reacción, pero en periodos posteriores se reduce. La hidrólisis también cesa cuando una cantidad sustancial de celulosa residual o no degradada permanece en solución. La reducción de la velocidad de hidrólisis no es debido a la fuga del sustrato. Otras posibles causas, es la transformación de la celulosa a formas más resistentes a los ataques enzimáticos.
- La reducción de la velocidad de hidrólisis de la celulosa, puede ser causada principalmente por dos factores. El primero es debido la

transformación de la celulosa a otra forma menos digerible, que se puede explicar por los cambios en el índice de cristalinidad y en el área superficial. El otro factor es la forma inhibitoria de los productos solubles sobre la acción de las enzimas, entre los que se encuentran la celobiosa y la glucosa, siendo la celobiosa mucho más inhibidora que la glucosa.

- Las moléculas de enzima están estrechamente ligadas a las partículas de celulosa para dar lugar a quimisorción; la enzima que inicialmente es adsorbida por la celulosa, es la principal responsable de la digestión de la misma. Un posible mecanismo de inhibición es producido por la desactivación de la enzima adsorbida (complejo ES) por los productos "inhibición incompetitiva". La desactivación de la enzima adsorbida (complejo ES) está ligada a la linealidad de la glucosa y la concentración hiperbólica de la celobiosa.

Fujii *et al* (1991) propusieron un modelo cinético que represente la acción sinérgica de los tres componentes de la celulasa sobre la hidrólisis de partículas de celulosa. El modelo consiste de tres ecuaciones diferenciales simultáneas que representan independientemente la acción de la endoenzima, la acción de la exoenzima y una tercera que representa la acción de la β - glucosidasa como se muestra en las Ecuaciones 6, 7 y 8:

$$dC/dt = (V_m S)/[K_m((1 + C/K_{i1}) + S_o)] \quad (6)$$

$$dS/dt = K_{en} E_{en} [1 - (C/(C + K_{i2}))] \quad (7)$$

$$dG/dt = (K_{mb} C)/[K_{mb} (1 + G/K_{ib}) + C] \quad (8)$$

Donde

C= concentración de celobiosa, S= concentración de sustrato, G= concentración de glucosa, K_m = constante de Michaelis de celobiosa = 45.15 mg/ml, K_{i1} = constante de inicio de celobiosa = 8×10^{-8} mol/ml, K_{en} = constante de reacción de exogluconasa = 995 mol/ml, E_{en} = concentración de exogluconasa U/l, K_{i2} = constante de inhibición de celobiosa para exogluconasa= 2.65×10^{-9} mol/ml, K_{ib} = constante de inhibición de la glucosa= 2.69×10^{-7} , K_{mb} = constante de Michaelis para β - glucosidasa= $6,65 \times 10^{-7}$ mol/ml, V_m = velocidad máxima = $9,91 \times 10^{-8}$ mol/ml.min

Estos modelos cinéticos fueron construidos bajo las siguientes primisas:

- Ambas glucanasas, endo β -1-4 glucanasa (EG) y la celobiohidrolasa (exo β -1-4 glucanasa), CBH, actúan solamente sobre la superficie del sólido.

- La CBH actúa sobre los extremos no reducidos del sustrato expuesto en la superficie sólida para formar celobiosa.
- En el caso en el cual la CBH está presente, la concentración de sustrato durante la reacción permanece constante, porque cuando una molécula de celobiosa es removida por la CBH, un nuevo grupo extremo no reductor es formado al mismo tiempo. Sin embargo, la reacción demora poco tiempo, y más bien parece detenerse, después que los grupos de extremo no reductor en la superficie están agotados, existen muchos menos grupos extremos expuestos en la segunda capa de la partícula de sustrato.
- La acción de la EG (β -glucosidasa) aparentemente no obedece al mecanismo de Michaelis, cuando la curva de progreso de la reacción es medida en términos de la formación de azúcares solubles. Muchos de los nuevos productos generados en la reacción con extremos no reductores permanecen en la superficie de la partícula. Una pequeña cantidad de azúcares solubles podría salir de la superficie de la partícula, pero su cantidad puede ser ignorada.
- En un sistema de mezcla de enzima EG y CBH, se puede observar un sinergismo parcial. La acción de CBH se debe a la acción de raspado de la molécula sobre la primera capa de la partícula. La próxima acción actúa sobre los nuevos enlaces glucosídicos que se encuentran encima de la próxima capa, los cuales pueden estar sujetos al ataque de la enzima EG. La acción de EG sobre la segunda capa suministra nuevos grupos extremos no reductores para la acción de la enzima CBH.
- El número de enlaces glucosídicos de las moléculas sobre la superficie de las partículas de sustrato es tan grande que se puede asumir que la velocidad de reacción de la EG es independiente de la concentración de sustrato.

La solución de estas tres ecuaciones expresa el sinergismo entre las tres enzimas. Los resultados experimentales se ajustan a los datos teóricos, tanto cuando se usan los modelos para endogluconasa y exoglucanasas, como para cuando se utilizan las tres enzimas.

Peri *et al*, (2007), estudiaron una aproximación de etapas múltiples para investigar la cinética intrínseca del complejo enzima celulasa sobre la hidrólisis de celulosa no cristalina (NCC). En la primera etapa, construyeron un modelo de velocidad inicial, en donde la inhibición por producto no es importante. Realizaron la evaluación de las curvas de progreso de la reacción usando datos obtenidos de la hidrólisis de NCC y α -celulosa. Los autores, también evaluaron el efecto de las reacciones intermedias y productos, sobre la cinética intrínseca de la hidrólisis enzimática que usó como sustrato NCC. En la etapa final, un mecanismo de la

cinética intrínseca fue propuesto. Desarrollaron los experimentos en sistemas por lotes, midiendo durante el transcurso de la reacción las concentraciones de celulosa, oligosacáridos (COS), celobiosa y glucosa, los cuales usaron para determinar los parámetros cinéticos. Para simplificar el mecanismo y derivar el modelo cinético asumieron los siguientes antecedentes.

- El sistema de celulasa (E), compuesto por endoglucanasa (E1), exoglucanasa (E2) y betaglucosidasa (E3) tienen una composición constante. Cada enzima individualmente puede ser inhibida por reacciones intermedias o productos.
- Los azúcares reductores inhiben la enzima en una forma reversible, competitiva y no competitiva.
- La adsorción de la enzima a la superficie del sustrato es reversible y obedece a una isoterma de adsorción tipo Langmuir.
- La resistencia ofrecida por la cristalinidad y la variación en la composición con respecto al grado de hidrólisis fueron despreciadas
- El tiempo para la hidrólisis es mucho mayor que el tiempo para la difusión del sustrato, por lo que la resistencia a la transferencia de masa se despreció.
- Las enzimas E1 y E2 estaban sujetas a inhibición no competitiva de oligosacaridos solubles: celobiosa y glucosa.
- La enzima E3 solamente es inhibida por glucosa en una inhibición competitiva.

Finalmente, los modelos reportados por Peri *et al* (2007) se describen por las Ecuaciones 9 a 13.

$$r_1 = \frac{k_1 C E}{(K_c + C) \left(1 + \frac{B}{K_{B1}} + \frac{O}{K_{O1}} + \frac{G^3}{K_{G1n}^3} \right) (E + K_E)} \quad (9)$$

$$r_2 = \frac{K_2 B E}{\left(K_B \left(1 + \frac{G}{K_{G1}} \right) + B \right) (E + K_E)} \quad (10)$$

$$r_3 = \frac{k_3 CE}{(K_c + C) \left(1 + \frac{B}{K_{BI}} + \frac{O}{K_{OI}} + \frac{G^3}{K_{GI}^3} \right) (E + K_E)} \quad (11)$$

$$r_1 = \frac{K_4 OE}{\left(K_O \left(1 + \frac{G}{K_{GI}} \right) + O \right) (E + K_E)} \quad (12)$$

$$\frac{dC}{dt} = -r_1 - r_3 \quad \frac{dO}{dt} = r_3 - r_4 \quad \frac{dB}{dt} = r_1 - r_2 \quad \frac{dG}{dt} = r_2 - r_4 \quad (13)$$

Donde: K_i ($i=1,2,3,4$) constantes de velocidad de reacción g/g.min (38.29, 32.92, 20.62, 14.84); K_C, K_B, K_O constantes de saturación g/L, celulosa, celobiosa y oligosacáridos (9.35, 13.40, 14.28); K_{BI}, K_{OI}, K_{GI} son constantes de inhibición de celobiosa, oligosacáridos, glucosa g/L (8.69, 5.20, 0.08); K_E constante de desorción para celulasas g/L (0.04) y C, O, B y G g/L concentraciones de celulosa, oligosacáridos, celobiosa y glucosa, E concentración de enzima.

Movagarnjad *et al*, (2000), desarrollaron un modelo para la velocidad de hidrólisis enzimática de desechos celulósicos de papel usado, desechos obtenidos del procesamiento del arroz y aserrín. Los experimentos fueron conducidos en un reactor por lotes a 50 °C y pH de 4.8. El modelo desarrollado tomó en cuenta parámetros de proceso, tales como, tamaño de la partícula de sustrato, relación enzima/sustrato, contenido de celulosa, contracción de la partícula durante la reacción, bloqueo de sitios activos por lignina y inhibición por producto.

El modelo propuesto por Movagarnjad *et al* (2003) es importante, porque relaciona el efecto del contenido de lignina sobre la velocidad de hidrólisis de biomasa, ya que mide la contracción de la masa celulósica durante la reacción, mientras que el material no celulósico permanece constante. Además, asume que la celulosa y el material no celulósico del sustrato están distribuidos al azar en la partícula. Las cadenas celulósicas se encuentran embebidas en una matriz de celulosa y el material no celulósico (lignina) actúa como una barrera a la actividad de la enzima. Entonces, la fracción de superficie externa de la partícula es bloqueada disminuyendo la acción de la enzima a medida que la reacción transcurre.

Es conocida la relación inversa entre el contenido de lignina de un material y la velocidad de hidrólisis de biomasa lignocelulósica. La acción de la lignina se relaciona con enlaces no productivos entre la lignina y la celulasas. Se ha mostrado que la adición de un complejo de celulasas fresca después del 75% de conversión del material lignocelulósico, recupera la velocidad de hidrólisis. A sí mismo, que la unión débil enzima – lignina depende del origen de la endoglucanasa, lo que

quiere decir que dependiendo de la procedencia de la endoglucanasa, esta presentará diferentes afinidades por la lignina (Berlin *et al*, 2005).

Muchos esfuerzos han estado dirigidos al uso de material celulósico en la producción de energía por conversión a azúcares fermentables. Los pretratamientos han mostrado que incrementan la velocidad y el alcance de la hidrólisis de sustratos de celulosa (Eklund *et al*, 1995). En la hidrólisis de materiales celulósicos, se muestra una marcada caída en la velocidad de hidrólisis durante el desarrollo de la reacción, por lo que requieren grandes cantidades de enzimas para alcanzar una conversión eficiente de la celulosa. La dramática caída de la velocidad de hidrólisis ha sido observada en diferentes estudios usando mezclas de enzimas comerciales, o bien enzimas purificadas, basados en el efecto de la cristalinidad, la desactivación térmica y la inhibición por celobiosa y glucosa. Estudios similares muestran que la pérdida de reactividad del sustrato no es la causa principal para lograr la completa conversión durante largos tiempos de residencia, si no que está ligada a procesos inhibitorios (Ohmine, 1983; Desai y Converse A 1977). La no linealidad es comúnmente observada en la hidrólisis enzimática de la celulosa. Esta podría ser explicada ya sea por uno o por todos los siguientes factores: inactivación de la enzima, heterogeneidad del sustrato e inhibición por producto. Cuando se utilizan dos enzimas obtenidas de *Termomonospora fusca* una endoglucanasa y una β - glucosidasa en sustratos como carboxymetilcelulosa, celulosa insoluble, y papel filtro, los resultados muestran una fuerte evidencia, que la inactivación de la enzima y la heterogeneidad del sustrato son las causas principales de la no linealidad de la cinética y la poca incidencia de la β - glucosidasa sobre la linealidad (Han *et al*, 1982).

La reducción de la velocidad de hidrólisis puede ser explicada ya sea por disminución de la actividad hidrolítica de la enzima o por un aumento de sustratos recalcitrantes. En el tratamiento de cuatro fibras de madera de pino (Douglas fir), se prepararon diferentes tipos de sustratos por diferentes formas como: refinamiento mecánico, sulfonadas, deslignificadas y una pulpa Kraft, con contenidos de lignina de 27,3%, 30,9%, 8,2% y 4,4% respectivamente, para observar si el contenido de lignina y el efecto del volumen inicial del poro, afecta la adsorción de la celulasa y la hidrólisis del sustrato. En este caso, para la hidrólisis, usando la enzima Celluclast (Novozyme), al comparar en base al contenido de lignina, encontraron que las celulosas sulfonadas cuando están lo suficientemente hinchadas, no afectan la adsorción de la enzima. Sin embargo, se observó que la adsorción inicial de celulasa no repercute en una más rápida y completa hidrólisis. En cambio, la celulosa delignificada es la que mayor hidrolizado produce comparada con la pulpa Kraft (Mooney *et al*, 1988).

Palonen (2004) reportan que la hemicelulosa residual juega un papel importante sobre la hidrólisis enzimática. Hay que señalar que muchas celulasas comerciales no están diseñadas para una eficiente hidrólisis de lignocelulosa. Sin embargo, su

desarrollo se podría mejorar agregando hemicelulasas que rompan de manera más eficiente la hemicelulosa residual. Consecuentemente, la hidrólisis de la hemicelulosa residual en la fracción sólida puede ser una alternativa para la remoción total de la hemicelulosa y mejorar la hidrólisis de la celulosa. Además, reporta información sobre el papel de la modificación de la lignina sobre la hidrólisis enzimática de lignocelulosa. La remoción enzimática de la lignina por lacasa y la hidrólisis enzimática pueden ser llevadas a cabo simultáneamente. Ambos, la oxidación de lignina con solo lacasa y la deslignificación del sustrato con lacasa y mediadores (NHA) aumentan el rendimiento de la hidrólisis de maderas blandas pretratadas con vapor.

La adición de surfactantes en la hidrólisis enzimática de lignocelulosa aumenta la conversión de celulosa en azúcares solubles. La mejora de la conversión en la hidrólisis de lignocelulosa y sustratos deslignificados con surfactantes puede ser explicado por la reducción de la adsorción de la enzima improductiva con parte de la lignina contenida en el sustrato. Esto es debido a la interacciones hidrofóbicas del surfactante con la lignina sobre la superficie de la lignocelulosa, libera los enlaces enzimáticos no productivos (Eriksson *et al*, 2002).

La inhibición de la celulasa de *Trichoderma reesei* por azúcares como glucosa δ -glucolactona y celobiosa y solventes (etanol, butanol y acetona) se estudiaron usando como sustrato celulosa azure. La glucosa, celobiosa, etanol y butanol presentaron un modelo de inhibición no competitiva según la aplicación del modelo HCH-1 (Ecuación 14 y 15), el cual aplica bien en la determinación del modelo de inhibición. La conversión de celobiosa a glucosa reduce la constante de unión en seis veces y la conversión de celobiosa a etanol la reduce en 16 veces (Holtzapple *et al*, 1990, Holtzapple *et al*, 1984).

$$V = \frac{dG_s}{dt} = \frac{kG_x E i}{\alpha + \phi G_x + \varepsilon E} \quad (14)$$

Donde, G_s es la concentración de producto soluble, G_x es la concentración de celulosa, E es la concentración de enzima, k y α son constantes globales y ε cobertura característica de sitios de celulosa por enlaces de celulasa, ϕ es la fracción de superficie de celulosa que está libre para hidrolizar.

$$i = \frac{I}{1 + \beta I} \quad (15)$$

Donde, β es la constante de unión o de enlace del inhibidor.

Comúnmente en la hidrólisis enzimática de celulosa se observan modelos cinéticos no lineales, lo cual podría explicarse por factores como: inactivación de la enzima, inhibición por producto y heterogeneidad del sustrato. La falta de estimulación de la celulasas por β - glucosidasa excluye la inhibición por producto como causa de la no linealidad. Existe una gran evidencia que la heterogeneidad del sustrato es la causa principal de la no linealidad. Lo que está claro es que si se adiciona glucosidasa se reduce la inhibición, pero no resuelve el problema de la pérdida de velocidad (Zhang. *et al*, 1998).

Regularmente se observa que la velocidad de hidrólisis de sustratos de celulosa disminuye marcadamente con el tiempo, lo que sugiere que las enzimas se inactivan mientras el sustrato es adsorbido, al parecer una unión improductiva es la causa principal de la reducción de la velocidad de hidrólisis (Eriksson *et al*, 2001).

Las redes neuronales y modelos híbridos han sido utilizados para estudiar la inhibición por sustrato y producto observada en la hidrólisis enzimática de la celobiosa a 40 ° C, 50 °C y 55 ° C, pH 4.8, usando soluciones de celobiosa con o sin la adición de glucosa exógena. El método de velocidad inicial y ajuste estadístico no lineal, son utilizados para determinar los parámetros cinéticos, ya sea para el modelo de inhibición competitivo o el competitivo por sustrato, con una insignificante concentración del producto y celobiosa de 0.4 a 2.0 g / L respectivamente. En segundo lugar, para seis diferentes modelos de inhibición de sustrato y producto y datos para baja conversión de celobiosa en reactores por lotes, se usaron redes neuronales para adecuar los parámetros de inhibición de producto a las ecuaciones derivadas de los balances de masa. El modelo de inhibición no-competitiva por sustrato y competitivo por producto mostró los mejores resultados para esta hidrólisis (Corazza *et al*, 2005).

Las redes neuronales son una herramienta de inteligencia artificial que identifica arbitrariamente funciones discriminantes multiparamétricas no lineales directamente de datos experimentales. Las redes han ganado popularidad para aplicaciones donde existe una descripción mecánica de dependencia entre variables dependientes e independientes que son desconocidas o complejas. Esta técnica de aprendizaje puede ser descrita como una función algebraica universal que distingue entre señales de ruidos y datos experimentales. Por lo que la aplicación de redes es altamente atractiva para el estudio de sistemas biológicos (Almeida, 2002). En los últimos tiempos se ha intentado utilizar herramientas como métodos de superficie de respuesta y redes neuronales artificiales en modelación y optimización de reacciones biológicas (Bas *et al* 2007).

En interés de encontrar diseños experimentales que puedan reducir el número de experimentos para estimar los parámetros cinéticos para reacciones catalizadas por enzimas, usando un mínimo de medidas de velocidades de reacción. Alberty Robert (2008) propuso el cálculo de N parámetros cinéticos que requieren N

medidas de velocidad. Además, plantea la selección de concentraciones de sustrato para solucionar sistemas de ecuaciones que se producen en el modelo cinético.

2. METODOLOGÍAS Y PROCEDIMIENTOS

Los procedimientos implementados para desarrollar una propuesta metodológica para obtener un biocatalizador para la hidrólisis enzimática de residuos de la cosecha de caña, comprende la preparación y caracterización de los residuos (sustrato), producción del biocatalizador a través de las actividades enzimáticas de enzimas comerciales, desarrollo de algoritmos para la selección del biocatalizador e influencia de la temperatura y pH sobre la actividad de la enzima.

2.1 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.

Se utilizaron residuos (hojas y cogollos), que quedan en el campo después de la cosecha de la caña de azúcar. Las muestras corresponden a las variedades colombianas de caña más cultivadas en el Valle del Cauca, la CC 8475 y la CC 8592. El material recolectado fue, lavado, secado, molido y almacenado herméticamente para su posterior uso. Estos residuos, fueron suministrados por el Centro de Investigaciones de la caña de Azúcar (CENICAÑA)

Se prepararon ocho sustratos, los cuales fueron obtenidos a través de diferentes métodos de deslignificación de los residuos de caña de azúcar. En la preparación de los sustratos se tuvo en cuenta el contenido de lignina y el proceso de deslignificación para obtener materiales de diferentes contenidos de celulosa, hemicelulosa, lignina e índices de cristalinidad.

La información sobre la caracterización de los residuos (hojas y cogollos), que quedan en el campo después de la cosecha de caña azúcar en el Valle del Cauca (Colombia), se basó en información secundaria de trabajos realizados por el grupo de Interinstitucional de investigaciones en Biocombustible “Grubioc” (Gómez, 2010), donde se determinan los componentes de los materiales lignocelulósicos (lignina, celulosa y hemicelulosa), y la composición de azúcares que se encuentran en la hemicelulosa (glucosa, xilosa, lactosa, celobiosa etc.). Además, se practicaron análisis de azúcares totales (Dubois, 1956) y del número de kappa (Norma Tappi T 236-cm-8).

Para la caracterización de los sustratos pre-tratados, se cuantificaron los componentes principales: lignina por el método del número Kappa (norma Tappi T-236-cm-85), la celulosa y hemicelulosa por el método descrito por (Van Soest, 1963).

Para el análisis de infrarojo, las muestras se analizaron en un espectrofotómetro de absorción de infrarojo con transformada de Fourier de reflectancia total atenuada marca Shimadzu, modelo IR Prestige 21, para el análisis de información

se utilizó el software IR solution versión 2. El espectro fue recolectado con 10 scans desde 4000 a 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} .

En la microscopía electrónica de barrido (MEB), se utilizó un equipo MEB modelo 200F Quanta con una resolución de 1.2 nm, de bajo vacío con un cañón de emisión de campo. Los análisis elementales se realizaron con un detector de EDX marca EDAX adaptado al MEB. Las condiciones del equipo fueron: voltaje de aceleración electrónica de 4000-30000 Kv con una presión en el rango de 40.5318 PA. Estas tres últimas pruebas se realizaron en el Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológica (INZIT) de Venezuela.

Los sustratos se describieron de la siguiente forma (ver Tabla1).

S1: sustrato sin ningún pretratamiento (material original o de control)

S2: sustrato obtenido por deslignificación enzimática

S4: sustrato con tratamiento de hidróxido de sodio

S3, S5, S6, S7 y S8: sustrato con pretratamiento organosolvente

2.1.1 Preparación de sustrato sin ningún pretratamiento (S1). Corresponde al material seleccionado en el campo (control), después de la cosecha y previo muestreo. Este material se sometió a secado hasta una humedad de 3.9 base húmeda. Posteriormente, se redujo de tamaño hasta que el 94.5% del material pasara una malla 10 y el 22% por una malla 60.

2.1.2 Preparación de sustratos tratados con enzimas deslignificantes (S2). Los residuos se sometieron a una deslignificación enzimática con la enzima comercial Suberasa[®] de Novozyme. La deslignificación se realizó en un reactor por lotes de 4 litros en acero inoxidable con control de temperatura y agitación. La temperatura se mantuvo en 40 °C, con una agitación de 200 rpm y 10% de sólidos (sustrato seco). La reacción se realizó durante 23 horas en una solución buffer de acetato de sodio 50 mM a pH 4.8 (Bourbonnais *et. al*, 1990 y Silva *et. al.*, 2002). Además, se usó como mediador vainillina en una concentración de 5 mg/ g de sólido seco. La dosificación de la enzima fue de 0.33 ml/ g de material seco. La actividad enzimática lacasa (0.83UI/ml) se midió por el método descrito por Jong - Rak *et al*, 2008.

Tabla 1. Descripción de las condiciones de los pretratamientos aplicados al material obtenido de los residuos de la cosecha de caña de azúcar

Sustrato	Pretratamiento	T °C	Relación NaOH (p/v)	Tiempo (min)	Referencia
S1	Sin pretratamiento				
S2	Enzimático, Suberasa® de Novozyme	40		1380	Salcedo, <i>et al</i> , 2011; Bourbonnais <i>et. Al</i> , 1990 ; Silva <i>et. al</i> , 2002; Jong - Rak <i>et al</i> , 2008
S3	OrganoSolvente	160	0.15	120	Salcedo, <i>et al</i> , 2011, Mutis, 2009
S4	Cocción NaOH	80	4	180	Bhattacharya <i>et al</i> , 2008
S5	OrganoSolvente	160	0.5	120	Salcedo, <i>et al</i> , 2011, Mutis, 2009
S6	OrganoSolvente	160	3	120	Salcedo, <i>et al</i> , 2011, Mutis, 2009
S7	OrganoSolvente	130	3	5	Salcedo, <i>et al</i> , 2011, Mutis, 2009
S8	OrganoSolvente	120	3	20	Salcedo, <i>et al</i> , 2011, Mutis, 2009

2.1.3 Preparación del sustrato con tratamiento con hidróxido de sodio (S4).

En la preparación del sustrato S4, al material lignocelulósico (S1) se le adicionó alcohol etílico al 70% durante 12 horas, posteriormente se sometió a un lavado con agua. El material resultante se llevó a una cocción a 80 °C con hidróxido de sodio al 4% p/v, con una relación líquido/sólido de 4, durante 3 horas. El material se sometió a un lavado con suficiente agua hasta desalojar el NaOH. La muestra resultante se introdujo por 30 minutos en una solución de clorito de sodio al 4% a un pH 3.8, obtenido por la adición de una solución de ácido acético 6 M y subsecuentemente con agua destilada hasta pH neutro (Bhattacharya *et al*, 2008).

2.1.4 Preparación de sustratos por método organosolvente (S3, S5, S6, S7 y S8).

El sustrato (S1), se sometió a un proceso de deslignificación por organosolvente. Las reacciones se llevaron a cabo en un reactor de 10 litros a temperaturas de 160, 160, 160, 130 y 120 C° durante 120, 120, 120, 5 y 20 minutos respectivamente, con relaciones sólido líquido 1:8 p/v, las fases líquida estuvieron compuestas de un 45 % v/v de alcohol etílico. Además se adicionó

como catalizador NaOH al 0.15, 0.5, 3, 3 y 3 % para los sustratos S3, S5, S6, S7 y S8, respectivamente.

Los materiales deslignificados S3, S7 y S8 se sometieron a un lavado con agua por 15 minutos y posterior secado (Mutis, 2009). Al material resultante de la deslignificación organosolvente S3, se sometió a una cocción a 80 °C con hidróxido de sodio al 4% con una relación líquido/sólido de cuatro, durante tres horas. Al final del procedimiento, se lavó con suficiente agua hasta desalojar el NaOH. El material S6, que resultó de la deslignificación, se le adicionó ácido sulfúrico 1N hasta un pH de 5, manteniendo una relación sólido/líquido de 85/15. Seguidamente, se agregó EDTA en relación de 1/1000 (p/p) con respecto al material sólido. La mezcla se agitó a 1000 rpm durante 10 minutos, luego se filtró y se lavó el sólido con abundante agua. Éste sólido se disolvió con hidróxido de sodio 1N, hasta llevar la mezcla a un pH de 10.8, manteniendo una relación sólido/líquido de 85/15 y agregando 4% de peróxido de hidrógeno con respecto al sólido, durante dos horas. Después, se separó por filtración el sólido, se lavó y secó.

2.2 PRODUCCIÓN DEL BIOCATALIZADOR.

La investigación se orientó a la obtención de un biocatalizador dirigido principalmente a la hidrólisis de material lignocelulósico de los residuos de la cosecha de la caña de azúcar, para lo cual se cuantificaron las actividades enzimáticas de diferentes cocteles enzimáticos comerciales.

2.2.1 Medida de actividades enzimáticas en enzimas comerciales. Con base en sustratos específicos, se determinó la actividad enzimática de varias enzimas comerciales (Ver anexo B), dirigidas a la obtención de mezclas de enzimas comerciales que expresaran diferentes actividades como: celulasa, hemicelulasa y celobiohidrolasas, para la degradación de los materiales lignocelulósicos. En la determinación de la actividad enzimática se necesita la cuantificación de la proteína (enzima) en las soluciones de enzimas comerciales. La determinación de proteína se realizó con el método Folin Cicaltou (Lowry *et al*, 1951).

Para la valoración de la actividad enzimática de las enzimas comerciales (Accellerase[®] 1500, Accellerase[®] XY, Accellerase[®] XC, Accellerase[®] BG, Klerzyme 150[®], Celluclast[®], Optimash[™] BG, Pectinex Ultra, Rapidase[®] ADEX, Clarex Citrus, Viscozyme[®] L, Citrozyme[®] Ultra), se usaron los métodos descritos en la Tabla 2.

Tabla 2. Sustrato y métodos para la determinación de actividad enzimática de celulasas, hemicelulas y ligninasas

Enzima	Sustrato	Método
β glucosidasa	P- 4 nitrofenil β - glucopyranosidasa	Sternberg <i>et al</i> , 1977
Celulasa	Papel Whatman No 1	Mandels <i>et al</i> , 1976
β -1-4 – endo glucanasa	Carboximetil celulosa	Ghose, 1987; Wood <i>et al</i> , 1988; Mandels, 1976 IUPAC
Exocelbiohidrolasas, β -1-4 – exo glucanasa	Celulosa microcristalina	Ghose, 1987; Wood <i>et al</i> , 1988; Mandels <i>et al</i> , 1976, IUPAC
Xylanasa	Ensayo de 1-4 β xilanase usando Azo Xilan (S-AXYO)	Bailey <i>et al</i> ,1992 Megazyme
Arabinofuranosidasa	P- nitrofenil – α L- arabino furonasa	(Sigma N-3641)
Endo – 1- 4 – β -D- galactanasa.	Azogactan (AGALP)	Megazyme
Endo 1,4- β -D mananasa	Manano P – MANCB	Megazyme
Endo –rhamnogalacturonasa	Azo- rhamnogalacturonano (AZRH)	Megazyme
Lacasa	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico)(ABTS 0.5mM)	Jong – Rock <i>et al</i> , 2008
Lignina peroxidasa	alcohol veratrílico	Maganhotto De Souza Silva , <i>et al</i> 2005
Manganeso peroxidasa	vanillilacetona.	Kuwahara <i>et al</i> , 1984 Castillo <i>et al</i> ,1994

2.2.2 Conformación y estructuración del biocatalizador. Para la producción del biocatalizador se implementaron los siguientes procedimientos.

- Producción de la mezcla de enzimas. Teniendo en cuenta la composición química, la estructura del material deslignificado de los residuos de la cosecha de caña de azúcar (hojas y cogollos) y la caracterización de las actividades enzimáticas de las enzimas comerciales, se procedió a preparar mezclas con diferentes relaciones en actividad celulítica total de celulasa (β -endogluconasas y β - exoglucanasas y de β - glucosidasas) y las enzimas que

contengan actividades hemicelulasas (xilanasas, endogalactanasa, endomanasas y endorhamnogalacturonasas). A partir del espectro enzimático encontrado en cada enzima comercial, se hizo combinación entre ellas, con la ayuda del paquete computacional Solver de Microsoft Excel®, a fin de preparar cinco preparados con diferentes actividades celulolíticas expresadas como unidades FPU (Unidades de Papel Filtro). Estos cinco cocteles se codificaron como E1, E2, E3, E4 y E5. Se evaluó el efecto de cada coctel enzimático sobre los diferentes sustratos, determinando el índice global de Hidrólisis.

- *Evaluación de los biocatalizadores.* Para seleccionar el biocatalizador apto para la hidrólisis de material lignocelulósico obtenido de residuos agrícolas de la caña de azúcar, se consideraron los siguientes parámetros:

Variables independientes: Tipo de sustrato, coctel de enzimas y relación enzima/sustrato basado en el contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa.

Variables dependientes: Índice de sacarificación e índice global de sacarificación.

En esta fase de la experimentación se conservó constante la agitación (250 rpm), se admitió que la velocidad intrínseca de reacción es la que limita la velocidad global de reacción, ya que los fenómenos de transferencia de materia no son relevantes. Por lo no fue necesario implementar un estudio para verificar esta suposición (ver Apéndice 1). Las reacciones se llevaron a cabo a una temperatura de 40 C°, con una relación sólido/líquido de 6/100, en soluciones buffer acetato de 4.8. Valores en los cuales expresan su máxima actividad las enzimas celulíticas y hemicelulíticas.

El índice de sacarificación se obtuvo a través de curvas de progreso de la reacción a partir de diferentes relaciones enzima sustrato (E/S) para los sustratos pretratados (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 y S8). Se tomaron muestras a diferentes tiempos de reacción (0, 2, 4, 6, 8, 24 y 48 h). A estas muestras se les determinó el contenido de azúcares reductores por el método DNS (Miller, 1959).

Se construyeron las curvas de progreso con base en la producción de azúcares reductores en función del tiempo. El cálculo del porcentaje de sacarificación se realizó según la Ecuación 16 (Ghose, 1987).

$$\% \text{ de Sacarificación } f(t) = \%X = \frac{\text{Azúcares reduct.}(\frac{mg}{ml}) * 0.9 * 100}{\text{Concentración de sustra.}(\frac{mg}{ml})} \quad (16)$$

Es conocido que un rango de conversión entre 10 y 60% de la curva presenta un comportamiento lineal, lo que permite calcular la pendiente (índice de sacarificación), con base en un gráfico semilogarítmico de % de sacarificación Versus E/S, como se muestra en la Ecuación 17.

$$\text{ind. sacarificación} = IS = \frac{\Delta \% \text{ sacarificación (conversión)}}{\Delta \log \left(\frac{E}{S} \right)} \quad (17)$$

Con el índice de sacarificación se busca medir el grado de hidrólisis de los sustratos a las diferentes mezclas de enzimas preparadas.

El índice Global de Hidrólisis (IGH), se representa por el producto o interacción (ver Ecuación 18) de la media del índice de sacarificación con la conversión promedio del porcentaje de hidrólisis (Salcedo *et al*, 2011).

$$IGH = \overline{\%X} \times \overline{IS} \quad (18)$$

Donde:

$$\overline{\%S} = \frac{\sum_{i=1}^4 \%X_{E/S_i}}{4} \quad \overline{IS} = \frac{\sum_{i=1}^5 IS_{t_i}}{5}$$

La actividad celulolítica de las enzimas usadas en la degradación de materiales lignocelulósicos, es un referente inicial para la producción del biocatalizador. Teniendo en cuenta este indicador, se procedió a adicionar nuevas actividades, a través de mezclas con enzimas que contengan xilanasas, β - glucosidasa, galactanasas, arabinofuranosidasa y mananasa. Al final de cada corrida experimental (48 horas), se midieron las concentraciones de celobiosa, glucosa y xilosa por cromatografía líquida. Para ello, se usó un equipo HPLC Shimadzu con una la columna aminex HPX-87P, detector RID, utilizando como fase móvil agua con flujo de de 0.6 ml/min (Sluiter and Hames, 2008). Para la cuantificación de glucosa, se utilizó una columna Sugar Pack I, detector RID con agua como fase móvil con flujo de 0.4 ml/min y un tiempo de retención de promedio fueron de 8.6 minutos para celobiosa y 11.5. La preparación de las muestras para su medición por HPLC, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm a - 5 °C por 30 minutos, para luego proceder a la precipitación de proteínas con acetona (CINVESTAV-UGPM, 2009). Seguidamente se sometieron a rota-evaporación a 40 °C y 450 mbar a 50 rpm para retirar la acetona, finalmente se retoma la centrifugación por 10 minutos y se somete a filtrado (0.22 μ m).

Se implementó un diseño experimental tipo factorial para las variables: tipo de sustrato, mezcla de enzima y relación E/S. Con los datos recolectados, se determinó el índice de hidrólisis e índice global de hidrólisis. En el análisis de la información se utilizó estadística descriptiva usando el programa StatGraphics® Centurión.

Para poder tener un mayor espectro, que permitiera visualizar la interacción de las mezclas enzimáticas y los diferentes sustratos se recurrió a un análisis de las interacciones enzimas – sustratos, a través de un análisis de sistemas borrosos. Debido a la complejidad de sistema enzima - sustrato, donde la dependencia entre variables dependientes e independientes es desconocida o compleja, haciendo difícil establecer un modelo matemático. También, se consideró, la dificultad de establecer una relación entre la calidad del sustrato y la actividad de la enzima para la generación del IGH que permitiera tomar decisiones sobre las actividades enzimáticas para hidrólisis de residuos de cosecha de la caña de azúcar.

Para manejar las bases que se utilizó en la selección de las mezclas de actividades enzimáticas utilizando el índice global de hidrólisis, se manejó la herramienta de lógica difusa del software MATLAB® R20009. La lógica difusa fue introducida a mediados de los años sesenta en la universidad de Berkely (California) por el ingeniero Zadeh L. (1985). Para el caso en estudio se utilizó un sistema difuso tipo Sugeno.

A partir de los datos experimentales y utilizando la herramienta ANFIS (Adaptive neuro-fuzzy inference system) de MATLAB® se seleccionó como función de inclusión (Memberships function), una función de distribución simétrica Gaussiana (gaussmf). El sistema Anfis construye un sistema de inferencia difuso (FIS), donde los parámetros de la función de inclusión se ajustan con un algoritmo híbrido, solos o en combinación con métodos de mínimos cuadrados. Este ajuste permite al sistema difuso aprender de los datos que se están modelando.

Para este estudio se tomaron variables de entrada (independientes) que establecieran el sistema difuso, entre las que tenemos: la composición porcentual de celulosa (35 - 82%), hemicelulosa (10- 38%) y el contenido de lignina (0.5 - 12). Además, se adicionaron a estas variables de entrada las relacionadas con las actividades de las enzimas como: unidades de papel filtro (1- 40 FPU/ml), actividad hemicelulasa (10 – 140 UI/ml) y actividad betaglucosidasa (100- 2500 pNPG U/ml). Como variable de salida (dependiente) se estableció el índice Global de hidrólisis en un rango entre 0 y 112.

El mecanismo de inferencia difusa, estableció 729 reglas. En el proceso de desfuzificación de la información obtenida a través del mecanismo de inferencia difusa se utilizó el método de defuzicación de peso promedio (wtaver) y el sistema de segregación máximo.

2.2.3 Influencia de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática.

Teniendo en cuenta la actividad enzimática global de la enzima seleccionada, conformada por una mezcla de actividades enzimáticas (celulasas, hemicelulasas y pectinasas de enzimas comerciales), se evaluó el coctel sobre un sustrato de bajo contenido de lignina, que se utilizó para determinar las condiciones de temperatura y pH que puede operar la enzima. Se recurrió a un diseño experimental rotacional central compuesto con puntos estrellas para evaluar la relación entre las variables pH y T y a un diseño factorial para la combinación del tiempo de reacción en dos niveles (1 y 3 horas) y pH en cinco niveles (3.5, 3.8, 4, 4.5 y 5). Las reacciones enzimáticas se realizaron en tubos de ensayo de 10 ml. Como medio de calentamiento se usó un baño termostatado con control de temperatura. Se utilizó una relación enzima /sustrato de 0.3 ml/g que tuviera una alta producción inicial de azúcares reductores, en cinco mililitros de buffer citrato de sodio 0.05 M, cada 10 minutos se agitaron las muestras hasta cumplir el tiempo de reacción. Al final del ensayo, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm en una centrifuga Marca Beckman®, Modelo 5414. El líquido sobrenadante se centrifugó a 14000 rpm a -5 °C durante 10 minutos. Al nuevo sobrenadante se le determinó el contenido de azúcares reductores por el método DNS (Miller, 1959).

2.3 DETERMINACIÓN DE MODELOS CINÉTICOS.

En la obtención del modelo cinético, se determinó la velocidad de producción de glucosa, en base al par sustrato - enzima que tuviera un alto índice global de hidrólisis. Además, se valoró la influencia del sustrato y los posibles inhibidores como glucosa y celobiosa.

La información recolectada para validar los modelos cinéticos, se obtuvo a partir de reacciones enzimáticas, las cuales se realizaron en matraces de 250 ml y una agitación de 250 rpm.

A 100 ml de una solución buffer 0.05 M de citrato de sodio, pH 4.2 y una temperatura de 50 °C, se adicionó el material pretratado en concentraciones de 10, 20, 30, 40, 60 y 80 g/L, con relaciones ml enzima/g de sustrato de (1.5, 0.75, 0.5, 0.375, 0.25, 0.187). Los tratamientos se realizaron por triplicado durante 51 horas. Se tomaron muestras, para análisis a 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 6, 9, 24, 27, 33, 48 y 51 horas. Las muestras recolectadas se sometieron a centrifugación a -5 °C durante 10 minutos, al líquido sobrenadante se le determinó azúcares reductores por el método DNS. La cuantificación de glucosa y celobiosa se hizo por cromatografía líquida, en un equipo HPLC Shimadzu con una columna Sugar Pack I, con detector RID, con agua como fase móvil a un flujo de 0.4 ml/min y un tiempo de retención promedio de 8.6 minutos para celobiosa y 11.5 para glucosa. Con la información recolectada se construyeron curvas de progreso para la producción de azúcares reductores y glucosa.

2.3.1 Determinación de los parámetros cinéticos (Michaelis – Menten) e inhibición por sustrato. Con los datos de azúcares reductores obtenidos de las curvas de progreso, se determinaron las velocidades iniciales, a partir de las pendientes cuando el tiempo tiende a cero (Dixon y Webb, 2009; Duarte, 1995; Coraza, 1995). Por este método se calcularon la constante de Michaelis – Menten (K_m), la velocidad máxima (V_m).

Seguidamente, se procedió con la evaluación de parámetros cinéticos para cuando se produce inhibición por sustrato. El cual se fundamentó en la determinación de la velocidad inicial de hidrólisis, con el objetivo de evitar altas concentraciones de producto que incidan sobre la velocidad intrínseca de reacción. Se consideró como variable independiente la relación enzima/concentración de sustrato (E/S) y como variable dependiente la velocidad inicial de hidrólisis. Para este caso, se utilizó la metodología propuesta por Alberty (2008) donde se analizaron 10 puntos para refrendar los modelos típicos de inhibición incompetitiva por sustrato e inhibición no competitiva por sustrato (Ecuaciones 19 y 20). Estas ecuaciones se reearreglaron, llevándose a los modelos expresados por las Ecuaciones 21 y 22, que pueden ser expresados por un modelo en función de las constantes a, b y c (ver Ecuación 23). A través de la construcción de Gráficas de S/V contra S y a través de un análisis de regresión polinomial y de regresión no lineal basado en el algoritmo Marquardt recurriendo al software estadístico STATGRAPHICS®, se calculó la constante cinética de inhibición por sustrato K_s :

$$S_o \frac{dX}{dt} = v = \frac{SV_m}{S + K_m + \frac{S^2}{K_s}} \quad \text{Inhibición incompetitiva} \quad (19)$$

$$S_o \frac{dX}{dt} = v = \frac{SV_m}{S + K_m \left(1 + \frac{S}{K_s}\right) + \frac{S^2}{K_s}} \quad \text{Inhibición no-competitiva} \quad (20)$$

$$\frac{S}{V} = \frac{K_m}{V_m} + \left(\frac{1}{V_m}\right)S + \left(\frac{1}{K_s V_m}\right)S^2 \quad (21)$$

$$\frac{S}{V} = \frac{K_m}{V_m} + \left(\frac{1}{V_m}\right)\left(1 + \frac{K_m}{V_m}\right)S + \left(\frac{1}{K_s V_m}\right)S^2 \quad (22)$$

$$\frac{S_o}{V} = a + bS + cS^2 \quad (23)$$

Donde S= Concentración de sustrato g/L y V= velocidad de reacción g/(L.h)

2.3.2 Evaluación de parámetros para la inhibición por producto. Evaluada la constante de Michaelis y la velocidad máxima de reacción, se procedió con la evaluación de las constantes cinéticas de los modelos que tengan en cuenta la inhibición por productos. Para un mejor entendimiento de estos fenómenos, la validación de los modelos se dividió en dos grupos:

➤ Grupo I: Inicialmente se presentan modelos cinéticos con un inhibidor, que puedan ser ajustados a través de datos experimentales.

Los modelos cinéticos tenidos en cuenta fueron: inhibición competitiva, incompetitiva, no-competitiva y no-competitiva y mezclada. En este caso los datos experimentales de tiempo, conversión, concentración de glucosa, son tomados directamente de la base de datos, procesados y a través de un análisis de regresión no lineal basado en el algoritmo Marquardt, recurriendo al software estadístico STATGRAPHICS®, refrendados por la herramienta de análisis de regresión no lineal de MATLAB® para evaluar las constantes cinéticas.

Después de obtenidos los parámetros cinéticos de los diferentes modelos, se procedió con la simulación de modelos cinéticos. Se implementó un programa en POLYMATH® 6.0 y MATLAB® que permitió comparar los modelos cinéticos que presentaron mejor ajuste con los datos experimentales. Para este grupo se tomó como base el modelo general de inhibición propuesto por Bezerra *et al*, 2004. Los modelos cinéticos seleccionados son expresados por ecuaciones diferenciales, 24, 25, 26 y 27.

$$\text{Inhibición competitiva: } -\frac{dS}{dt} = \frac{V_m S}{S + k_m \left(1 + \frac{I}{k_i}\right)} \rightarrow \frac{dX}{dt} = \frac{V_m (1-X)}{S_o (1-X) + k_m \left(1 + \frac{I}{k_i}\right)} \quad (24)$$

$$\text{Inhibition incompetitiva: } \frac{dX}{dt} = \frac{V_m (1-X)}{S_o (1-X) \left(1 + \frac{I}{k_i}\right) + k_m} \quad (25)$$

$$\text{Inhibición no- competitiva: } \frac{dX}{dt} = \frac{V_m (1-X)}{\left(1 + \frac{I}{k_i}\right) [S_o (1-X) + k_m]} \quad (26)$$

$$\text{Inhibición no competitiva y mezclada: } \frac{dX}{dt} = \frac{V_m (1-X)}{\left(1 + \frac{I}{k_i}\right) S_o (1-X) + k_m \left(1 + \frac{I}{k_{ii}}\right)} \quad (27)$$

La determinación de los parámetros de inhibición de los modelos cinéticos, se basó en el balance de masa en un reactor por lotes de la hidrólisis enzimática como lo plantean (Coraza *et al*, 2009; Orsi y Tipton *et al*, 1979 y Chao and Atalaya, 1977). La solución de las ecuaciones diferenciales que representan estos modelos cinéticos, es expresada por ecuaciones algebraicas, las cuales contienen las constantes cinéticas a evaluar por regresión no lineal. Para un mejor

entendimiento, estos modelos se dividen en tres grupos: modelos de inhibición por sustrato y productos (IIC), modelos de inhibición total por producto (ITP) y los que utilizan la concentración del inhibidor (glucosa) a través de un modelo matemático (IC, ICC, INC e INCM). La forma integrada de los modelos se presenta a continuación:

Modelos de inhibición por sustratos y productos (IIC). En la implementación de estos modelos, se agruparon los modelos representados por las ecuaciones 18, 19, 23, 24 y 25, que tienen en cuenta las inhibiciones por sustrato y producto. En este caso el producto tenido en cuenta fue el contenido de glucosa ($Glu(t)$) en g/l. Donde, (X) representa la conversión total de azúcares reductores y S_0 la concentración inicial de sustrato. La solución a las ecuaciones diferenciales, se muestra en las ecuaciones 28, 29 y 30.

Inhibición Incompetitiva por sustrato y Competitiva por glucosa (IIC1):

$$t = \frac{S_0}{V_m} \left(1 + \frac{S_0}{k_s} - 2 \frac{K_m}{k_i} \right) X - \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{Glu(t)}{k_i} + 2 \frac{S_0}{k_i} \right) \ln(1 - X) - \left(\frac{S_0^2}{2V_m k_s} \right) X^2 \quad (28)$$

t = tiempo h, S_0 = concentración inicial de sustrato g/l

Inhibición Incompetitiva por sustrato y no Competitiva por glucosa (IIC2):

$$t = \frac{S_0}{V_m} \left(1 + \frac{Glu(t)}{K_i} + \frac{S_0}{k_s} - 2 \frac{K_m}{k_i} \right) X - \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{Glu(t)}{k_i} + 2 \frac{S_0}{k_i} \right) \ln(1 - X) - \frac{S_0^2}{V_m} \left(\frac{k_s}{2} - \frac{1}{k_i} \right) X^2 \quad (29)$$

k_i = constante de inhibición g/L

Inhibición Incompetitiva por sustrato y glucosa (IIC3):

$$t = \frac{S_0}{V_m} \left(1 + \frac{Glu(t)}{K_i} + \frac{S_0}{k_s} \right) X - \frac{K_m}{V_m} \ln(1 - X) - \frac{S_0^2}{V_m} \left(\frac{k_s}{2} - \frac{1}{k_i} \right) X^2 \quad (30)$$

Modelos de inhibición total por producto (ITP). Entre otros modelos cinéticos analizados se encuentran aquellos que tienen como inhibidor todos los productos generados durante la reacción que son expresados como la conversión total de azúcares reductores (X). En este caso, en los modelos representados por las ecuaciones 28, 29 y 30 la concentración de inhibidor es remplazada por la conversión total (X). La solución de estas ecuaciones diferenciales se muestra en las ecuaciones 31, 32 y 33.

Modelo Competitivo (ITP1):

$$t = \frac{1}{v_m} \left[X S_o - K_m \left(\frac{K_i + S_o}{K_i - K_m} \right) \ln(1 - X) \right] \left(1 - \frac{K_m}{K_i} \right) \quad (31)$$

Modelo Incompetitivo (ITP2):

$$t = \frac{X S_o}{v_m} \left(1 + \frac{S_o X}{2 k_i} \right) - \frac{k_m}{v_m} \ln(1 - X) \quad (32)$$

Modelo Mezclado y Nocompetitivo (ITP3):

$$t = \frac{1}{v_m} \left(X S_o - \frac{k_m (k_i + S_o)}{k_i + \frac{k_i X S_o}{2 k_{ii}}} \ln(1 - X) \right) \left(1 + \frac{S_o X}{2 k_{ii}} - \frac{k_m}{k_i} \right) \quad (33)$$

Los modelos que se presentan a continuación, al igual que los anteriores, están compuesto por inhibición competitiva, incompetitiva, no- competitiva y mezclada para un solo inhibidor. Pero en este caso, se tienen en cuenta relaciones matemáticas entre la conversión y la producción de glucosa, semejante a un sistema de respuesta de primer orden (ver Ecuación 34), que son utilizados para resolver las ecuaciones diferenciales que representan los diferentes modelos.

$$I = \text{Glucosa} = \frac{A_o}{(k+1)} e^{[(k+1)X-1]} \quad (34)$$

k_2 = constante adimensional

Partiendo de las ecuaciones diferenciales planteadas para los distintos modelos cinéticos, se entró a resolver analíticamente dichas ecuaciones diferenciales. En el caso de inhibición competitiva, la solución de las ecuaciones diferenciales es representada por las ecuaciones 35 y 36. La solución analítica de las ecuaciones diferenciales que representan estos los modelos de inhibición competitiva, incompetitiva, no competitivos y no-competitiva y mezclados, se presentan en las ecuaciones 37, 38, 39 y 40.

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{v_m s}{s + k_m \left(1 + \frac{I}{k_i} \right)} \rightarrow \frac{dX}{dt} = \frac{v_m (1-X)}{s_o (1-X) + k_m \left(1 + \frac{I}{k_i} \right)} \quad (35)$$

$$t = \int \frac{s_o}{v_m} dX + \int \frac{k_m}{v_m (1-X)} \left(1 + \frac{I}{k_i} \right) dX \quad (36)$$

Inhibición competitiva (IC):

$$t = \frac{S_0 X}{V_m} - \frac{K_m}{V_m} \ln(1-X) + \frac{K_m A_0 e^k}{(k+1) V_m k_1} \left[-\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{[-(1-X)(1+k)]^i}{i!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{[-(1+k)]^i}{i!} \right] \quad (37)$$

Inhibición incompetitiva (IIC):

$$t = \frac{S_0 X}{V_m} - \frac{K_m}{V_m} \ln(1-X) + \frac{S_0 A_0}{V_m k_1 (k+1)^2} \left[e^{(k+1)X-1} - \frac{1}{e} \right] \quad (38)$$

Inhibición No-competitiva (INC):

$$t = \frac{S_0 X}{V_m} - \frac{K_m}{V_m} \ln(1-X) + \frac{S_0 A_0}{V_m k_1 (1+k)} \left[\frac{1}{k+1} e^{-(1+(1+k)X)} - \frac{1}{e(k+1)} \right] + \frac{K_m A_0 e^k}{(k+1) V_m k_1} \left[-\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{[-(1-X)(1+k)]^i}{i!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{[-(1+k)]^i}{i!} \right] \quad (39)$$

Inhibición No- competitiva y mezclada (INCM):

$$t = \frac{S_0 X}{V_m} - \frac{K_m}{V_m} \ln(1-X) + \frac{S_0 A_0}{V_m K_1 (1+k)} \left[\frac{1}{k+1} e^{-(1+(1+k)X)} - \frac{1}{e(k+1)} \right] + \frac{K_m A_0 e^k}{(k+1) V_m k_2} \left[-\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{[-(1-X)(1+k)]^i}{i!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{[-(1+k)]^i}{i!} \right] \quad (40)$$

✓ Grupo II: En este grupo, se presentan los modelos cinéticos que tienen en cuenta la interacción de dos inhibidores.

Un primer inhibidor compuesto fundamentalmente por glucosa y un segundo inhibidor compuesto por azúcares o compuestos reductores solubles en la mezcla reaccionante diferente a glucosa. Estos azúcares solubles, son derivados de la descomposición de la hemicelulosa, que son polímeros conformados por unidades de glucosa que en ese momento sus enlaces no se han podido fraccionar y otros compuestos reductores que se puedan encuentran en los extractivos diferentes de glucosa. En este estudio se tuvo en cuenta dos tipos de doble inhibición.

Inhibidores antagonicos: cuando pueden actuar sobre el mismo sitio en la misma enzima, existe una influencia indirecta de la afinidad entre los inhibidores.

Inhibidores independientes: en este caso los inhibidores actúan en forma independiente sobre el sitio activo sin afectar la afinidad del otro. La evaluación de los parámetros que determinan el tipo de interacción es presentada por (Yonetani y Theorell, 1964; Chao y Talaya, 1977).

Inicialmente se estableció el tipo de inhibición, se entró a evaluar el modelo cinético, el cual estuvo representado por la Ecuación general de inhibición (Ecuación 41) y sus respectivas constantes cinéticas (ecuaciones 42 y 43). Los

cuales fueron descritas por Fujji *et al*, 1995; Chao y Talaya, 1981; Han y Seong, 1982.

Si (a) o (b) es igual a 1, es inhibición no competitiva; (a) o (b) es igual a ∞ , es inhibición competitiva.

α_1 y α_2 es igual uno, los inhibidores son no interactivos (independientes), si α_1 α_2 es igual a ∞ son inhibidores antagónicos.

$$V = -\frac{dS}{dt} = \frac{v_m S}{k_m \phi_1 + S \phi_2} \quad (41)$$

$$\phi_1 = 1 + \frac{I_1}{k_1} + \frac{I_2}{k_2} + \frac{I_1 I_2}{\alpha_1 k_1 k_2} \quad (42)$$

$$\phi_2 = 1 + \frac{I_1}{a k_1} + \frac{I_2}{b k_2} + \frac{I_1 I_2}{a b \alpha_2 k_1 k_2} \quad (43)$$

Donde: I_1 , I_2 son inhibidores por glucosa y salubres respectivamente; k_1 , k_2 , $\alpha_1 k_1$, $\alpha_2 k_2$ son constantes de disociación de equilibrio para los respectivos complejos enzima- inhibidor

S = concentración de sustrato, k_m = constante de Michaelis, V_m = velocidad máxima, V = velocidad de hidrólisis.

Además, se planteó un modelo que determine la relación entre los solubles (compuestos reductores diferentes a la glucosa) y la conversión, mediante la Ecuación 44, donde A, B, D son constantes

$$\text{Solubles} = I_2 = (A + BX)e^{(DX-1)} \quad (44)$$

En el caso particular a manera de ejemplo, de la inhibición competitiva por glucosa y solubles con inhibición antagónica, el modelo se puede expresar por la Ecuación diferencial representada por la Ecuación 45, cuya solución se muestra en la Ecuación 46.

$$\frac{dX}{dt} = \frac{v_m S_0 (1-X)}{k_m \left(1 + \frac{I_1}{k_1} + \frac{I_2}{k_2}\right) + S_0 (1-X)} \quad (45)$$

Inhibición competitiva glucosa y competitiva solubles antagónico: (ICGCS-A):
para este caso las constantes a y $b=\infty$, $\alpha_1=\alpha_2=\infty$

$$t = \frac{S_o}{V_m} X - \frac{K_m}{V_m} \ln(1-X) + \frac{K_m A e^{D-1}}{V_m k_2} \left\{ -\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{(-D(1-X))^i}{ii!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{-D^i}{ii!} \right\} +$$

$$\frac{K_m B e^{D-1}}{V_m K_2} \left\{ -\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{(-D(1-X))^i}{ii!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{-D^i}{ii!} - \frac{1}{D} (e^{-D(1-X)} - e^{-D}) \right\} +$$

$$\frac{K_m A_o e^k}{(k+1)v_m k_1} \left[-\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{[-(1-X)(1+k)]^i}{ii!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{[-(1+k)]^i}{ii!} \right] \quad (46)$$

Las soluciones analíticas de los modelos cinéticos propuestos para los diferentes tipos de inhibición se presentan a continuación:

Inhibición competitiva glucosa y competitiva solubles independiente: (ICGCS-I): a y $b=\infty$, $\alpha_1=\alpha_2=1$

$$t = \frac{S_o}{V_m} X - \frac{K_m}{V_m} \ln(1-X) + \frac{K_m A e^{D-1}}{V_m K_1} \left\{ -\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{(-D(1-X))^i}{ii!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{-D^i}{ii!} \right\} +$$

$$\frac{K_m B e^{D-1}}{V_m K_1} \left\{ -\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{(-D(1-X))^i}{ii!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{-D^i}{ii!} - \frac{1}{D} (e^{-D(1-X)} - e^{-D}) \right\} +$$

$$\frac{K_m A_o e^k}{(k+1)v_m k_2} \left[-\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{[-(1-X)(1+k)]^i}{ii!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{[-(1+k)]^i}{ii!} \right] + \frac{k_m A_o A e^{(k+D-1)}}{V_m K_2 K_1 (k+1)} \left[-\ln(1-X) - \sum_{i=1}^n \frac{(-(k+D+1)(1-X))^i}{ii!} + \sum_{i=1}^n \frac{(-(k+D+1))^i}{ii!} \right] +$$

$$\frac{k_m A_o B e^{(k+D-1)}}{V_m K_2 K_1 (k+1)} \left[-\ln(1-X) - \sum_{i=1}^n \frac{(-(k+D+1)(1-X))^i}{ii!} + \sum_{i=1}^n \frac{(-(k+D+1))^i}{ii!} \right] - \frac{k_m A_o B e^{(k+D-1)}}{V_m K_2 K_1 (k+1)(k+D+1)} \left[e^{-(k+D+1)(1-X)} - e^{-(k+D+1)} \right] \quad (47)$$

Inhibición no- competitiva glucosa y solubles antagónico (INCGNCS-A): $a=b=1$
 $\alpha_1=\alpha_2=\infty$

$$t = \frac{S_o X}{V_m} - \frac{K_m}{V_m} \ln(1-X) + \frac{K_m}{V_m} \frac{A_o}{K_1(1+k)} \left[\frac{1}{k+1} e^{-(1+(1+k)X)} - \frac{1}{e(k+1)} \right] + \frac{K_m A_o e^k}{(k+1)v_m k_1} \left[-\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{[-(1-X)(1+k)]^i}{ii!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{[-(1+k)]^i}{ii!} \right] +$$

$$\frac{S_o A}{V_m k_2 D} \left(e^{DX-1} - \frac{1}{e} \right) + \frac{S_o B}{V_m k_2 D^2} \left[(DX-1)e^{DX-1} + \frac{1}{e} \right] + \frac{K_m A e^{D-1}}{V_m K_2} \left\{ -\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{(-D(1-X))^i}{i!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{-D^i}{i!} \right\} +$$

$$\frac{K_m B e^{D-1}}{V_m K_2} \left\{ -\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{(-D(1-X))^i}{i!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{-D^i}{i!} - \frac{1}{D} \left(e^{-D(1-X)} - e^{-D} \right) \right\} \quad (48)$$

Inhibición competitiva con glucosa y no competitiva con solubles antagonico (ICGNCS-A): (b=1, a=∞, α₁=α₂=∞)

$$t = \frac{S_o}{V_m} X + \frac{K_m}{V_m} \ln(1-X) + \frac{K_m A_o e^k}{(k+1)V_m K_1} \left[-\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{[-(1-X)(1+k)]^i}{i!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{[-(1+k)]^i}{i!} \right] + \frac{K_m A e^{D-1}}{V_m K_2} \left\{ -\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{(-D(1-X))^i}{i!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{-D^i}{i!} \right\} +$$

$$\frac{K_m B e^{D-1}}{V_m K_2} \left\{ -\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{(-D(1-X))^i}{i!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{-D^i}{i!} - \frac{1}{D} \left(e^{-D(1-X)} - e^{-D} \right) \right\} + \frac{S_o A}{V_m k_2 b D} \left(e^{DX-1} - \frac{1}{e} \right) +$$

$$\frac{S_o B}{V_m k_2 b D^2} \left[(DX-1)e^{DX-1} + \frac{1}{e} \right] \quad (49)$$

Inhibición no-competitiva glucosa y competitiva solubles antagonico (INCGCS-S): a=1, b=∞, α₁=α₂=∞

$$t = \frac{S_o}{V_m} X + \frac{K_m}{V_m} \ln(1-X) + \frac{K_m A_o e^k}{(k+1)V_m K_1} \left[-\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{[-(1-X)(1+k)]^i}{i!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{[-(1+k)]^i}{i!} \right] + \frac{K_m A_o}{V_m K_1 (1+k)} \left[\frac{1}{k+1} e^{-(1+(1+k)X)} - \frac{1}{e(k+1)} \right] +$$

$$\frac{K_m A e^{D-1}}{V_m K_2} \left\{ -\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{(-D(1-X))^i}{i!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{-D^i}{i!} \right\} + \frac{K_m B e^{D-1}}{V_m K_2} \left\{ -\ln(1-X) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{(-D(1-X))^i}{i!} + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{-D^i}{i!} - \frac{1}{D} \left(e^{-D(1-X)} - e^{-D} \right) \right\} \quad (50)$$

Para la evaluación de los parámetros cinéticos se utilizó un análisis de regresión no lineal basado en el algoritmo Marquardt, a través del software estadístico STATGRAPHICS® Y MATLAB®. En la Simulación de modelos cinéticos Se implementó un programa en POLYMATH 6.0 y MATLAB® que permitió comparar los modelos cinéticos que presentaron mejor ajuste con los datos experimentales.

Hay dos etapas importantes involucradas en la conversión de biomasa a alcohol, la hidrólisis de la celulosa la fermentación a alcohol. Los costos de producción de alcohol a partir de material lignocelulósico son relativamente altos y se centran en sus bajos rendimientos y altos costos del proceso de hidrólisis. Considerables esfuerzos, se han hecho para encontrar la mezcla de actividades enzimáticas que produzca una enzima capaz de convertir los componentes de los materiales lignocelulósicos en azúcares fermentables, a una relación enzima/sustrato adecuada que permita un proceso de hidrólisis económicamente viable, es un reto

para la industria productora de biocombustibles a partir de biomasa. En el Apéndice 2, se plantea un análisis económico para determinar la relación enzima/sustrato, que haga viable el uso de la enzima seleccionada en este estudio.

2.4 RELACIÓN ENTRE EL ÍNDICE DE CRISTALINIDAD Y EL ÍNDICE GLOBAL DE HIDRÓLISIS (IGH).

La microscopia de barrido electrónica, no distingue las regiones amorfas de las cristalinas en la fibra de celulosa. Sin embargo, examinando la morfología antes y después de la hidrólisis puede ayudar a explicar este tipo de procesos. Algunos investigadores, proponen que la velocidad de hidrólisis de la región amorfa es mayor que en la región cristalina en la celulosa (Zhao *et al.*, 2006). Además, que la celulosa que tiene alto contenido de amorfos, usualmente son más fácilmente digeridas por enzimas. Sin embargo, esta afirmación no es clara, literatura publicada actualmente, muestra que celulosa I (CI), provee una clara indicación de la digestibilidad de muestras celulosa (Park *et al.*, 2010).

La cristalinidad, se midió por difracción de rayos X, en un rango de 2θ de $10^\circ - 40^\circ$ para los diferentes sustratos, en forma de polvo, en un difractómetro Bruker (Madison, USA), Modelo D8 con radiación de Cobre. Se calculó el índice de cristalinidad, CrI (Segal *et al.*, 1959), número de intensidad relativa (Ranby, 1952; Zhang *et al.*, 1993) y el grado de mercerización de celulosa CII-%, (Mansikkamaki *et al.*, 2001).

El índice de cristalinidad se evaluó a través del modelo propuesto por (Segal *et al.* 1959), el cual se expresa por la Ecuación 51.

$$CrI = \left(\frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \right) \times 100 \quad (51)$$

Donde

CrI: porcentaje de índice de cristalinidad;

I_{200} : la máxima intensidad de de difracción, a 2θ entre 22 y 23°

y I_{am} : la intensidad de difracción a 2θ entre 18 y 19° para celulosa I

Para el cálculo del índice de cristalinidad, se tomaron los datos promedios de intensidad entre los dos rangos propuestos para I_{200} e I_{am} .

Además, con los datos experimentales obtenidos por difracción de rayos X y basados en reportes recientes, donde se han derivado métodos para evaluar con

mayor precisión la conversión de la celulosa I (CI) a celulosa II (CII), que son usados para estudiar los efectos de diferentes tratamientos alcalinos sobre cristales de celulosa (Manssikkamaki *et al*, 2001), se procedió a determinar el avance de la cristalinidad en los diferentes sustratos.

Entre estos métodos, se reporta la evaluación del número de intensidad relativa I_r o la conversión a CII (ver Ecuación 52). En este caso, el valor de cero para celulosa pura nativa y de uno para celulosa completamente mercerizada y valores intermedios indican mercerización parcial (Ranby, 1952; Zhang *et al*, 1993).

$$I_r = C_{II} = \frac{2I_{II}}{I_I + 2I_{II}} \quad (52)$$

I_I =es la suma de intensidades $I_{14.7} + I_{16.1}$, y $I_{II} = I_{12}$

I_r = número de intensidad relativa, es un indicador de la conversión de celulosa II (C_{II}).

Otro indicador de conversión es el grado de mercerización de celulosa CII-%, (Manssikkamaki *et al*, 2001). El cual, es importante para comparar entre sí, el sistema cristalino de cierto grupo de tratamientos experimentales (ver Ecuaciones 53 y 54). Un CII-% de cero indica gran cantidad material amorfo.

$$CII - \% = \frac{CII_r - CII_{t,min}}{CII_{t,min} - CII_{t,min}} \times 100 \quad (53)$$

CII-%= grado de mercerización de celulosa

$$CII_r = \frac{I_{r,12.1}}{I_{r,12.1} + 0.5(I_{r,14.6} + I_{r,16.1})} \quad (54)$$

CII_r = grado de mercerización relativa.

Además, $CII_{t, min}$ corresponde al menor del grado de mercerización relativa de todas las muestras probadas y $CII_{t, max}$ al mayor valor.

3. ANÁLISIS Y RESULTADOS

3.1 SELECCIÓN DE ENZIMAS

A continuación se presentan los resultados obtenidos para desarrollar una metodología para la obtención de biocatalizadores. Inicialmente, se realizó un análisis de la composición de estos residuos, seguido de una caracterización de las actividades enzimáticas de las diferentes enzimas comerciales, que permitió desarrollar diferentes preparados enzimáticos. Complementado por análisis infrarrojo, difracción de rayos X y microfotografía de barrido electrónico, a los diferentes sustratos. Información que permitió, seleccionar un preparado enzimático y un sustrato para la determinación de un modelo cinético.

3.1.1 Caracterización de residuos (hojas y cogollos). La composición de las paredes celulares de los residuos de cosecha (hojas y cogollos) de dos variedades (CC 8475 y CC 8592) de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición general de los principales componentes en los residuos de caña de azúcar

Componente	Variedad	
	CC 8592	CC 8475
Humedad	8.15 (± 0.095)	7.15 (± 0.107)
Hemicelulosa NaOH	3.72(± 0.161)	3.92(± 0.170)
Hemicelulosa KOH	21.08(± 0.901)	22.19 (± 0.982)
Hidro-solubles	7.20(± 0.212)	6.90 (± 0.193)
Nitrógeno Khjendal	1.664 (± 0.067)	1.702 (± 0.053)
Celulosa	41.80 (± 1.523)	42.40 (± 1.621)
Extraíbles Lipofilicos	0.41 (± 0.020)	0.39 (± 0.017)
Cenizas	3.34 (± 0.138)	2.68 (± 0.116)
Lignina Klason	20.51 (± 0.895)	21.68 (± 0.905)

Gómez, 2010, materiales utilizados en este trabajo de investigación

Gonzales (2010), utilizando los mismos residuos utilizados en este trabajo, identificó que los componentes de la hemicelulosa presentes en los residuos de cosecha (hojas y cogollos) de estas tres variedades, muestra, que en la variedad CC 85 - 92, la xilosa fue el azúcar de mayor abundancia con un 17% referido a los residuos de la caña de azúcar, seguidos de la glucosa con un 8%, la arabinosa con un 7% y manosa el 6%. En contraste, el azúcar que se presenta mayormente en la variedad CC 84 – 75 fue la manosa con un 7%, mientras que la xilosa alcanzó el 6%.

3.1.2 Composición de los sustratos pretratados. En la Tabla 4 presenta el análisis composicional de los ocho sustratos preparados a partir de los residuos de hojas y cogollos de los residuos de cosecha, siete fueron sometidos a diferentes condiciones de pre tratamientos. Al sustrato (S1) no se le aplicó ningún tipo de tratamiento, por lo que se escogió como control.

Tabla 4. Análisis composicional (porcentaje) de los sustratos de materiales pretratados a partir de residuos de cosecha de caña de azúcar

	S1(control)	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Celulosa	37.36±1.4	44.5±0.98	80.53±0.15	74.7±1.4	82.35±0.35	82.6±0.82	71.9±0.42	77.4±0.2
Hemicelulosa	34.6±0.81	37.3±0.41	13.35±0.55	16.43±0.15	3.01±0.05	7.37±0.057	10.87±0.08	10.35±0.22
Lignina Total	21.23±0.0.41	12.46±1.58	1.36±0.36	3.99±1.60	7.91±0.25	4.79±0.5	10.75±0.4	6.56±0.3
Extractivos	3.95±0.03	5.13±0.0057	4.22±0.01	5.35±0.04	9±0.2	5.06±0.0057	4.7±0.023	6.48±0.042
Humedad (b.h)	3.95±0.8	5.1±0.7	4.2±0.4	5.29±0.5	8.95±0.02	5.1±0.10	6.44±0.1	4.73±0.07
Cenizas	1.13±0.4	0.66±0.15	0.12±0.028	0.17±0.05	1.4±0.2	0.22±0.1	1.6±0.042	0.54±0.02
Lignina Residual	7.12±0.1	7.18±0.057	0.91±0.1	1.85±0.3	1.93±0.18	1.83±0.15	2.82±0.14	2.15±0.11
No Kappa*	47±0.3	38.56±0.5	5.85±0.3	16.6±0.4	27.39±0.3	6.21±0.2	16.82±0.4	13.24±0.4

• No entra en análisis porcentual

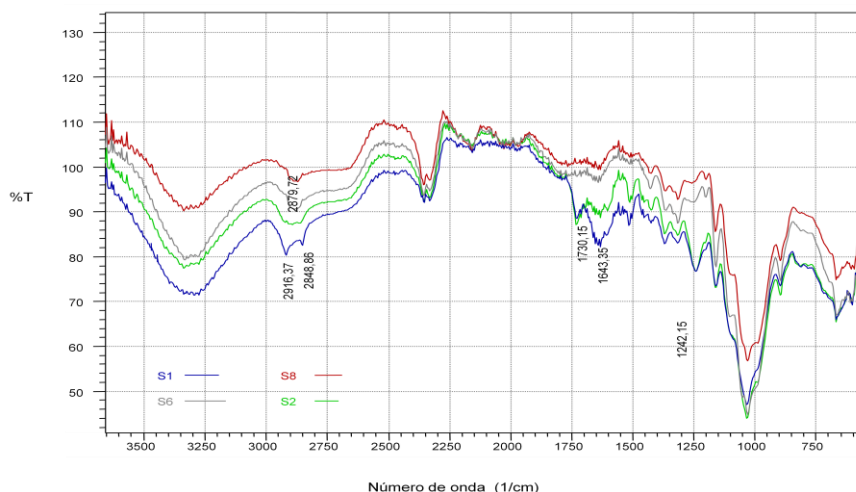
Los residuos de la caña de azúcar sin tratar tenían un contenido porcentual de celulosa en base húmeda de celulosa de 37.6% y de lignina de 21.23% (S1). Después de los pretratamientos, alcanzaron contenidos hasta de 82.85%, 1.36% respectivamente. Además, los sustratos pretratados presentan diferentes contenidos de glucanos desde 72.7 % para S1 hasta 93.9% para S3, lo que aumenta su capacidad de producir azúcares fermentables. Con la obtención de estos ocho sustratos se tiene una gama de sustratos con diferente composición de celulosa, hemicelulosa y lignina, que permitió evaluar las diferentes enzimas hidrolíticas.

Es importante observar el alto contenido de glucanos y bajo contenido de lignina del sustrato sin pretratar de la cosecha de los cogollos y hojas de la caña de

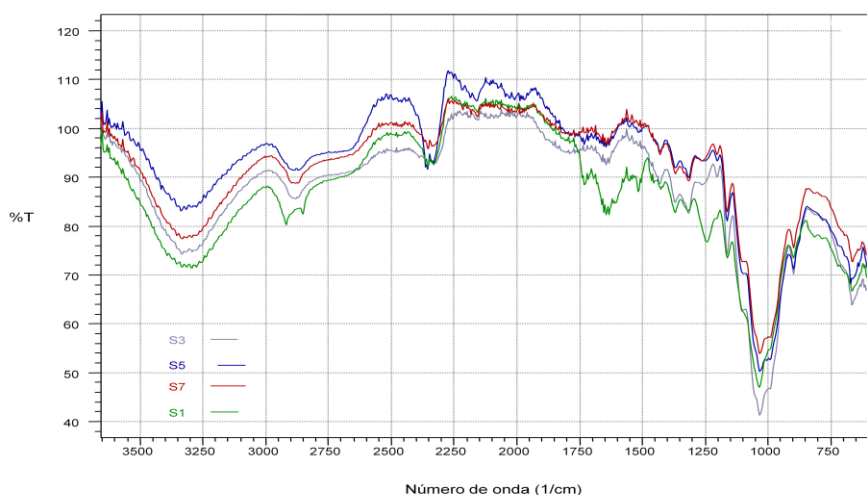
azúcar S1, con respecto a otros sustratos de origen lignocelulósico. Permitiendo a este material un alto potencial para la producción de azúcares reductores.

Si se compara con otros tipos de sustratos tratados mediante procesos con organosolventes, estos sustratos pre tratados, compuestos de hojas y cogollos de los residuos de la cosecha de caña de azúcar presentan un alto grado de deslignificación, que se refleja en el alto contenido de glucanos. Investigaciones realizadas en *pinus radiata* usando acetona-agua muestran una purificación de glucanos desde 45.3% hasta 70.9% y en pajas de caña de azúcar con 5 horas de tratamiento, desde de un contenido porcentual de lignina y celulosa de 21.5%, 39.4% hasta 11.7% y 64 w.t% respectivamente (Araque *et al*, 2008; Saad *et al* 2008). El bagazo de caña de azúcar, con una composición inicial de glucanos de 49.3%, xilanos de 15.65% y lignina insoluble de 27.22%, mediante un pretratamiento usando alcohol como organosolvente alcanzaron un producto de 62.08% de glucanos y 8.71% de xilanos (Meza *et al*, 2010).

3.1.2.1 Análisis FTIR. Los grupos funcionales del sustrato original (S1), son los que presentan mayor intensidad de en el rango de banda de 600 a 3600 cm^{-1} (ver Gráficas 1 y 2).



Gráfica 1. Espectro infrarrojo para los sustratos S1, S2, S6 y S8



Gráfica 2. Espectro infrarrojo de los sustratos S1, S3, S6 y S7

En las bandas de 3020 cm^{-1} a 3600 cm^{-1} se presentan las tensiones OH (Alvez *et al.* 20112; Colom *et al.*, 2003), discriminándose la intensidad de absorción de mayor a menor como S1, S3, (S2, S7), S6, S5 y S8. Las altas tensiones de grupos OH del sustrato S1, dependen de la interrelación entre moléculas que forman enlaces de hidrógeno, siendo los sustratos a los que aplicó pretratamientos con mayores relaciones NaOH los que presentan las menores tensiones OH. Es posible que esta disminución esté relacionada a la eliminación de las tensiones OH que se encuentran en la lignina y hemicelulosa.

La banda 3010 cm^{-1} representa a vibración $=\text{CH}$ del anillo aromático, la banda 2936 cm^{-1} la vibración asimétrica- CH_2 (guaiaxil, siringil) y la banda 2840 cm^{-1} la vibración simétricas- CH_2 de guaiaxil – siringil (Carballo *et al.*, 2004). La mayor intensidad de absorción de estos grupos ligados a la lignina se presenta en el sustrato S1, seguido de los sustratos S3, S2, S7, S6, S5 y S8. Esta información es un indicador de la pérdida de lignina durante los pretratamientos, debido a la remoción de la estructura aromática de la lignina.

Los picos 1246 cm^{-1} y 1201 cm^{-1} se encuentran dentro de la banda (1250 cm^{-1} - 1050 cm^{-1}) que forman parte de enlaces C-O del anillo siringilo en la estructura de lignina (Carballo *et al.* 2004). Se nota una disminución en la intensidad de la de esta banda desde los sustratos S1 y S2, seguido del sustrato S3 hasta el sustrato S8, el cual presenta el menor valor. Igualmente, la disminución de esta banda representa eliminación de lignina.

Las bandas 1030 cm^{-1} , 603 cm^{-1} , 666 cm^{-1} , 1102 cm^{-1} y 1161 cm^{-1} , están relacionados a la tensión asimétrica de los enlaces C-O-C de los anillos de

anhidroglucopiranosas, tensión C-OR y C-O de la vibración del esqueleto de la piranosa (Poletto *et al.*, 2011). El orden del valor en intensidad de mayor a menor es: S3, S2, S1 y S6 y en un menor rango S8, S7 y S5. En este caso, las intensidades están relacionadas directamente con la estructura polimérica de la celulosa.

El pico 1730 cm^{-1} representa los grupos carboxilos, elongaciones C=O no conjugadas en el anillo aromático, se presentan con gran intensidad en los sustratos S1 y S2, con valores insignificantes para S6 y S8 y valores bajos para S3, S5 y S7.

Tabla 5. Descripción de la intensidad de los picos más relevantes del espectro infrarrojo para los diferentes sustratos.

DESCRIPCIÓN DE INTENSIDAD cm^{-1}	S1	S2	S3	S5	S6	S7	S8
a 1730 cm^{-1} : (C=O) Elongaciones C=O no conjugados al anillo aromático	0.054	0.054	0.021	0.013	0	0.034	0
a 1427 cm^{-1} : Vibraciones C-H . CH ₂	0.058	0.041	0.047	0.00069	0.02	0.00069	0.076
a 1327 cm^{-1} : C-H ₂ . CH, Emisiones del anillo siringil	0.082	0.068	0.074	0.037	0.044	0.0418	0.024
a 1315 cm^{-1} : vibraciones C-H ₂ . CH	0.081	0.071	0.08	0.044	0.058	0.048	0.032
a 2916 cm^{-1} : Elongaciones -CH grupos metilos y metileno	0.096	0.057	0.057	0.032	0.028	0.039	0.0025
a 2848 cm^{-1} : enlaces OH saturados	0.084	0.054	0.058	0.036	0.035	0.041	0.0098
a 1242 cm^{-1} : Enlaces C-O anillo siringilo	0.115	0.115	0.049	0.029	0.036	0.026	0.0149

En la Tabla 5 se presenta los valores de los picos más relevantes que muestran diferencias en el espectro infrarrojo, correspondiente a la Gráfica 4, para el sustrato S1 y los sustratos pretratados. Se puede observar, una disminución de los grupos funcionales que conforman la lignina, los valores de intensidad de s a 1730 cm^{-1} y 1242 cm^{-1} que están relacionados con esta estructura aromática, tienen valores semejantes para los sustratos S1 y S2. Caso contrario, al comportamiento de estas bandas con respecto a los demás sustratos pretratados, donde estos valores son altos con relación a los sustratos S3, S5, S6, S7 y S8.

El análisis infrarrojo, permite vislumbrar como los pretratamientos organosolventes son efectivos en la remoción de grupos funcionales relacionados con la lignina.

3.1.3 Perfil de actividades enzimáticas y selección de los cocteles enzimáticos.

El material S1, se sometió a un proceso de reducción de tamaño antes del pretratamientos para garantizar la homogeneidad de la materia prima que sirvió como base para la investigación cuyos resultados se presentan en la Tabla 6. Se observa que el 78.7% del material utilizado en los pretratamientos, tiene diámetros menores de 0.25 mm.

Tabla 6. Análisis granulométrico del sustrato S1, compuesto de residuos de hojas y cogollos de la caña de azúcar sin tratamiento

Tamiz	Diámetro mm	peso g	% (p/p)	% Acumulado
10	2.000	0.6	5.55	5.55
30	0.600	5.3	49.07	54.62
40	0.425	1.2	11.11	65.74
60	0.250	1.4	12.96	78.70
Fondo		2.3	21.29	100

El perfil enzimático obtenido de las diferentes enzimas comerciales donadas por Novozyme® (Coldazyme) y Genencor® internacional, Inc, Merquiand LTDA, se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Perfil de actividades enzimáticas de enzimas comerciales utilizadas en el estudio

Enzima	FPU/ml	Exoglucanasa UI/ml	Endoglucanasa CMC/ml	Xilanasa UI/ml	Betaglucosidasa pNPG U/ml	Galactosidasa UI/ml	Mananasa UI/ml	Ramnosidasa (UI/ml)
Accellerase XY	0.16	0.00	37.0	102.50	0	0	1.53	7.28
Accelerase XC	29.60	0.35	1156.3	44.00	0	25.39	0	0
Klerzyme	0.07	0.50	462.5	1.33	0	177.7	5.55	0
Celluclast	19.47	0.04	1233.3	1.20	0	1.93	2.3	0
Accellerase 1500	37.00	0.56	2846.2	2.60	600	0	0	11.44
Optimash BG	0.15	0.23	740.0	13.30	0	113.96	6.83	0
Pectinasa Ultra	0.19	0.09	132.1	0.00	0	206	16.3	28.17
Rapidase ADEX	0.09	0.12	0.0	0.02	0	211.64	15.6	1.92
Clarex Citrus	0.16	0.13	205.6	2.00	0	277.7	0	0
Viscozyme L	0.25	0.00	462.5	0.02	0	317	14.17	0
Citrozyme Ultra	0.03	0.00	205.6	0.01	0	52.28	2.3	6.45
Accellerase BG	2.46	0.00	308.3	23.19	2500	0	25.83	80.43

A partir del perfil enzimático de cada enzima comercial y utilizando el software Solver de Excel®, se obtuvieron cinco preparados enzimáticos (cocteles) de enzimas (E1, E2, E3, E4, E5) con diferentes actividades enzimáticas, expresadas en unidades de papel filtro, actividad hemicelulasas y betaglucosidasa. Los resultados se tabulan en la Tabla 8.

Tabla 8. Actividad enzimática de los preparados enzimáticos obtenidos a partir de la mezcla de enzimas comerciales

Enzima	Hemicelulasa Global UI/ml	Celulasa FPU/ml	Endoglucanasa (CMC/ml)	Exoglucanasa UI/ml	β Glucosidasa (pNPG U/ml)	Xilanasa (UI/m)	Galactosidasa (UI/ml)	Mananasa (UI/ml)	Ramnosidasa (UI/ml)
E1	14	37	2846	0.56	600	2.6	0	0	11.44
E2	129.4	0.073	308	0	2498	23	0	25.83	5
E3	107	18	1174	0.3	183	25	72	5	5
E4	113.14	9.36	766.3	0.176	275	37.68	83.24	72.9	15.35
E5	52.75	27.53	1782.1	0.377	550	28.23	7.1	2.76	14.63

- Se denominó actividad hemicelulasa global a la suma de las actividades xilanasa, galactosidasa, mananasa y ramnosidasa.

Los preparados enzimáticos presentan una actividad de celulasa entre 0.073 FPU/ml y 37 FPU/ml, una actividad de hemicelulasa desde 14 UI/ml hasta 129.4 UI/ml y una actividad de β glucosidasa entre 183 pNPG/ml 2498 pNPG/ml. Estos preparados enzimáticos se utilizaron para evaluar los ocho sustratos preparados en diferentes concentraciones de unidades de papel filtro (FPU/ g de sustrato), los cuales corresponden a las relaciones E/S utilizadas para cada enzima (ver Tabla 9).

Tabla 9. Unidades de papel filtro (FPU/g de sustrato) para las diferentes relaciones E/S utilizadas en la evaluación de Sustratos pretratados

E/S (ml/g)	E1	E2	E3	E4	E5
0.05	1.85	0.09	0.90	0.46	1.37
0.10	3.70	0.18	1.81	0.93	2.75
0.20	7.40	0.36	3.63	1.87	5.50
0.30	11.1	0.55	5.40	2.80	8.26

3.1.4 Evaluación de los biocatalizadores. En la evaluación de los biocatalizadores, se usó el índice de sacarificación y el índice global de hidrólisis, para lo que se construyeron curvas de progreso para diferentes sustratos y

mezclas de enzimas con relaciones E/S de 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3, los resultados se presentan en el Anexo C.

Para un mejor entendimiento de la interpretación de los diferentes pares enzima/sustrato se especificó la siguiente nomenclatura. Los sustratos se representan por S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 y S8 y los cocteles de enzimas por E1, E2, E3, E4 y E5, de la misma forma, en la leyenda S_iE_{jk} , i representa el sustrato, j el preparado enzimático y k la relación enzima/ sustrato 1, 2, 3 y 4 que corresponde a 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3 respectivamente. Por ejemplo, S1E12 indica el sustrato S1 con el preparado enzimático de E1 y la relación E/S de 0.1.

El índice de sacarificación es un indicativo de la velocidad de hidrólisis del material lignocelulósico con respecto al aumento de los sitios activos de la enzima. Un índice de sacarificación alto significa una alta asociación de los sitios activos al sustrato. Para el cálculo del índice de sacarificación se evaluaron pendientes hasta un tiempo de hidrólisis de 28 horas. No se consideraron tiempos mayores por presentar conversiones (% sacarificación) mayores del 60%, donde se pierde la linealidad de la pendiente que representa el índice de hidrólisis.

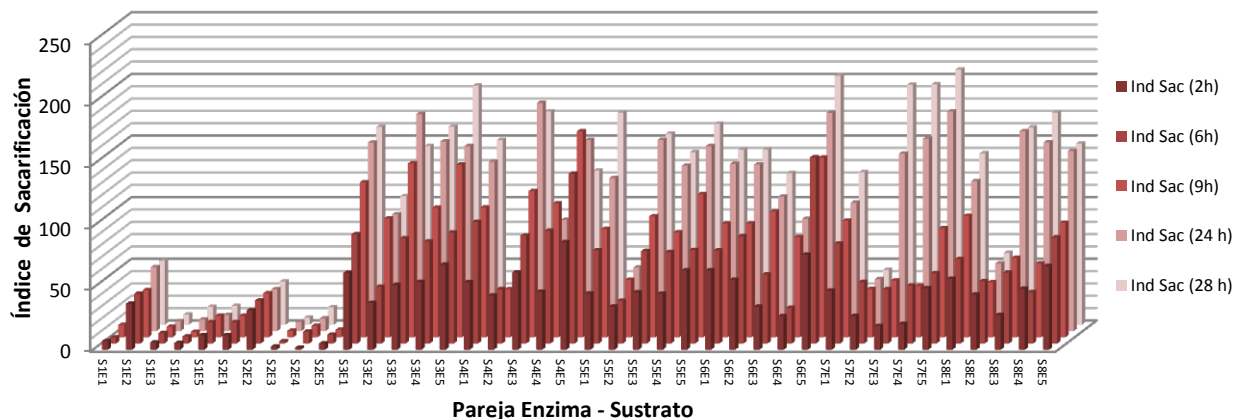
La distribución de los coeficientes de determinación de las 470 pendientes obtenidas a partir de un análisis factorial con las cinco enzimas, ocho sustratos y cinco tiempos (2, 6, 9, 24 y 28 horas) que se utilizaron para la deducción del índice de hidrólisis (ver Tabla 10), se puede representar por una media de 0.9694 con una desviación estándar de 0.0233572, para un nivel de confianza del 95%.

Tabla 10. Resumen Estadístico para r^2 de las 470 pendientes usadas para el cálculo de índice de hidrólisis.

Recuento	470
Promedio	0.969452
Desviación Estándar	0.0233572
Coeficiente de Variación	2.40932%
Mínimo	0.92
Máximo	0.999
Rango	0.079
Sesgo Estandarizado	-2.03013

En la Gráfica 3 (Apéndice 6) se presentan los resultados de los índices de hidrólisis para 2, 6, 9, 24 y 28 horas para las diferentes parejas enzima/sustrato, se puede observar como sustratos con un alto contenido de lignina y hemicelulosa (S1 y S2), producen bajos índices de hidrólisis comparado con los sustratos a los cuales se les ha separado una gran cantidad de lignina inicialmente presente, a través de pretratamientos físicos como son los sustratos S3, S4, S6, S7 y S8.

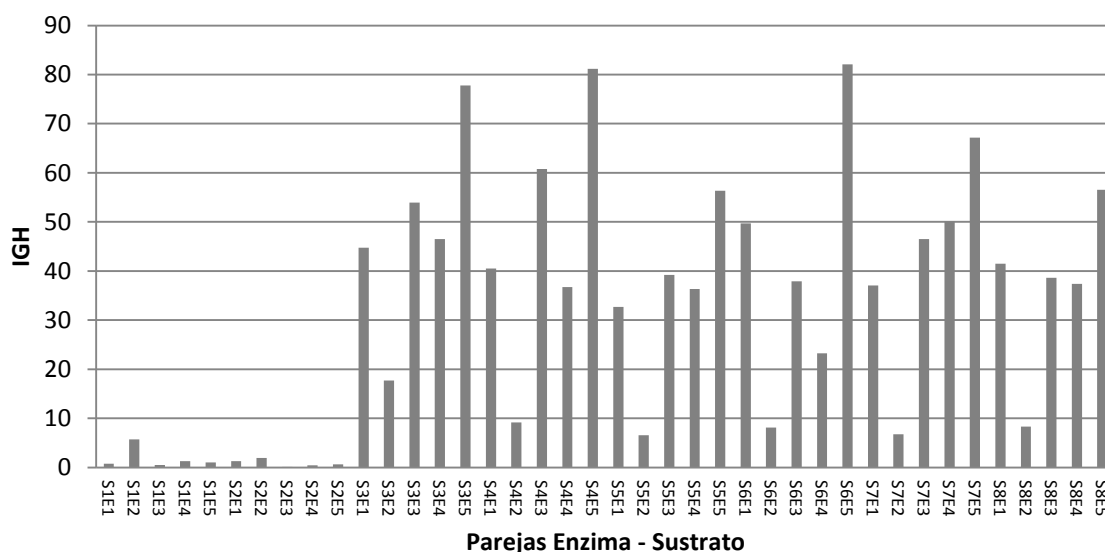
Con relación el preparado enzimático E2, que tiene una baja actividad en unidades de papel filtro (FPU/ml), presenta índices de sacarificación relativamente bajos para los diferentes tiempos de muestreo. Caso contrario, se presenta con las enzimas de de valores medios de FPU/ml y con relaciones equilibradas de actividades celulasas y hemicelulasas (E3, E4 y E5), los cuales producen altos índices de sacarificación. La mezcla enzimática E5 es la que presenta mayor actividad para los sustratos pretratados, observándose también el % de sacarificación aumenta con la relación enzima/sustrato.



Gráfica 3. Índice de sacarificación para las combinaciones sustratos- enzima, divididos en tiempos de 2, 6, 9, 24 y 28 horas

El índice de sacarificación solo, no es un indicador definitivo para definir la actividad de una enzima en un sustrato determinado. Aun cuando el índice de sacarificación indica que tan rápido se hidroliza, no tiene en cuenta el alcance global de la hidrólisis, por lo que se incluyó un nuevo criterio no reportado antes en bibliografía, que incorpore tanto la velocidad de hidrólisis como el grado de conversión, representado por la interacción del producto de la media del índice de hidrólisis con la conversión promedio de hidrólisis (% de hidrólisis), el cual se denominó “**Índice Global de Hidrólisis**” (Ecuación 50). En la Gráfica 4 se muestran los resultados de aplicación de este criterio. Se puede observar como la

enzima E5 presenta el mayor índice global de hidrólisis para sustratos de alto grado de deslignificación como son S3, S4, S5, S6, S7 y S8. Estos resultados se pueden observar en el apéndice 6.



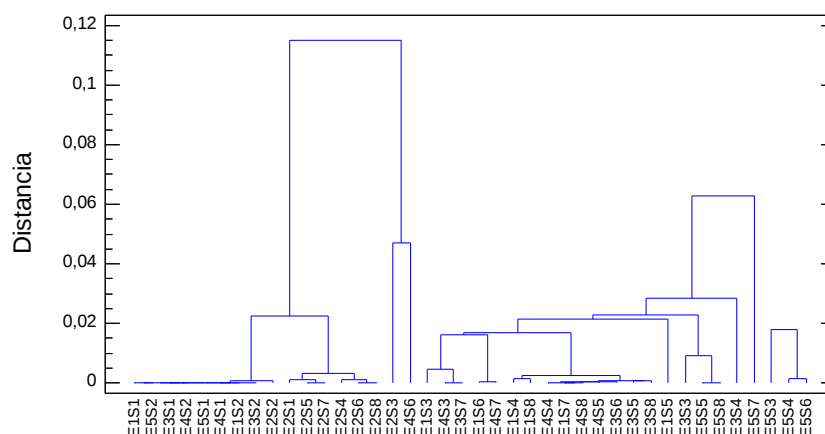
Gráfica 4. Índice Global de Hidrólisis (IGH) para las diferentes parejas enzima-sustrato

Para complementar lo expuesto anteriormente, se implementó un procedimiento para determinar pares de relaciones enzimas/sustrato con características similares, a través del método de conglomeración del vecino más cercano tomando como parámetro la distancia métrica (euclidiana cuadrada).

En la Gráfica 5 se muestran los tres conglomerados, en uno de los cuales la mezcla enzimática E5 se agrupa con los sustratos S3, S4 y S6 que son los pares enzima- sustrato que presentan mayores IGH. Un segundo grupo está representado fundamentalmente por los sustratos que tienen altos números Kappa como son S1 y S2, los cuales presentan un bajo IGH y un tercer grupo de IGHs intermedios, que involucra principalmente la mezcla enzimática E1 con todos los sustratos, excepto los sustratos S1 y S2, siendo la enzima E1 la mezcla enzimática que tiene la mayor actividad expresada en FPU/ml. Es importante acotar que la mezcla enzimática E2 la cual tiene el menor valor de unidades de papel filtro se encuentra en el grupo de menor IGH.

Estos resultados son un indicador del sinergismo que presentan las diferentes actividades de las enzimas y que no es exceso de una actividad, la que determina

la hidrólisis del material lignocelulósico (Adsula *et al*, 2005). Además, es importante observar como el contenido de lignina y el tipo de pretratamiento influyen sobre las actividades de las mezcla enzimáticas, favoreciendo a los sustratos pretratados y con más bajo contenido en lignina, estas conclusiones son consolidadas por investigaciones realizadas por Millet *et al*, (1979), Mais *et al*, (2002) y Wyman, (1996).



Gráfica 5. Dendrograma de índice global de hidrólisis de la distancia mas cercana para los diferentes pares enzima /sustrato

3.1.4.1 Microscopia de barrido electrónico (SEM). La microscopia de barrido electrónico de los sustratos S1, S2, S3, S5, S6, S7 y S8, (ver Ilustración 1, 2), presenta una alta liberación de micro fibras en los sustratos pretratados por organosolvente, con bajo contenido de lignina y alto IGH con respecto al sustrato sin pretratamiento S1, tomado como control y al sustrato pretratado enzimáticamente S2, que presentan un alto contenido de lignina y bajo IGH. Estos resultados refuerzan la afirmación sobre el efecto del contenido de lignina y el pretratamiento sobre la velocidad de hidrólisis. Igualmente, que el objetivo del pretratamiento de materiales lignocelulósicos es intentar desorganizar la estructura cristalina de macro y micro fibras, para liberar las cadenas poliméricas de celulosa y hemicelulosa, modificar los poros en el material para permitir a las enzimas penetrar dentro de las fibras y hacer más fácil la hidrólisis enzimática (Galbe y Sacchi, 2002; Pérez *et al*, 2005; Mosier *et al* 2005)

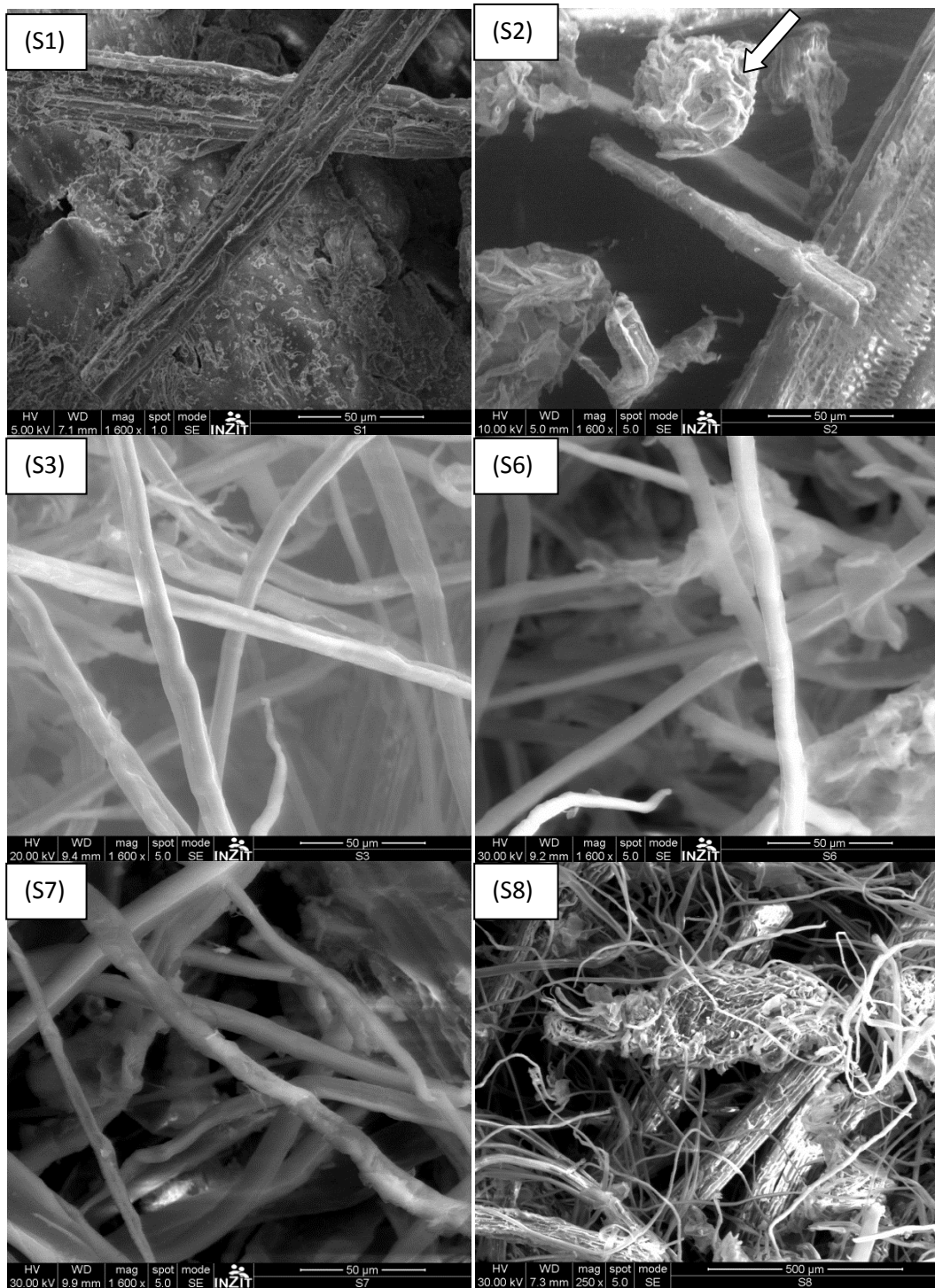


Ilustración 1. Microscopía de barrido electrónico (MEB) S1 (control), S2 (pretratamiento enzimático), S3, S6, S7 y S8 (pretratamiento con organosolvente) realizadas a 50μm.

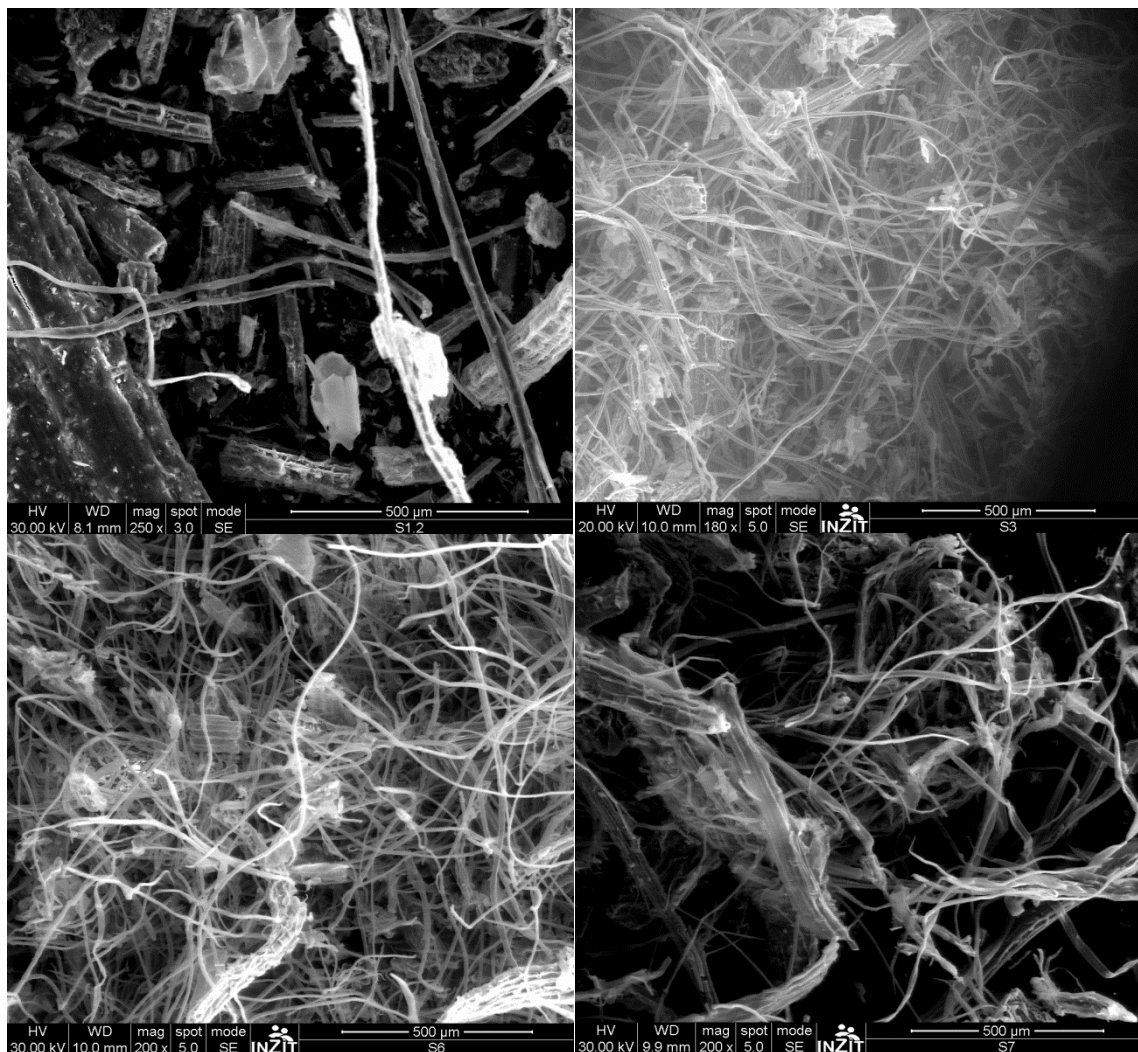


Ilustración 2. Microscopía de barrido electrónico (MEB), S1 (control), S3, S6, S7 (pretratamiento con organosolvente) realizadas a 500μm.

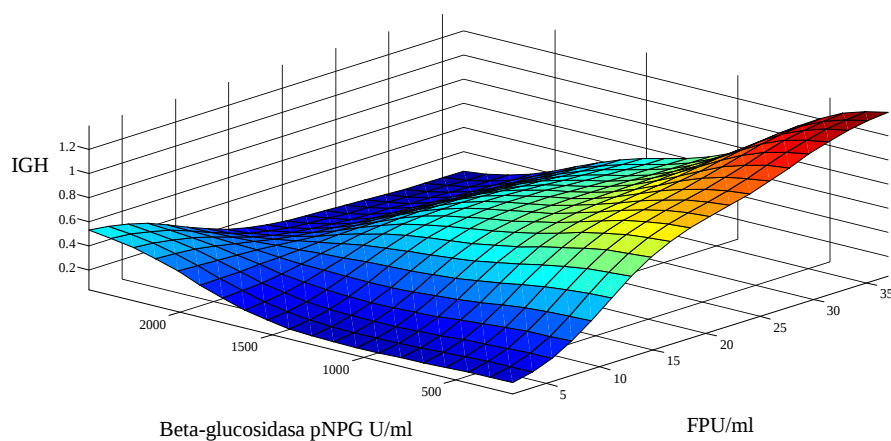
3.1.5 Selección de biocatalizadores usando Lógica Difusa.

El comportamiento de los ocho sustratos involucrados en esta investigación, se pueden visualizar en las Gráficas 6 a 13, como resultado de la aplicación de la simulación a través de lógica difusa.

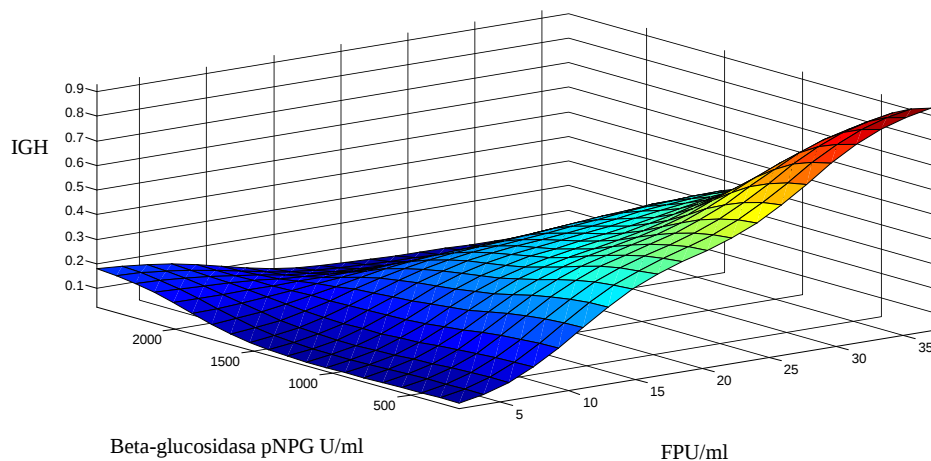
En las Gráficas 6 y 7, se presentan el comportamiento del IGH para los sustratos con mayores contenidos de lignina residual, S1 y S2 en función de las actividades enzimáticas, obteniéndose en ambos casos valores de IGH hasta 1.4, bajos para

cualquier tipo de actividad enzimática. Para estos sustratos, no se usó ningún tratamiento térmico. El resultado obtenido, muestra que el tratamiento enzimático con lacasa, no es lo suficientemente fuerte como para atacar la estructura de la matriz lignocelulósica, deducción que coincide con las microfotografías de las Ilustraciones 1 y 2, donde se observa muy poco desprendimiento de fibra, Además, estos sustratos presentan el espectro infrarrojo con mayor valor de para todos los grupos funcionales.

Se puede afirmar, que independiente del tipo de enzima utilizado, para que se facilite la hidrólisis, se hace necesario un cambio en la estructura del sustrato.

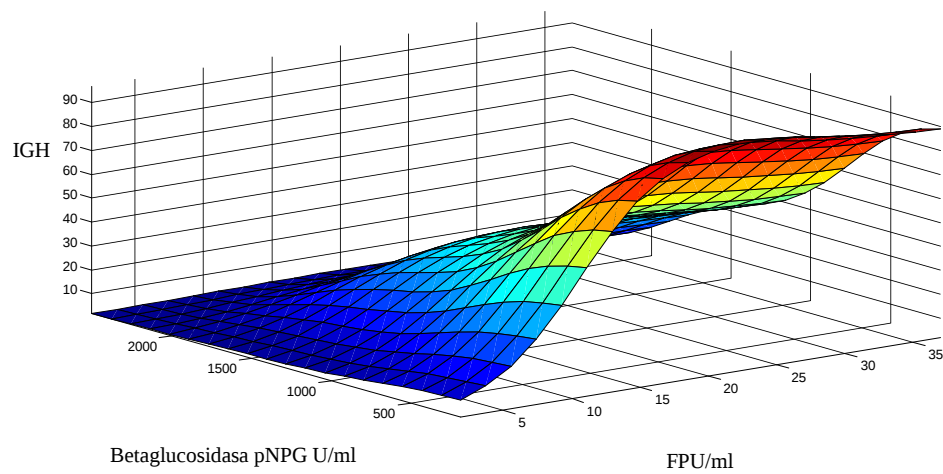


Gráfica 1. Superficie de respuesta del IGH Hidrólisis contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad betaglucosidasa pNPG U/ml, para el sustrato S1 y una actividad de hemicelulasa de 60 UI/ml.

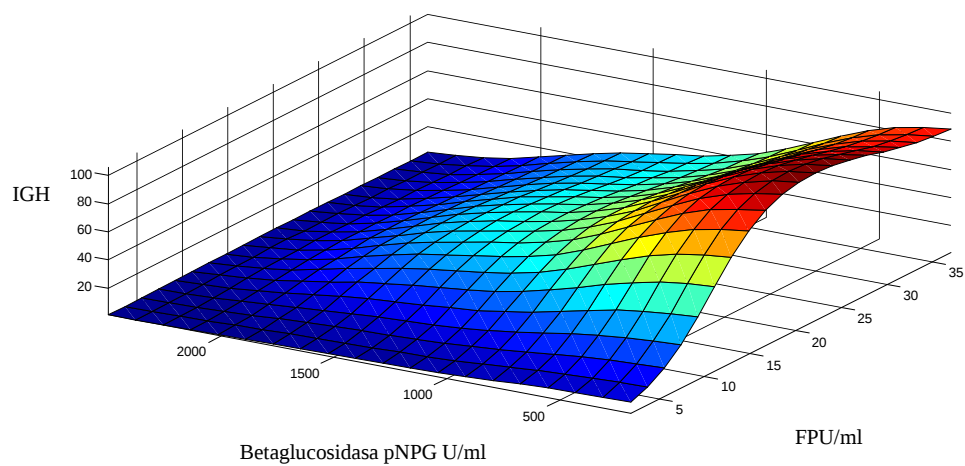


Gráfica 2. Superficie de respuesta del IGH contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad betaglicosidasa pNPG U/ml, para el sustrato S2 y una actividad de hemicelulasa de 60 UI/ml.

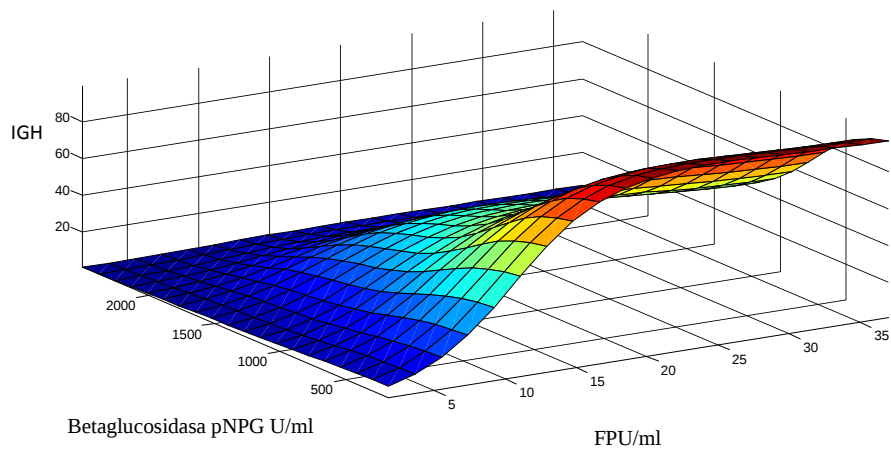
El comportamiento del IGH para los sustratos S3, S4, S6, S7 y S8 se muestra en las Gráficas 8, 9, 10, 11 y 12 respectivamente. Estos sustratos se caracterizan por haber tenido diferentes tipos de pretratamientos, lo que originó sustratos con diferentes contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina para la hidrólisis enzimática. En general, estos sustratos después de la hidrólisis enzimática produjeron altos IGH. Los sustratos S3 y S6, que contienen bajos contenidos de lignina residual, fueron los que presentaron mayores IGH, coincidiendo con lo observado en las microfotografías (MEB) en donde se observa un gran desprendimiento de fibra. Además, presentan el espectro infrarrojo con menores valores de absorbancia para todos los grupos funcionales. En todos estos sustratos pretatados, se observa un techo en la superficie de respuesta para valores de actividad beta-glucosidasa menor que 500 pNPG/ml y unidades papel filtro mayor a 20 FPU/ml, se evidenció como el pretratamiento facilita la hidrólisis.



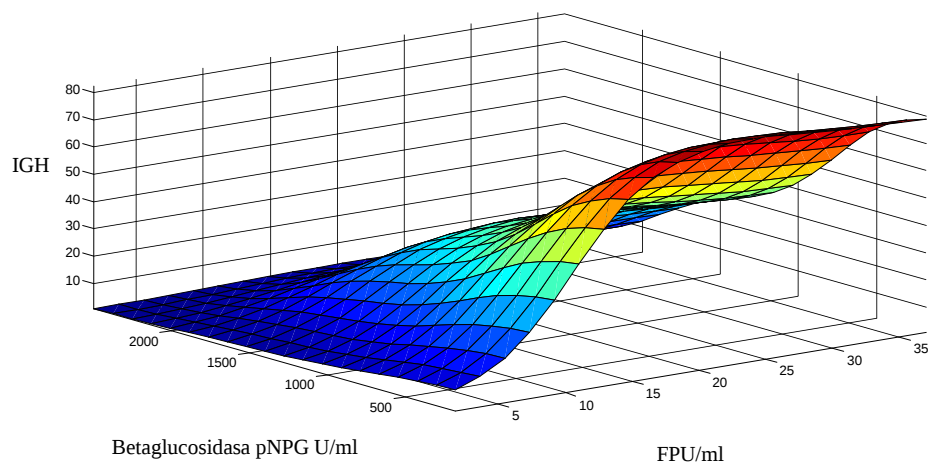
Gráfica 3. Superficie de respuesta del IGH contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad betaglucosidasa pNPG U/ml, para el sustrato S3 y una actividad de hemicelulasa de 60 UI/ml.



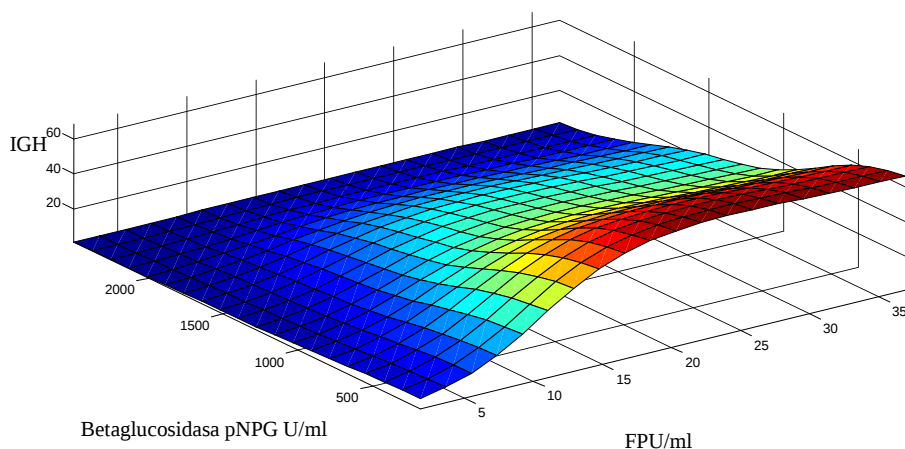
Gráfica 4. Superficie de respuesta del IGH contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad betaglucosidasa pNPG U/ml, para el sustrato S4 y una actividad de hemicelulasa de 60 UI/ml



Gráfica 5. Superficie de respuesta del IGH contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad betaglucosidasa pNPG U/ml, para el sustrato S6 y una actividad de hemicelulasa de 60 UI/ml



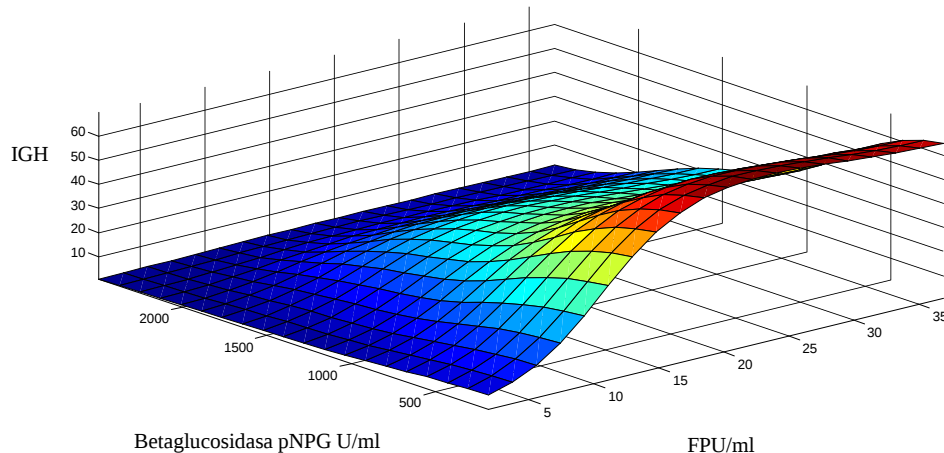
Gráfica 6. Superficie de respuesta del IGH contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad betaglucosidasa p NPG U/ml, para el sustrato S7 y una actividad de hemicelulasa de 60 UI/ml



Gráfica 7. Superficie de respuesta del IGH contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad betaglicosidasa p NPG U/ml, para el sustrato S8 y una actividad de hemicelulasa de 60 UI/ml.

Para el sustrato S5 (Gráfica 13), en su pretratamiento se utilizó una cantidad menor de hidróxido de sodio comparada con los pretratamiento con organosolvente de otros sustratos. El resultado muestra la resistencia del sustrato S5 al ataque enzimático, presentando valores medios de IGH. Estos resultados coincidentes con los presentados en la Gráfica 3, en la cual el sustrato se localizó en el dendograma en el conglomerado de valores medios de IGH. Se observó, que la enzima E5 favorece la hidrólisis del sustrato S5, pero no lo suficiente para alcanzar altos valores de índice globales de hidrólisis.

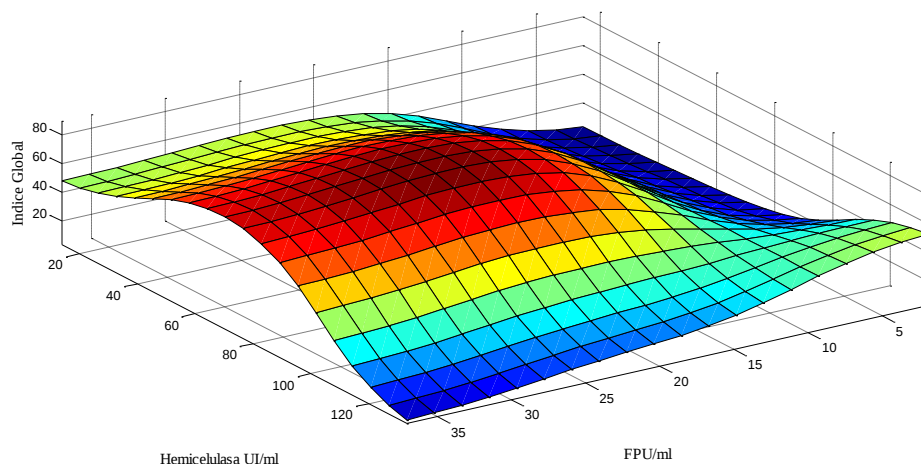
Es importante notar, que para altos valores de actividad celulolítica (FPU/ml), las superficies de respuesta alcanzan un máximo, indicando esto, que el exceso de esta actividad no mejora la hidrólisis. Lo mismo, se observa con la actividad betaglicosidasa (pNPG U/ml). Para los sustratos S3, S4, S5, S6, S7 y S8 el índice global de hidrólisis se favorece para actividad betaglicosidasa menores de 500 pNPG U/ml y actividad celulolítica entre 20 y 30 FPU/ml. Es preciso aclarar, que estas simulaciones son específicas para residuos de la cosecha de la caña de azúcar y la composición de los sustratos se debe suministrar a partir de un análisis composicional experimental.



Gráfica 8. Superficie de respuesta del IGH contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad betaglucosidasa pNPG U/ml, para el sustrato S5 y una actividad de hemicelulasa de 60 UI/ml

En la Gráfica 14, muestra el comportamiento de la actividad hemicelulasa, de acuerdo a la superficie de respuesta se observa máximo para el IGH entre 50 y 80 UI/ml. Los valores de IGH obtenidos de estas actividades para la hidrólisis de este material, permiten concluir que debe existir una sinergia entre ellas, ya que actúan en cantidades apropiadas para obtener una mejor eficiencia en la hidrólisis, de manera parecida a como actúan los microorganismos para ejecutar la hidrólisis natural de materiales lignocelulósicos.

Se presenta, una relación entre los datos de IGH obtenidos a través de las superficies de respuesta obtenidas por los gráficos (6 a 13) y los datos del contenido de lignina de la Tabla 4. Donde, los sustratos con altos contenidos de lignina (S1 y S2) presentan valores bajos de IGH, y los sustratos con bajos contenidos de lignina (S3, S4 y S6) tienen altos valores de IGH. Este resultado es un indicador de efecto del contenido de lignina sobre la eficiencia de la hidrólisis de residuos de la caña de azúcar. Este coincide con lo propuesto por Hetti, 2004; *Berlin et al*, 2005, sobre la importancia del papel de la deslignificación sobre la hidrólisis de la caña de azúcar y sobre la presencia de enlaces no productivos entre la enzima y la lignina y su efecto sobre la eficiencia catalítica de las enzimas.

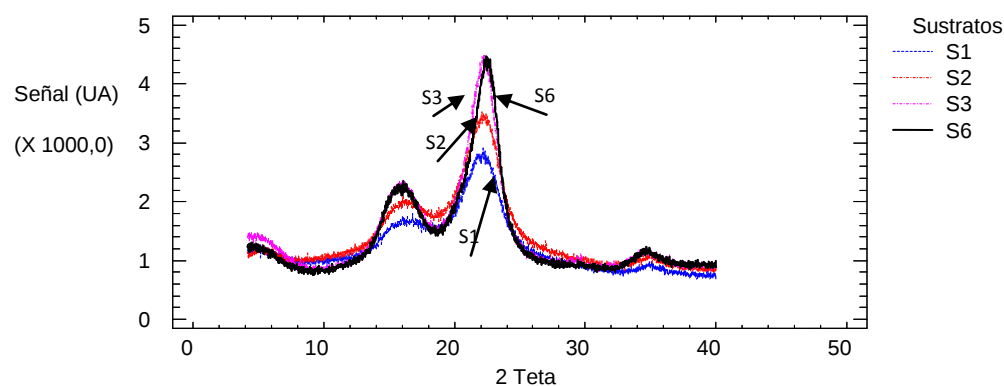


Gráfica 9. Superficie de respuesta del IGH contra la actividad celulolítica FPU/ml y actividad hemicelulasa UI/ml para el sustrato S3 y una actividad beta glucosidasa de 500 pNPG U/ml

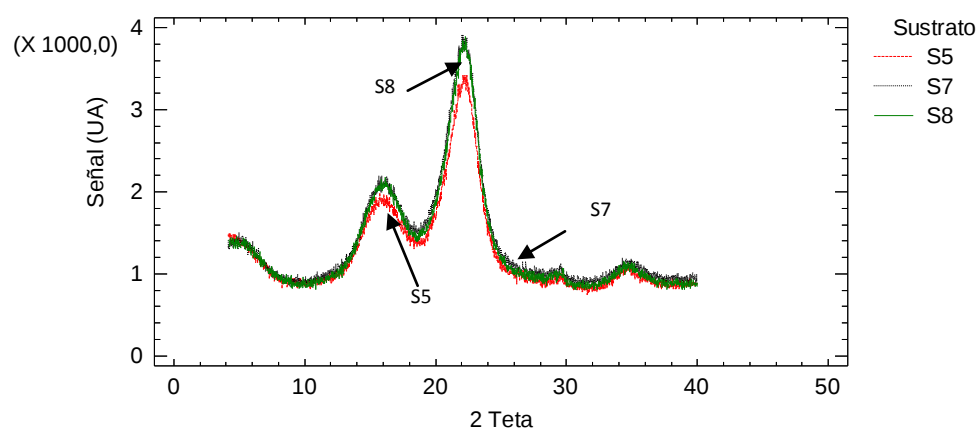
3.1.6 Relación entre la cristalinidad y el Índice Global de Hidólisis (IGH)

En las Gráficas 15 y 16 se presentan los resultados obtenidos del análisis de los sustratos S1, S2, S3, S5, S6, S7 y S8 por difracción de rayos X, en los cuales se observa la formación de tres picos a valores 2θ de 14 y 15, 22 y 23, 34 y 36. Esta información permitió evaluar el índice de cristalinidad, Conversión a celulosa II (CII) y grado de mercerización de celulosa % CII, según Segal *et al*, 1959; Ranby, 1952 y Zhang *et al*, 1993 respectivamente, cuyos resultados se muestran en la Tabla 11.

Los resultados muestran que el sustrato S6 presenta el mayor índice de cristalinidad (64.24), seguido del sustrato S3 (62.17), siendo el de menor índice de cristalinidad el sustrato de control S1 (41.44), indicando que el pretratamiento ataca la red cristalina produciendo una migración de la estructura amorfa contenida en los materiales lignocelulósicos como son la lignina, hemicelulosa y celulosa amorfa, ocasionando en la matriz lignocelulósica un aumento de la celulosa (CI).



Gráfica 10. Difractograma de rayos X para los sustratos S1, S2, S3 y S6



Gráfica 11. Difractograma de rayos X para los sustratos S5, S7 y S8

La conversión a CII, es un indicador del contenido de celulosa amorfa, relativa a las diferentes muestras tratadas. Un valor de CII mayor que cero es una predicción de celulosa amorfa y un sustrato con un valor de (0.0) indica que esta constituida solamente por celulosa cristalina. Los sustratos S6 (0.313) y S3 (0.324), tienen los valores más bajos de CII. Caso contrario, la conversión CII del sustrato S1 (0.395) representa el mayor valor de todos los sustratos. Los sustratos S1 y S6 son los sustratos con mayor y menor cantidad de celulosa amorfa respectivamente.

Tabla 6. Índice de cristalinidad (ICr), conversion de Cristalinidad (CII) y grado de mercerización para los sustratos S1, S2, S3, S5, S6, S7 y S8.

Sustrato (lignina residual)	ICr, Índice de Cristalinidad (Segal, 1959)	Conversión CII (Ranby, 1952)	Grado mercerización de celulosa CII % (Zhang, 1993)
S1 (7.12)	41.41	0.395	100.00
S2 (7.18)	46.76	0.377	77.39
S3 (0.91)	62.17	0.324	13.29
S5 (1.93)	56.54	0.343	35.89
S6 (1.83)	64.24	0.313	0.00
S7 (2.82)	57.85	0.341	33.77
S8 (2.25)	58.61	0.357	53.74

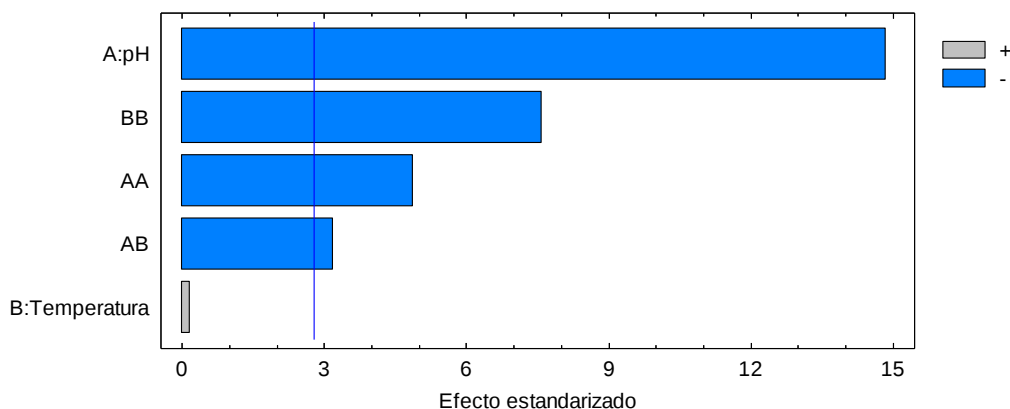
Los resultados obtenidos en este trabajo para el contenido de lignina, cristalinidad, MEB y FTIR corroboran el argumento, que la separación de la matriz amorfa del material lignocelulósico, debido a los pretratamientos, produce una disminución del contenido de lignina y un aumento de la cristalinidad, que conduce a facilitar la hidrólisis enzimática. También, se puede concluir que el pretartamiento conduce a un aumento de celulosa I y II, pero debido a la naturaleza compleja del sustrato original (S1), no se puede determinar si existe conversión de CI a CII.

Iguamente, se observa el efecto del pretratamiento con organosolvente, aumentando la cristalinidad de las muestras. El comportamiento de los indicadores propuestos en este trabajo es similar, lo que permite concluir que el pretratamiento ayuda a eliminar las barreras que impiden una efectiva hidrólisis enzimática de hemicelulosa y la lignina, factor importante en lageneracion de azúcares a partir de los residuos de la caña de azúcar.

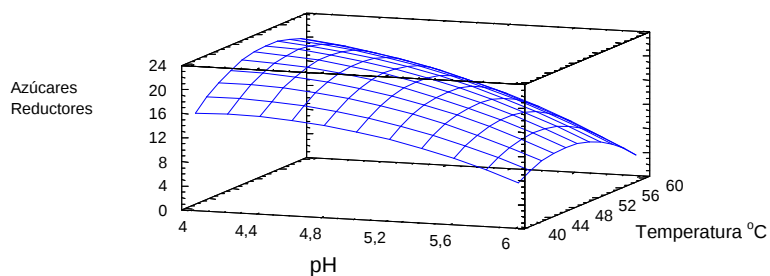
3.1.7 Evaluación de las condiciones de operación pH y Temperatura. Para esta evaluación, se seleccionó el par enzima – sustrato E5-S3, el cual presentó un alto IGH. La superficie de respuesta mostró una correlación de 0.9864 a un nivel de confianza del 95%. El pH tiene un mayor efecto con respecto a la temperatura en la producción de azúcares reductores como se observa en el diagrama de Pareto en la Gráfica 17.

En la Gráfica 18 se observa que la superficie de respuesta para el sustrato S3 presenta un área de hidrólisis máxima con una temperatura cercana a los 50 °C y a un pH entre 4 y 4.4, con esta superficie se relizó un análisis del comportamiento de la actividad de la enzima a una temperatura de 50 °C, variando el pH, que se muestra en la Gráfica 19. En esta Gráfica, se presenta el cambio de los azúcares

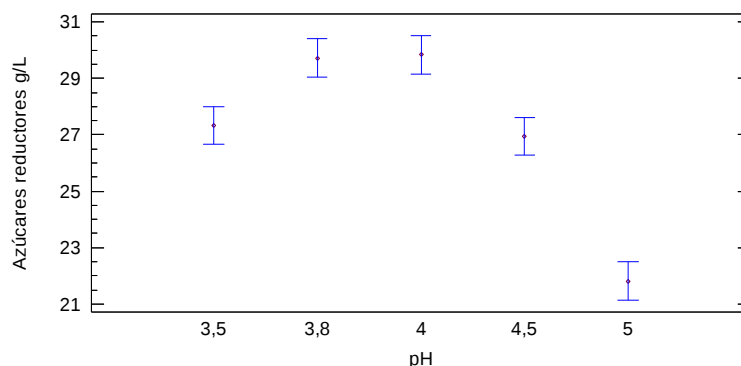
reductores producidos en la hidrólisis del sustrato S3 en un rango de pH cerca del punto máximo de producción, generados por la superficie de respuesta. Se encuentra un valor máximo a un pH entre 3.8 y 4.2.



Gráfica 12. Diagrama de Pareto estandarizado, indicando las contribuciones del pH y Temperatura



Gráfica 13. Superficie de respuesta de la hidrólisis de S3 en función de la temperatura y el pH con la enzima E5



Gráfica 14. Medias de azúcares reductores para la hidrólisis de S3 en función del pH a 50 °C

Estos resultados para esta mezcla de actividades enzimáticas, están dentro de los rangos propuestos por Genecor® (2010) para mezclas de enzimas comerciales, que indica que para actividad endoglucanasa y exoglucanasas se recomienda trabajar a temperaturas entre 50 y 60 °C a pH 4.5; endoglucanasa y xilanasas a temperaturas entre 45 y 65 °C a pH entre 3.5 y 6.5. En forma similar, para betaglucosidasa se recomienda temperaturas entre 30 y 55 °C a pH entre 4 y 6 y para hemicelulasas a temperaturas entre 50 y 75 °C, pH entre 4 y 7.

3.2 MODELO CÍNÉTICO.

Para la evaluación de los diferentes modelos cinéticos planteados en esta investigación, se seleccionó el sustrato S6 por su bajo contenido en lignina y la mezcla enzimática E5, que se encuentra en los rangos de actividades enzimáticas que presentaron mejor IGH. Además, en el análisis hecho a través de lógica difusa, este par, reveló tener un gran potencial para hidrólisis.

Inicialmente, se determinaron los parámetros del modelo cinético de Michaelis-Menten, seguidamente se evaluaron los parámetros de inhibición por sustrato y por último se evaluó la inhibición por producto.

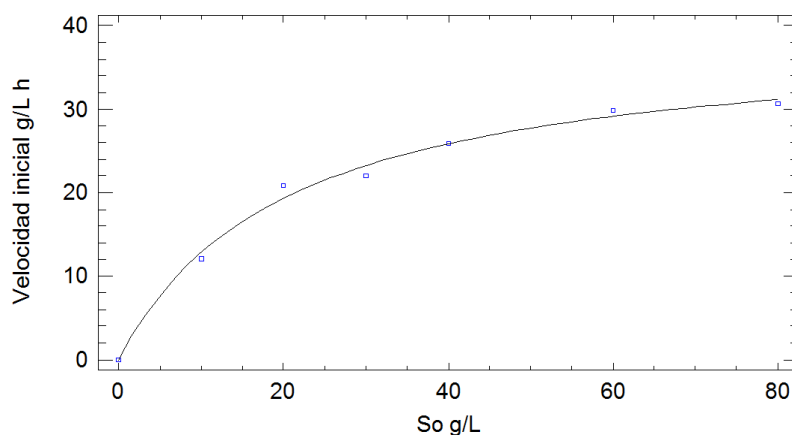
3.2.1 Evaluación de parámetros cinéticos del modelo de Michaelis-Menten e inhibición por sustrato. Los datos que se utilizaron en la construcción de las curvas de progreso para la producción de azúcares reductores en la hidrólisis del sustrato S6 con sus respectivas desviaciones estándar se presentan en la Tabla 12. X1, X2, X3, X4, X6, X8 y X12 representan las conversiones globales promedios, que están referidas a todos los azúcares reductores involucrados en la reacción de hidrólisis, para concentraciones iniciales de sustrato de 10, 20, 30,

40, 60, 80 y 120 g/L, relaciones E/S 1.5, 0.75, 0.5, 0.375, 0.25, 0.187, y 0.125 ml/g que corresponden a 41.3, 20.64, 13.76, 10.32, 6.88, 5.09 y 3.44 FPU/g de sustrato respectivamente.

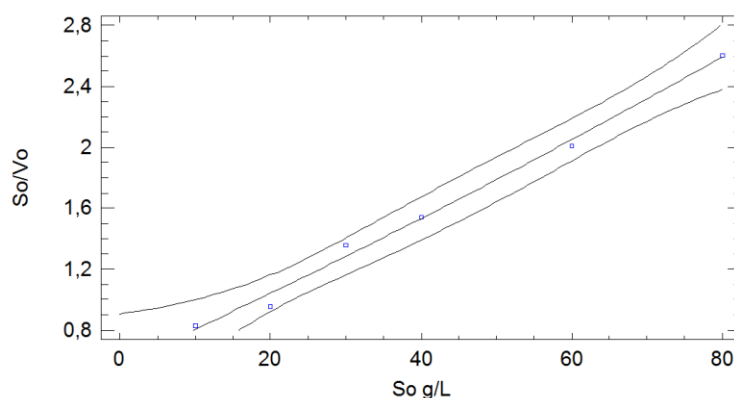
Con estos datos se valoró la velocidad inicial de hidrólisis obtida al evaluar la pendiente cuando el tiempo tiende a cero, con un coeficiente de determinación (r^2) por encima de 0.99 de una regresión polinómica de tercer orden, de la curva obtenida al graficar la conversión (X) contra el tiempo para cada relación enzima/sustrato. Los resultados de la velocidad inicial en función de la concentración inicial de sustrato, se presentan en la Gráfica 20, la cual permitió determinar las constantes del modelo de Michaelis-Menten, como son la velocidad máxima $V_{\max}$ y la constante de Michaelis k_m . Para establecer las constantes de inhibición por sustrato se utilizó un modelo matemático de segundo orden (Ecuación 23), generados al graficar la relación entre la concentración inicial y la velocidad inicial de hidrólisis (V_0/S_0) obtenida de la Gráfica 21 contra concentración inicial de sustrato (S_0). Los coeficientes a, b y c que se usaron para determinar las constantes cinéticas de inhibición por sustrato, descritos en la Ecuación 22, son los siguientes: $a = 0.576658$, $b = 0.0225541$ y $c = 0.0000332165$

Tabla 7. Conversiones globales de azúcares reductores para diferentes tiempos de hidrólisis de residuos de cosecha de caña de azúcar, para concentraciones iniciales de sustrato (10, 20, 30, 40, 60, 80 y 120 g/L), para el sustrato (S6)

Tiempo- h	X1 E/S (1.5)	X2 E/S (0.75)	X3 E/S(0.5)	X4 E/S(0.375)	X6 E/S(0.25)	X8 E/S(0.187)	X12 E/S(0.125)
0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	0.452	0.351	0.302	0.235	0.160	0.112	0.094
1.0	0.665	0.581	0.410	0.378	0.241	0.161	0.153
1.5	0.817	0.650	0.523	0.437	0.304	0.233	0.129
2.0	0.853	0.689	0.578	0.488	0.355	0.274	0.149
3.0	0.924	0.831	0.642	0.564	0.437	0.316	0.206
6.0	0.944	0.907	0.777	0.697	0.548	0.442	0.251
9.0	0.959	0.927	0.856	0.708	0.583	0.466	0.390
24.0	0.965	0.928	0.882	0.858	0.743	0.659	0.529
27.0	0.965	0.946	0.884	0.873	0.765	0.713	0.596
33.0	0.967	0.970	0.893	0.884	0.769	0.727	0.650
48.0	0.973	0.977	0.899	0.898	0.843	0.759	0.710
51.0	0.974	0.977	0.907	0.908	0.841	0.784	0.742
Desv. Estándar promedio	0.01	0.009	0.0125	0.0099	0.0077	0.002	0.004



Gráfica 15. Velocidad inicial de hidrólisis contra la concentración inicial de sustrato



Gráfica 16. Concentración inicial de sustrato So/velocidad inicial de reacción (Vo) en función de concentración inicial de sustratos So

Los resultados de las constantes cinéticas se presentan en la Tabla 13. Se puede observar que no hay una diferencia estadística entre el modelo de Michaelis – Menten y la inhibición incompetitiva por sustrato. En este último modelo la constante de inhibición por sustrato k_s es 20 veces mayor que k_m . Un análisis del valor de la constante del modelo cinético de inhibición incompetitiva, conduce a despreciar el término adicional de inhibición (S^2/k_s) con respecto a la constante de Michaelis - Menten, ya que no genera un cambio sobre el resultado de la velocidad de hidrólisis. Con estos argumentos, se puede afirmar que la inhibición por sustrato no tiene un papel importante en el modelo cinético en el caso de este estudio. Además, el modelo de inhibición no competitiva por sustrato no aplica por presentar valores k_m negativos.

Tabla 8. Constantes cinéticas del modelo de Michaelis- Menten e inhibición por sustrato

Modelo	$V_{\max}$ (g/L*h)	K_m (g/L)	K_s (g/L)	r^2
Michaelis- Menten	39	20.37		0.992
Inhibición incompetiva por sustrato^a	44	25.56	684	0.993
Inhibición incompetiva por sustrato^b	39	20.37	934000	0,993
inhibición no competitiva por sustrato	35.18	--- ^c	856	0.995

a. regresion no lineal Marquant

b. regresión polinomial de segundo orden

c. Km negativa

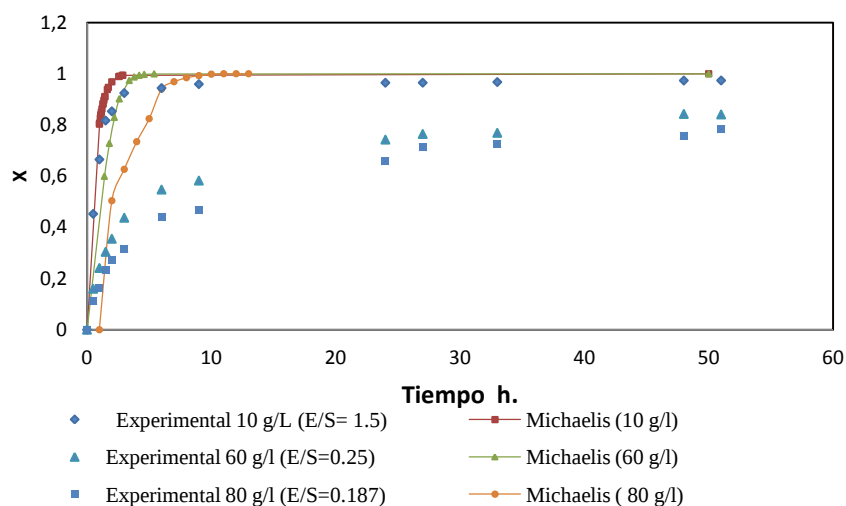
Las constantes de modelos cinéticos, cuando se usan sustratos de origen celulósico son muy variadas, por lo general están dirigidas a sustratos con alto grado de pureza en celulosa, como avicel, (Ohmine et al, 1983), celulosa en polvo (Fujii et al, 1991), por lo que es difícil hacer las comparaciones con sustratos obtenidos de residuos de caña. En el modelo de Michaelis- Menten obtenido en este estudio la relación de V_m con respecto K_m es baja (1.91), lo que explica que existe una mediana afinidad de la enzima hacia el sustrato, reflejándose en bajas velocidades de hidrólisis.

3.2.2 Evaluación de parámetros cinéticos para la inhibición por producto.

Para visualizar el efecto de los inhibidores sobre la producción de azúcares en la hidrólisis de residuos de la cosecha de la caña de azúcar, inicialmente se compararon los datos arrojados por el modelo de Michaelis-Menten y los datos experimentales que se obtuvieron en la hidrólisis (ver Gráfica 22). Se observa que a medida que disminuyen los sitios activos en la matriz enzimática, reflejada por la disminución de la relación E/S, aumenta la diferencia entre el modelo de Michaelis-Menten y los datos obtenidos experimentalmente, por lo que se produce una disminución de la velocidad de hidrólisis, representada por la disminución de la conversión con el tiempo. Además, se puede percibir como el modelo representado por la Ecuación de Michaelis-Menten describe una máxima producción de azúcares reductores comparados con los reportados experimentalmente. Esto es entendible, debido a que el modelo de Michaelis, se evaluó teniendo en cuenta velocidades iniciales, donde los productos inhibidores eran muy pequeños y no incidían sobre la velocidad de reacción.

La disminución de la conversión, entre las curvas de Michaelis y experimentales con una misma relación E/S, es un indicador de la existencia de productos inhibidores en la hidrólisis de sustratos de los residuos de la cosecha de caña de

azúcar. Los modelos cinéticos se dividieron en modelos con un solo inhibidor (Grupo I) y modelos cinéticos con inhibición simultánea (Grupo II).

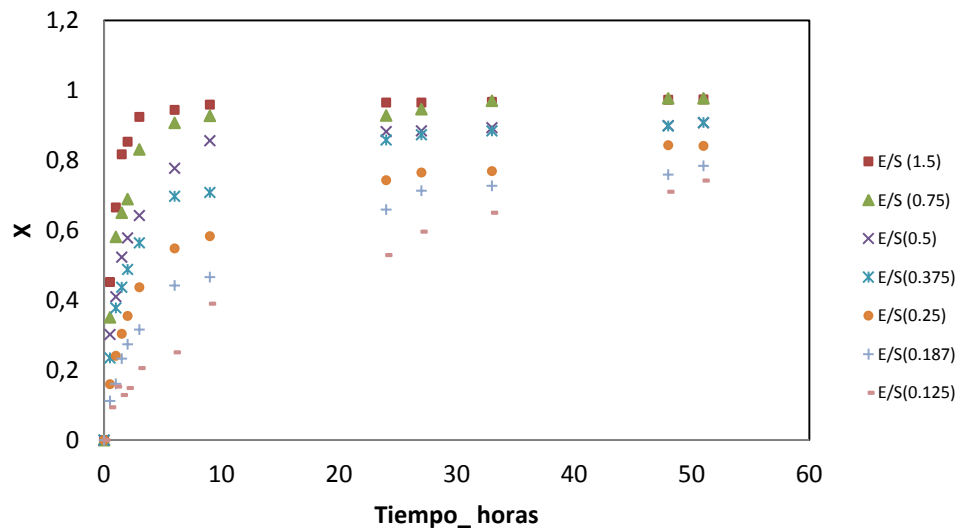


Gráfica 17. Comparación de curvas de progreso del modelo de Michaelis – Menten, con curvas de progreso obtenidas a diferentes relaciones E/S (1.5, 0.25 y 0.187)

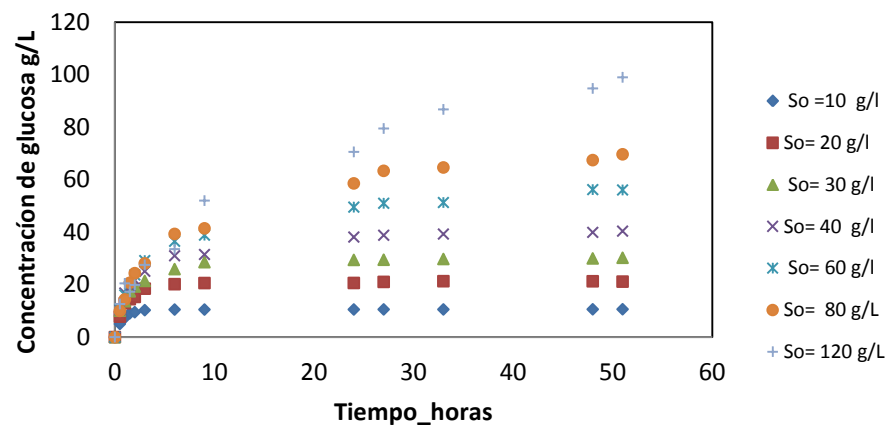
3.2.2.1 Análisis de modelos del grupo I. En el desarrollo de los modelos del grupo I, fue necesario encontrar una relación matemática entre la relación E/S, la conversión total y el contenido de glucosa (ver Ecuaciones 55, 56 y 57), a partir de los datos experimentales; relación matemática que permitió resolver analíticamente las ecuaciones diferenciales. Las Gráficas 23 y 24 presentan las curvas de progreso para la conversión total y el contenido de glucosa, datos que suministran la información necesaria para obtener la relación entre conversión y el contenido de glucosa.

En la evaluación de los parámetros de inhibición por producto del grupo I, se tomaron dos criterios. Uno que tiene que ver con la inhibición por glucosa y otro con la inhibición de todos los productos (inhibición total por producto) con extremos reductores, expresado como conversión (X). La solución de los modelos cuyos valores consistió en encontrar el valor de las constantes cinéticas para las diferentes ecuaciones planteadas en este grupo de modelos, cuyos valores se presentan en las Tablas 14 y 15. Es importante tener en cuenta, que los argumentos utilizados para la evaluación de los modelos del grupo I, son una

primera aproximación para la obtención de los parámetros cinéticos, que deben ser validados con los datos experimentales.



Gráfica 18. Curvas de progreso de la conversión para relaciones E/S de 1.5, 0.75, 0.5, 0.375, 0.25, 0.187 y 0.125



Gráfica 19. Producción de glucosa durante la hidrólisis para diferentes concentraciones iniciales de sustrato S_o (10, 20, 30, 40, 60, 80, 120), que corresponden a (1.5, 0.75, 0.5, 0.375, 0.25, 0.187, 0.125 relaciones E/S respectivamente).

$$Glu = \frac{A_o}{(k+1)} e^{[(k+1)X-1]} \quad (55)$$

$$A_o \left(\frac{g}{l} \right) = 0.0037S_o^2 + 0.0058S_o + 18.45 \quad ; \quad r^2=0.9996 \quad (56)$$

$$k = 0.0205S_o + 0.1483 \quad r^2=0.9961 \quad (57)$$

Tabla 9. Constantes cinéticas (K_i , K_{ij} g/L) de los modelos evaluados para diferentes concentraciones iniciales de Sustrato y relaciones E/S (50 °C y pH 4.2)

So E/S	10 g/L E/S (1.5)			20 g/L E/S (0.75)			30 g/L E/S (0.5)			40 g/L E/S (0.375)			60 g/L E/S (0.25)			80 g/L E/S (0.187)			120 g/L E/S(0.125)		
	K_i	k_{ij}	r^2	K_i	K_{ij}	r^2	k_i	k_{ij}	r^2	k_i	k_{ij}	r^2	k_i	k_{ij}	r^2	k_i	k_{ij}	r^2	k_i	k_{ij}	r^2
IIC1	1.77		0.58	2.83		0.79	2.44		0.76	2.78		0.892	2.53		0.96	2.51		0.96			
ITP1	0.504		0.57	0.81		0.795	0.69		0.748	0.79		0.895	0.73		0.961	0.70		0.965	0.55		0.98
ITP2	0.05		0.32	0.19		0.486	0.34		0.579	0.53		0.724	0.89		0.850	1.29		0.903	1.83		0.96
ITP3	0.42	0.15	0.527	0.542	0.168	0.618	0.85	0.29	0.84	1.07	0.50	0.861	1.61	0.87	0.931	2.38	1.31	0.943	4.00	1.88	0.969

Nota: inhibición no-competitiva no se presenta por tener r^2 muy bajos

Tabla 10. Constantes cinéticas (k_i , k_1 y k_2 g/L) de los modelos IC, INC, IIC y INCM para diferentes relaciones E/S a 50 °C y pH 4.2

	IC		INC		IIC		INCM		
So g/L	ki g/L	r ²	Ki g/L	r ²	Ki g/L	r ²	K1 g/L	k2	r ²
10 (E/S=1.5)	0,34	0,472	0,389	0,457	0,08	0,301	6,50E+07	0,346	0,472
20 (E/S=0.75)	0,55	0,675	0,632	0,655	0,15	0,441	1,88E+09	0,519	0,696
30 (E/S=0.5)	0,49	0,869	0,794	0,824	0,26	0,678	1,45E+11	0,49	0,869
40 (E/S=0.375)	0,43	0,896	0,915	0,834	0,379	0,705	1,03 E+11	0,546	0,896
60 (E/S=0.25)	0,464	0,966	0,903	0,920	0,564	0,847	2,8E+11	0,464	0,962
80 (E/S=0.187)	0,448	0,973	1,257	0,936	0,815	0,907	3,24E+08	0,448	0,973
120 (E/S=0.125)	0,427	0,978	1,78	0,971	1,352	0,966	3,8	0,66	0,976

Nota:

IC= Inhibicion competitiva

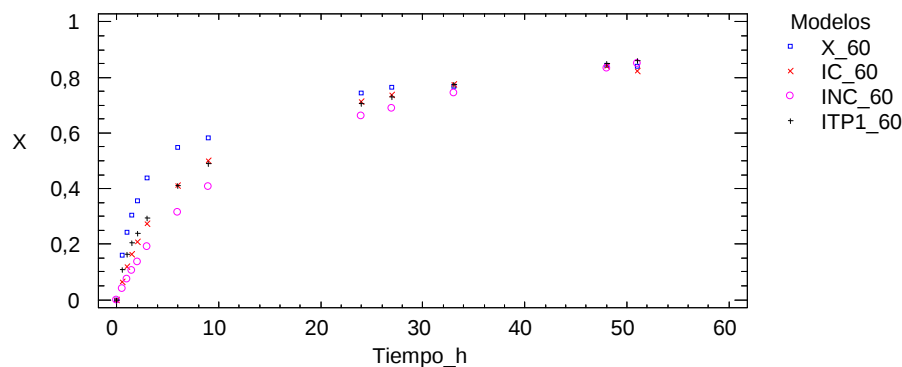
INC= Inhibicion No-competitiva

IIC= Inhibicion incompetitiva

INCM= Inhibicion nocompetitiva y mezclada

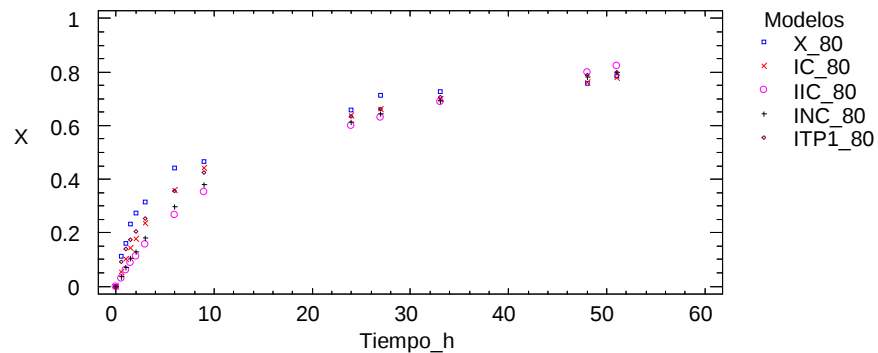
Los modelos del grupo I, que presentan un mayor coeficiente de determinación se encuentran por debajo de relaciones enzima/sustrato de 0.375, donde el efecto de los inhibidores es importante debido a su alta concentración y baja concentración de enzima. Para el análisis estadístico de estos modelos cinéticos, se seleccionaron aquellos modelos que tuvieron mayor índice de correlación.

La simulación para una relación E/S de 0.25, a través de POLYMATH® 6.0 y MATLAB® se presenta en la Gráfica 25. Donde se muestra la relación entre los modelos de inhibición competitiva, incompetitiva, no-competitiva y mezclada por glucosa y el modelo de inhibición competitiva total por producto (IC, IC, INC, y ITP1) comparados con los datos experimentales para concentración iniciales de 60 g/L (X_{60} , $E/S = 0.25$)



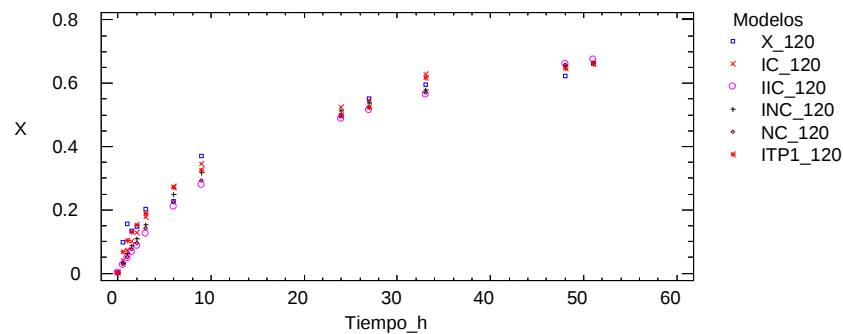
Gráfica 20. Curvas de progreso de las simulaciones de modelos cinéticos comparada con la conversión a partir de datos experimentales X_{60} para concentración inicial de sustrato S_0 (60 g/L, $E/S=0.25$)

Para los modelos de concentración inicial de 80 g/L ($E/S=0.187$), los resultados muestran una semejanza a los del caso anterior siendo los modelos ITP1 e IC, los que mejor se ajustan con los datos experimentales X_{80} (ver Gráfica 26)



Gráfica 21. Curvas de progreso de las simulaciones de modelos cinéticos comparada con la conversión a partir de datos experimentales X₈₀ para concentración inicial de sustrato (80 g/L, E/S=0.187)

Para modelos cinéticos de concentración inicial de 120 g/L (E/S=0.125), los resultados muestran una semejanza a los del caso anterior, (ver Gráfica 27).



Gráfica 22. Curvas de progreso de las simulaciones de modelos cinéticos comparada con la conversión a partir de datos experimentales X₁₂₀ para concentración inicial de sustrato So (120 g/L, E/S=0.125)

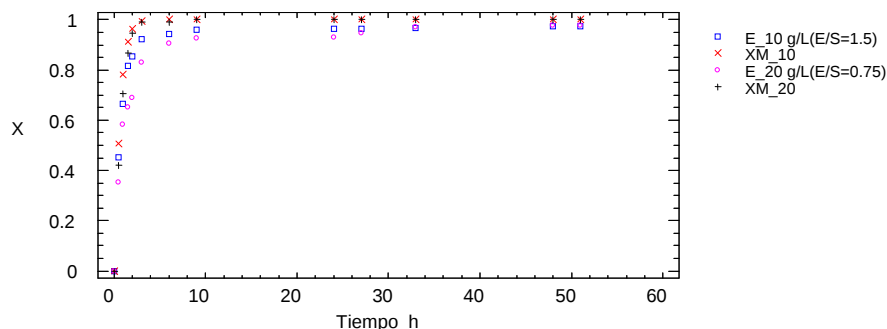
En la Tabla16 se presentan las correlaciones momento producto de Pearson, entre cada par de variable (modelos y datos experimentales) mostrando una mayor relación lineal para los modelos ITP1 y IC para todos los casos

Tabla 11. Correlaciones momento producto de Pearson, entre los modelos cinéticos del grupo I y sus datos experimentales

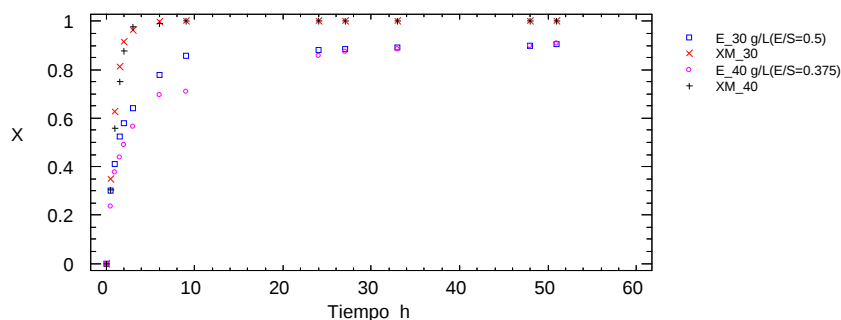
	IC_60	INC_60	ITP1_60		
X_60	0,9836	0,9623	0,9845		
	IC_80	INC_80	ITP1-80	IIC-80	
X_80	0,9938	0,97841	0,9933	0,9748	
	IC_120	INC_120	ITP_120	IIC_120	INCM_120
X_120	0,9920	0,9909	0,9936	0,9896	0,9918

Los modelos cinéticos que presentaron mayor interés fueron: el modelo cinético de inhibición total por producto ITP1 e inhibición competitiva, siendo estos modelos cinéticos los que mejor se ajustan a los datos experimentales, afirmación que concuerda con los modelos propuestos por Andric *et al* (2010) quienes indican que los modelos de inhibición más comunes en este tipo de reacciones es la inhibición competitiva, reportando constantes de inhibición K_i (g/l) entre 0.01 y 54. La National Renewable Energy Laboratory (NREL), usando como sustrato residuos de la cosecha de maíz propuso modelos de inhibición competitiva por glucosa (Kadan *et al*, 2004). Es preciso anotar que los modelos estudiados en la presente investigación (ITP1) presentan una constante de inhibición entre 0.7 y 0.8 g/L para concentraciones iniciales por encima de 30 g/L. Estos valores bajos indican un gran efecto de inhibición.

En el caso de concentraciones menores a 30 g/l o E/S mayores que 0.5, donde los coeficientes de determinación fueron bajos, se buscó una alternativa para distinguir qué tipo de modelo podía representar los datos experimentales. Como una primera aproximación se hizo una comparación entre los datos arrojados por el modelo de Michaelis–Menten y los datos experimentales para las relaciones E/S menores a 30 g/l. En las Gráficas 28 y 29 se muestran las curvas de progreso para datos arrojados en la simulación del modelo de Michaelis–Menten y los datos obtenidos experimentalmente para cada una de las relaciones E/S.



Gráfica 23. Curvas de progreso para relaciones experimentales (E) y simulaciones del modelo de Michaelis- Menten (XM) para relaciones E/S de 0.75 y 1.5.



Gráfica 24. Curvas de progreso para relaciones experimentales (E) y simulaciones del modelo de Michaelis- Menten (XM) para relaciones E/S de 0.375, 0.5.

Para determinar las diferencias significativas entre las medias en el rango de E/S de 0.375 hasta 1.5, se utilizó el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con un riesgo de un 5% de que cada par de media es significativamente diferente. El análisis se expresa en la Tabla 17, donde se puede concluir que puede existir diferencia entre las curvas de progreso correspondiente E/S= 0.375 y E/S=1.5. Indicando el punto, hasta donde es posible aplicar el modelo de Michaelis- Menten.

Tabla 12. Comparación múltiple de conversiones, usando procedimiento LSD para las medias de las curvas de progreso (E/S=0.375,0.5, 0.75, 1.5)

Curva de progreso	Conversión Media	Grupos Homogéneos
E_40 g/L (E/S=0.375)	0,609	A
E_30 g/L (E/S=0.5)	0,657	AB
E_20 g/L(E/S=0.75)	0,748	AB
E_10 g/L (E/S=1.5)	0,804	AB
XM_40 g/L	0,804	AB
XM_30 g/L	0,820	AB
XM_20 g/L	0,839	AB
XM_10 g/L	0,858	B

E= datos Experimentales

XM= Modelo de Michaelis - Menten

En la Tabla 18 se presentan las correlaciones de momento de Pearson para las conversiones de los modelos de Michaelis – Menten y los datos experimentales para diferentes valores de E/S, se puede observar un buen grado de linealidad entre los datos experimentales y los datos arrojados por el modelo de Michaelis – Menten para las relaciones E/S de 1.5, 0.75 y 0.5, siendo la relación E/S= 0.375 la que más alejada está.

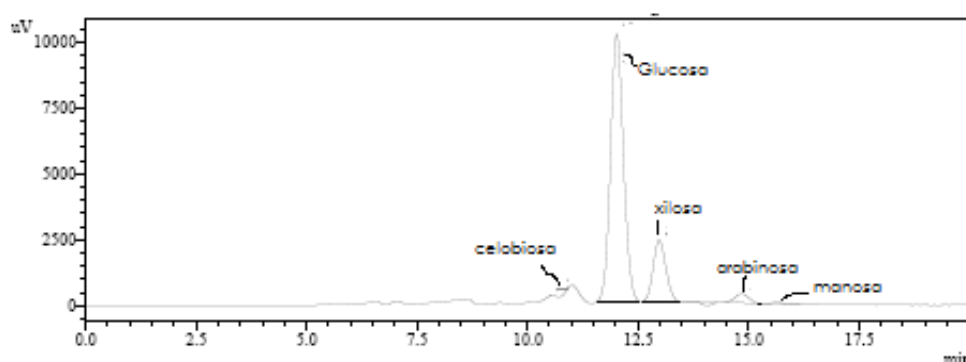
Tabla 13. Correlaciones de Momento de Pearson de las conversiones de modelos Michaelis - Menten (XM) y datos experimentales (E) para E/S= 1.5, 0.75, 0.5, 0.375)

	E_10	E_20	E_30	E_40
XM_10 g/L (E/S=1.5)	0.9929	0.9504	0.8959	0.8451
XM_20 g/L (E/S=0.75)	0.9967	0.9667	0.9208	0.8740
XM_30 g/L (E/S= 0.5)	0.9934	0.9776	0.9424	0.8998
XM_40 g/L (E/S=0.375)	0.9852	0.9816	0.9535	0.9147

Se puede concluir que para relaciones E/S por encima de 0.5 se puede aplicar el modelo encontrado de Michaelis–Menten sin tener en cuenta los fenómenos de inhibición, y para relaciones por debajo de 0.5 se puede aplicar el modelo de inhibición competitiva.

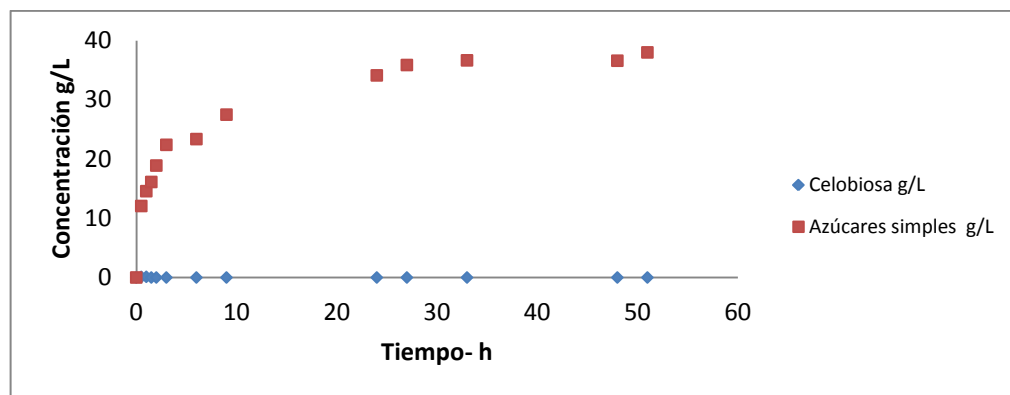
3.2.2.2 Análisis de modelos del grupo II. En este grupo, se presentan los modelos cinéticos que tienen en cuenta la interacción de dos inhibidores. Un primer inhibidor compuesto fundamentalmente por glucosa y un segundo inhibidor compuesto por azúcares o compuestos reductores solubles en la mezcla reaccionante diferente a glucosa. Estos azúcares solubles, son derivados de la descomposición de la hemicelulosa, que son polímeros conformados por unidades de glucosa que en ese momento sus enlaces no se han podido fraccionar y otros compuestos reductores que se puedan encuentran en los extractivos diferentes de glucosa, como son los productos de la hemicelulosa.

Aunque la glucosa, se encuentra en mayor cantidad en los productos de hidrólisis, también se han encontrado otros azúcares como xilosa, arabinosa, manosa y alguna cantidad de celobiosa como se puede observar en la Gráfica 30.



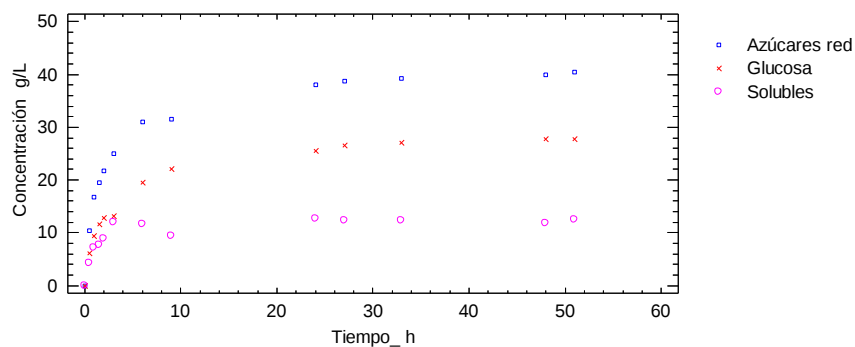
Gráfica 25. Análisis cromatográfico de una muestra de solución de hidrolizada

La relación azúcares simples (glucosa y xilosa) y celobiosa se presenta en la Gráfica 31, donde se muestra la poca cantidad de celobiosa que se desprende durante la hidrólisis del sustrato S6 con la enzima E5.



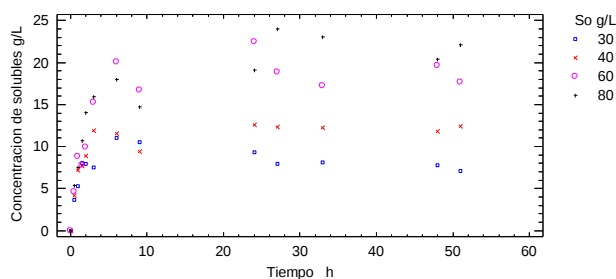
Gráfica 26. Concentración de azúcares simples y celobiosa en la hidrólisis enzimática del sustrato S6 usando la enzima E5 para una relación E/S de 0.375

Para visualizar la relación que existe entre la concentración de los azúcares reductores, el contenido de glucosa y los solubles, en las Gráficas 32 se presenta el comportamiento en el tiempo del contenido de azúcares reductores, glucosa y azúcares reductores solubles diferentes a glucosa en los hidrolizados para relaciones E/S=0.375.



Gráfica 27. Curvas de progreso para producción de azúcares reductores, glucosa y solubles para una concentración de 40 g/L (E/S= 0.375)

Además, en la Gráfica 33 se presentan los perfiles de concentración de los azúcares solubles diferentes a glucosa para relaciones E/S menores a 1.5, se puede observar que la concentración de estos compuestos solubles alcanzan un máximo en cierto tiempo y después comienza a descender. Es posible, debido a que algunos polímeros que tengan unidades de glucosa han empezado a depolimerizarse.



Gráfica 28. Perfil de concentraciones de solubles a diferentes relaciones E/S de 0.5, 0.375, 0.25 y 0.187

Encontrar un modelo matemático, que relacione la concentración de solubles es difícil, debido a la irregularidad de los datos. Un modelo propuesto que tiene una buena aproximación se presenta en la Ecuación 58.

$$\text{Solubles} = I_2 = (A + BX)e^{(DX-1)} ; r^2=0.953 \quad (58)$$

Donde

$$B = -0.0014S_0^2 - 0.0467S_0 - 2.2331 \quad (r^2=0.99; E/S \leq 1.5)$$

$$A = 0.0011S_0^2 + 0.0516S_0 + 2.5977 \quad (r^2=0.99; E/S \leq 20 \text{ o } S_0 \geq 20 \text{ g/L})$$

$$D = 4.06$$

Esta relación, permitió evaluar las diferentes ecuaciones diferenciales que representan los modelos de doble inhibición. A continuación, se hace un análisis sobre los principales grupo de interacciones, como son: inhibición competitiva por glucosa y competitiva por los solubles antagonica, inhibición competitiva por glucosa y solubles independiente, Inhibición no competitiva glucosa e inhibición no competitiva solubles antagonica, Inhibición competitiva por glucosa, y no-competitiva por soluble antagonica e inhibición no competitiva por glucosa y competitiva por solubles antagonica.

Tabla 14. Constantes cinéticas de los modelos ICGCS-A, ICGCS-I y INCGNCS-A para diferentes relaciones E/S a 50 °C y pH 4.2

S _o g/L/(E/S)	ICGCS-A			ICGCS-I			INCGNCS-A		
	K ₁ g/L	K ₂ g/L	r ²	k ₁ g/L	k ₂ g/L	r ²	k ₁ g/L	k ₂ g/L	r ²
20/0.75	0.918	7.80E+08	0.675	1.25	5.23	0.654	0.71	83	0.636
30/0.5	0.489	2.09E+09	0.869	1.43	5.49	0.874	0.609	3.23E+09	0.826
40/0.375	0.54	3.38E+08	0.8967	0.53	3.70E+12	0.895	0.73	1.12E+06	0.865
60/0.25	0.46	487	0.9685	0.309	354	0.979	0.671	1.65E+06	0.929
80/0.187	0.48	3.91	0.9724	0.426	2082	0.978	0.657	1.00E+08	0.957

ICGCS-A: inhibición competitiva glucosa y solubles antagonica

ICGCS-I: Inhibición competitiva glucosa y solubles independiente

(INCGNCS-A: Inhibición no competitiva glucosa, no-competitiva solubles antagonica

Tabla 15. Constantes cinéticas (k₁ y k₂ g/L) de los modelos ICGNCS-A y INCGCS-I para diferentes relaciones E/S a 50 °C y pH 4.2

So g/L/(E/S)	ICGNCS-A			INCGCS-A		
	k ₁ g/L	k ₂ g/L	r ²	K ₁ g/L	k ₂ g/L	r ²
20/0.75	1.51	8.62E+05	0.675	1.66	1.55E+06	0.6599
30/0.5	1.33	1.00E+08	0.8688	1.5	1.32E+06	0.8544
40/0.375	1.1	6.70E+06	0.899	1.29	174625	0.8765
60/0.25	0.462	7.30E+11	0.964	2.57	0.372	0.9436
80/0.187	0.419	2.90E+07	0.979	0.7	2.57	0.9677

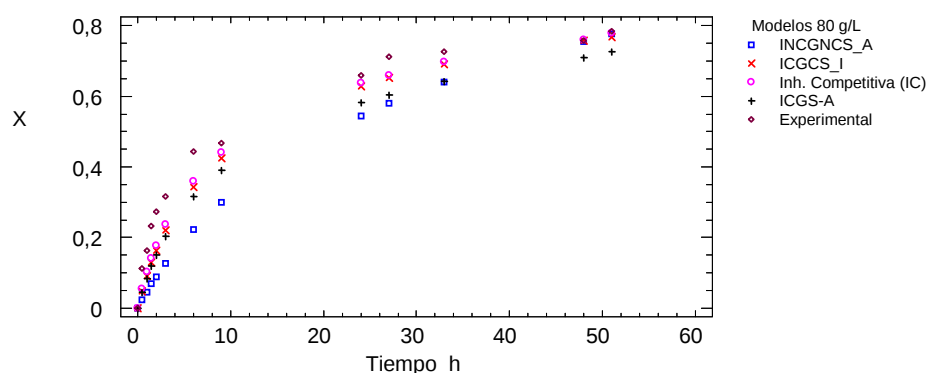
ICGNCS-A: Inhibición competitiva glucosa, no-competitiva soluble antagonica

INCGCS-A: no competitiva glucosa, competitiva soluble sin interacción

En las Tablas 19 y 20 se puede observar que las constantes de inhibición para los azúcares solubles k₂ diferentes de glucosa, son demasiado grandes comparados con las constantes de inhibición de la glucosa k₁. Además, en el caso que el valor de las constantes de inhibición de solubles sea bajo, su coeficiente de regresión es bajo, comparado, cuando se hizo el análisis a los modelos del grupo I, que utilizaron como inhibidor solamente glucosa. Costantes de inhibición con valores grandes, conducen a que su influencia como inhibidor sea pequeña.

Los coeficientes de determinación, de mayor valor entre las simulaciones de doble inhibición del grupo II corresponden a una relación E/S de 0.187. Si estos modelos cinéticos se comparan con el modelo cinético de inhibición competitiva (IC) del grupo I y los datos experimentales obtenidos para esta relación E/S (ver Gráfica 33), se puede concluir que los datos de simulación del modelo IC son los mas cercanos a los datos espermentales. Aunque, no existe diferencia significativa con un nivel de confianza del 95% para la medias de las curvas de

progreso de los modelos IC, INCGNCS- A, ICGCS- I, ICGS-A y los datos experimentales, si hay una mayor tendencia a la linealidad entre los datos experimentales y la inhibición competitiva (ver Tabla 21). Este análisis permite concluir que los modelos de inhibición para relaciones E/S menores de 0.375 de hidrólisis de residuos de la cosecha de la caña de azúcar se pueden expresar por un modelo sencillo de inhibición como es la inhibición competitiva (IC) expresada en el modelo de grupo I.



Gráfica 29. Curvas de progreso para modelos de doble inhibición, datos experimentales e inhibición competitiva para relaciones E/S de 0.187

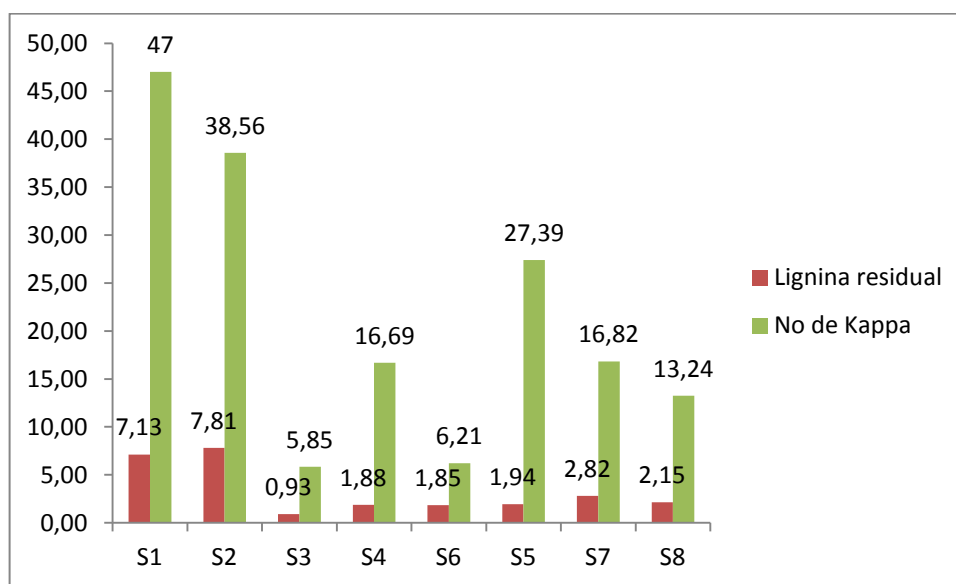
Tabla 16. Momento de Pearson para modelos de doble inhibición, datos experimentales e inhibición competitiva para relaciones E/S de 0.187

	Experimental	ICGCS_CA	INCGNCS-A	ICGS- A	Inh. Competitiva (IC)
Experimental	1	0.9921	0.9692	0.9914	0.9938
Media	0.434261	0.377769	0.320538	0.320538	0.388123

Algunas investigaciones, reportan modelos de inhibición competitiva utilizando Solka Floc (Asenjo, 1983), algodón textil (Beltrane *et al*, 1984), Celulosa (Mossier *et al*, 1999) y rastrojo de maíz (Kadan *et al*, 2004). En modelos cinéticos de inhibición competitiva aplicados a este tipo de sustratos, la disminución de la velocidad de hidrólisis, depende de la concentración de glucosa. Se hace necesario, implementar sistemas de hidrólisis que mantengan esta concentración a bajos niveles. Esto se puede lograr a través en sistemas de sacarificación – fermentación simultánea. Un análisis del modelo de inhibición competitiva obtenido en este estudio se presenta en el Apéndice 3.

3.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CONTENIDO DE LIGNINA.

3.3.1 Evaluación con diferentes pretratamientos. En la evaluación, del efecto del contenido de lignina sobre la hidrólisis de materiales lignocelulósicos obtenidos de los residuos de la caña de azúcar, se seleccionaron los ocho sustratos señalados en la Tabla 3, los cuales fueron preparados a partir del sustrato S1, que corresponde a un material sin ningún tipo de pretratamiento, mediante deslignificación con hidróxido de sodio, procesos organosolvente y enzimático, produciendo sustratos de diferentes contenidos de lignina expresados como número de kappa y lignina residual (ver Gráfica 34). Las reacciones de hidrólisis enzimática se llevaron a cabo a una temperatura de 40 °C y pH de 4.8. Además, se usaron las enzimas E1, E2, E3, E4 y E5 señaladas en la Tabla 6, en relaciones E/S ml de enzima /g de sustrato de 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3.



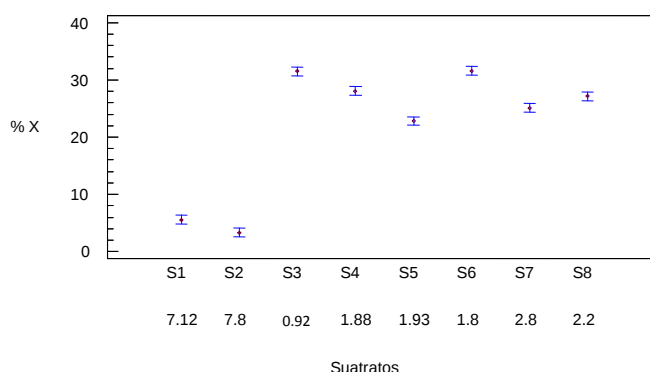
Gráfica 30. Distribución de No de Kappa y contenido de lignina residual para los diferentes sustratos

Para observar la influencia del contenido de lignina sobre la conversión de residuos de la cosecha de caña de azúcar se utilizó un diseño experimental multifactorial categórico, con tres factores experimentales relación E/S en cuatro niveles, tiempo de 6 niveles, lignina residual en 8 niveles y como variable dependiente la conversión. En el Apéndice 5, se presentan las Gráficas con la información utilizada en el análisis estadístico para la evaluación del efecto del contenido de lignina.

Tabla 17. Análisis de pruebas de múltiples rangos para conversión en función del No de Kappa para la enzima E1

Lignina Residual (Sustrato)	X% ,Media LSD*	Grupos Homogéneos
7.8 (S2)	3.300	A
7.12 (S1)	5.56	B
1.93 (S5)	22.80	C
2.80 (S7)	25.12	D
2.20 (S8)	27.11	E
1.88 (S4)	28.04	E
0.92 (S3)	31.49	F
1,85 (S6)	31.55	F

*LSD: Diferencia estadísticamente significativa



Gráfica 31. Conversión medias para sustratos (contenido de lignina residual) para diferentes sustratos tratados con la enzima E1

Los resultados, del análisis de pruebas de múltiples rangos para la conversión media en función del contenido de lignina residual, con un nivel de confianza del 95%, para la enzima E1 y los sustratos S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 y S8 se presentan en la Tabla 22 y la Gráfica 35, se puede observar la dificultad para encontrar una tendencia entre el contenido de lignina residual y el avance de la hidrólisis expresada como conversión media. No siempre, el menor contenido de lignina produce una mayor conversión, como lo muestran los sustratos S5, S8 y S4, S7. En el caso específico de la enzima E1, no existe una diferencia significativa entre las conversiones para la hidrólisis de los sustratos S3 y S6 con contenidos de lignina de 0.92 y 1.85. Como también, para los pares de sustrato S4 y S8 (1.88 y 2.20). Estos resultados indican que no solamente el contenido de

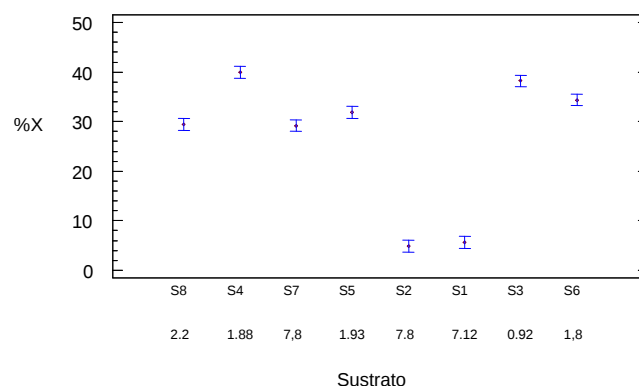
lignina es un indicador de la facilidad de hidrólisis cuando los sustratos de residuos de cosecha de caña de azúcar son pretratados en forma diferente, como es el caso de este estudio.

En la Tabla 23 se muestra el procedimiento de comparación múltiple para las enzimas E2 y E3. Para la enzima E3, usando el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un 95% de nivel de confianza, que determina que existen diferencias entre las conversiones medias para los perfiles de conversión, excepto para las parejas de sustratos S2, S1 con contenidos de lignina de 7.8 y 7.12 respectivamente, las parejas de sustrato S7, S8 (2.8 y 2.2) y S6, S3 (1.8 y 0.92). Se presenta una gran afinidad entre la enzima E3 y el sustrato S4, que se manifiesta por tener una mayor conversión promedio con respecto a los demás sustratos. Los sustratos S1 y S2, fueron los sustratos que presentaron perfiles más bajos en la hidrólisis.

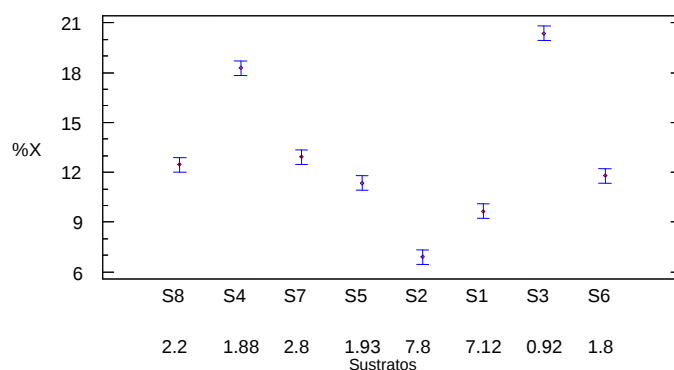
Cuando se utiliza la enzima E2 en la hidrólisis de los residuos de la caña de azúcar, se puede apreciar, que existe semejanza en la conversión media para los sustratos S5, S6 y S8 con contenido de lignina de 1.93, 1.85 y 2.20 respectivamente. El sustrato S4, tiene un contenido de lignina cercano al sustrato S6, pero difieren en su conversión media. Algo semejante, sucede con el sustrato S5, que a pesar de tener un contenido de lignina (1.93) moderadamente bajo, no se comporta bien en la hidrólisis enzimática con respecto a los sustratos S7 y S8 (2.8 y 2.2). Esta información también se refleja en las Gráficas 36 y 37. Estos resultados coadyuvan a concluir que el tipo de pretratamiento de sustrato, tiene influencia sobre la velocidad de hidrólisis.

Tabla 18. Análisis de pruebas de múltiples rangos para conversión en función del No de Kappa para las enzimas E1 y E2, para condiciones de reacción de 40 °C y pH de 4.8

E2			E3		
<i>Lignina residual (Sustrato)</i>	<i>%X, Media LSD</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>	<i>Lignina residual (Sustrato)</i>	<i>X % ,Media LSD</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
7.8 (S2)	6.90	A	7.8 (S2)	4.88	A
7.12 (S1)	9.66	B	7.12 (S1)	5.58	A
1.93 (S5)	11.36	C	2.8 (S7)	29.18	B
1.8 (S6)	11.80	CD	2.2 (S8)	29.43	B
2.2 (S8)	12.46	DE	1.93 (S5)	31.82	C
2.8 (S7)	12.91	E	1.85 (S6)	34.38	D
1.88(S4)	18.29	F	0.92 (S3)	36.54	D
0.92(S3)	20.37	G	1.88 (S4)	40.43	E



Gráfica 32. Conversión para sustratos con diferentes contenidos de lignina residual para la enzima E3.



Gráfica 33. Conversión media para sustratos con diferentes contenidos de lignina para la enzima E2.

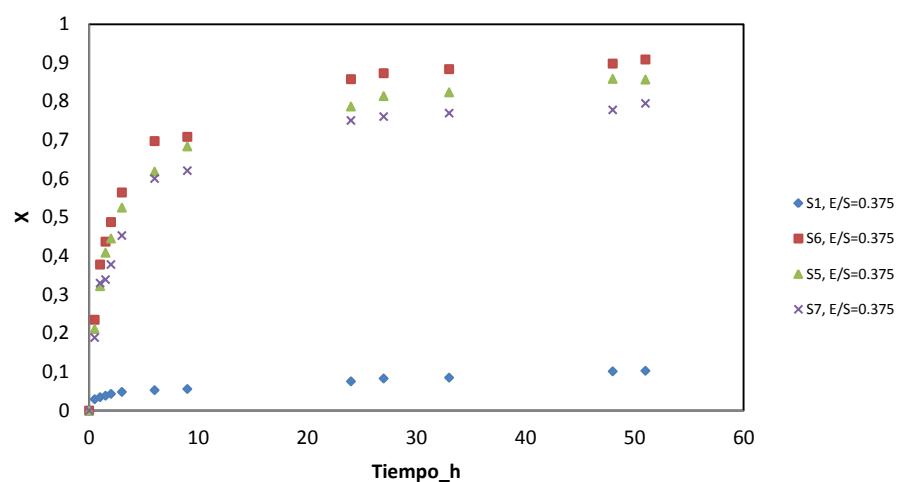
Con respecto a las enzimas E4 y E5 presentados en la Tabla 24, el comportamiento es similar a las otras enzimas. Se puede interpretar que el contenido de lignina no es el único parámetro a tener en cuenta para un buen desarrollo de la hidrólisis de materiales lignocelulósicos. También, es importante la afinidad entre la enzima, el sustrato y el pretratamiento previo que se le haga al material original. Esta afirmación concuerda con lo propuesto por Asenjo (1983),

donde propone que en la hidrólisis de sustratos poliméricos insolubles por enzimas, existen diferentes factores que afectan la velocidad de reacción. Estos incluyen la estructura, amorfogénesis (Arantes *et al*, 2010) y composición del sustrato insoluble, la naturaleza y composición del sistema enzimático y los efectos de inhibición de los productos.

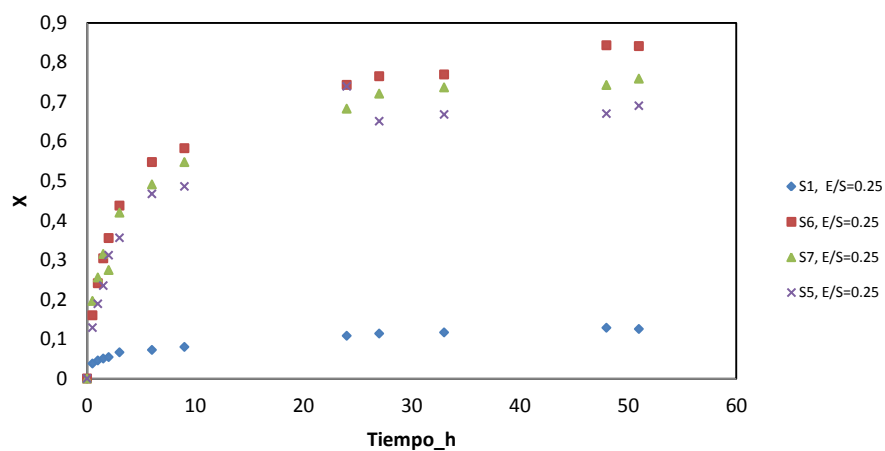
Tabla 19. Análisis de pruebas de múltiples rangos para conversión en función del No de Kappa para las enzimas E4 y E5, para condiciones de reacción de 40 °C y pH de 4.8

E4			E5		
Lignina residual (Sustrato)	X%, Media LSD	Grupos Homogéneos	Lignina residual (Sustrato)	X% Media LSD	Grupos Homogéneos
7.80(S2)	3.93	A	7.80 (S2)	4.80	A
7.12 (S1)	6.33	B	7.12 (S1)	6.29	A
1.80 (S6)	22.49	C	2.80 (S7)	23.88	C
2.20 (S8)	23.49	CD	1.93 (S5)	32.44	D
1.93 (S5)	24.60	D	2.20 (S8)	32.58	D
2.80 (S7)	29.23	E	1.80 (S6)	37.22	E
1.88 (S4)	30.49	E	1.88 (S4)	42.32	F
0.92 (S3)	31.28	E	0.92 (S3)	46.54	G

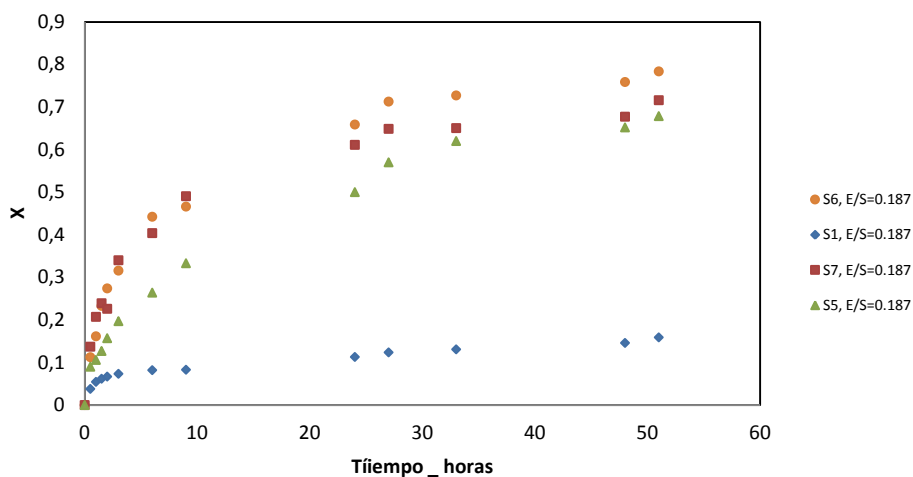
3.3.2 Evaluación de los pretratamientos con organosolventes. Para evaluar el comportamiento de la lignina sobre la velocidad de hidrólisis, se procedió a observar el comportamiento de sustratos que tuvieran el mismo pretratamiento (organosolvente), utilizando la enzima E5. Se tomó como base el diseño experimental anterior, pero se cambiaron las condiciones de la hidrólisis (temperatura de 50 °C y pH de 4.2), se tuvieron en cuenta relaciones E/S de 0.375, 0.25 y 0.187, el tiempo de hidrólisis se extendió a 13 niveles alcanzado 51 horas. Los números de Kappa obtenidos para estos sustratos fueron de 47, 27.39, 16.87 y 6.21 que corresponden a los sustratos S1, S5, S7 y S6 respectivamente. En las Gráficas 38, 39 y 40 se presenta el perfil de conversión con respecto al tiempo para la enzima E5 y relaciones E/S de 0.375, 0.125 y 0.187.



Gráfica 34. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E5 y una relación $E/S=0.375$, para sustratos pretratados con organosolvente



Gráfica 35. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E5 y una relación $E/S=0.25$, para sustratos pretratados con organosolvente

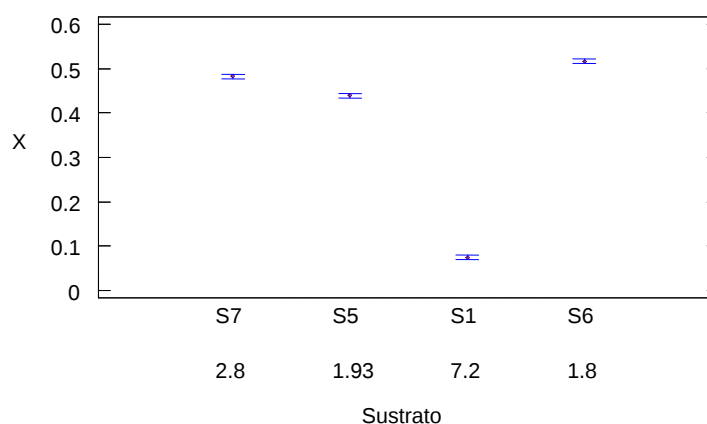


Gráfica 36. Perfil de conversión (decimal) con respecto al tiempo para E5 y una relación E/S=0.187, para sustratos pretratados con organosolvente

Para la enzima E5 bajos las condiciones del experimento, se puede afirmar que al disminuir el número de kappa aumenta la conversión media como se muestra en la Gráfica 41, pero no sucede con el contenido residual de lignina, donde existen diferencias significativas entre las conversiones medias de los perfiles de los diferentes sustratos con un 95% de nivel de confianza (ver Tabla 25).

Tabla 20. Análisis de pruebas de múltiples rangos para conversión media decimal en función del contenido de lignina (número de Kappa) utilizando la enzima E5, para sustratos pretratados por organosolvente

<i>Lignina residual (Sustrato)</i>	<i>X Media LSD</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
7.12, 47 (S1)	7.39	A
1.93, 27.39 (S5)	43.99	B
2.80, 16.82 (S7)	48.30	C
1.85, 16,6 (S6)	51.69	D

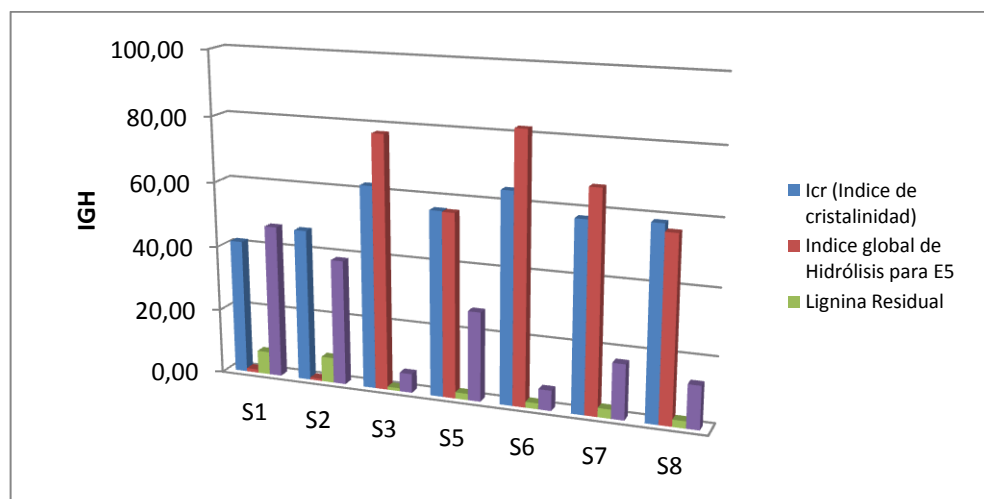


Gráfica 37. Conversión media obtenida en la hidrólisis de los sustratos S1, S5, S6 y S7 (lignina residual) utilizando la enzima E5.

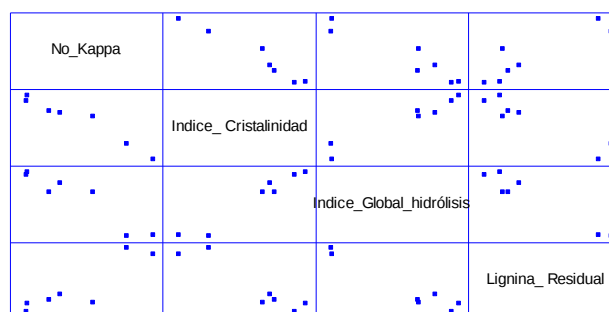
Para los diferentes tratamientos realizados a los sustratos, a diferentes condiciones de pH, temperaturas y pretratamientos, se logró percibir como el contenido de lignina afecta la velocidad de producción de azúcares reductores. Sin embargo, encontrar un modelo matemático que logre interpretar este fenómeno es difícil, debido a que existen otros factores importantes como el tipo de pretratamiento que lo desvirtuarían.

En las Gráficas 42 y 43, expresan como el contenido de lignina referido como lignina residual, número Kappa y el tipo de pretratamiento formulado a través del índice de cristalinidad afectan la disponibilidad de hidrolizar sustratos obtenidos de los residuos de la cosecha de caña de azúcar, enunciado como IGH. No se vislumbra, una relación clara entre la lignina residual y el índice de cristalinidad que permitan definir un modelo que los relacione con el IGH.

Así mismo, el sustrato S6, que tiene el mayor índice de cristalinidad, debido a la remoción del material amorfo (donde se incluye parte de lignina) y con uno de los menores contenidos de lignina residual de los sustratos tratados, presenta el mayor índice global de hidrólisis. Caso contrario del sustrato S1, el cual con el mayor contenido de lignina y menor índice de cristalinidad tiene un bajo índice global de hidrólisis. Por lo que se puede deducir, que existe una asociación entre el contenido de lignina y el tipo de pretratamiento que coadyugan a la hidrólisis enzimática de estos residuos.



Gráfica 38. Descripción del comportamiento de los diferentes sustratos basados en el contenido de lignina y el pretratamiento frente al IGH utilizando la enzima E5



Gráfica 39. Matriz de dispersi3n entre los efectos del pretratamiento (contenido de lignina, Índice de sacarificaci3n) y el IGH.

La matriz de dispersi3n, muestra como los altos índices de cristalinidad se producen a bajos contenidos de la lignina residual, se observa un agrupamiento de los datos cuando los sustratos sufren pretratamientos. Caso contrario, pasa cuando se relaciona el índice de cristalinidad con el número Kappa. La mejor dispersi3n de los datos referidos a número de Kappa, indica que al aumentar el tipo de lignina soluble determinada por el método Kappa, se presentan

tendencias claras a la disminución del IGH y aumento de la cristalinidad, cosa que no se puede afirmar con la lignina residual.

Estos resultados conducen a expresar la dificultad de expresar un modelo matemático que articule el fenómeno de inhibición por lignina. Puesto que, existe una interacción de los constituyentes de los materiales lignocelulosicos como inhibidores de la hidrólisis, entre los que se encuentran la pareja lignina - hemicelulosa (Mussato *et al*, 2008), y el efecto del pretratamiento sobre la cristalinidad (Laureano - Perez *et al*, 2005; Yan and Wyman, 2007).

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El pretratamiento, es un factor importante a considerar en los procesos de hidrólisis de materiales lignocelulósicos (residuos de caña de azúcar). Dependiendo del pretratamiento se puede facilitar o entorpecer el ataque de las enzimas a la matriz lignocelulósica.
- No es posible predecir la composición de un sustrato después de un pretratamiento, lo que hace necesario su evaluación experimental, para que puedan ser utilizada en la simulación producida en esta investigación a través de sistemas borrosos.
- Es importante garantizar en la preparación del material lignocelulósico para un proceso de hidrólisis enzimática, que la matriz lignocelulósica cambie su estructura a través de pretratamientos.
- Se debe tener en cuenta, la importancia de la interacción en los pretratamientos de materiales lignocelulósicos de los efectos químicos y térmicos sobre su estructura, que permita facilitar la hidrólisis, ya que el pretratamiento enzimático no fue efectivo.
- Se percibe una influencia del contenido de lignina sobre la facilidad para hidrolizar los sustratos para las diferentes enzimas, lo que concluye que la lignina interviene como un inhibidor en la hidrólisis enzimática de los residuos de la caña de azúcar.
- La simulación en lógica difusa, presentó regiones de máximo índice global de hidrólisis para residuos de la cosecha de la caña de azúcar, los cuales se encuentran entre 20 - 30 FPU/ml y valores menores a 500 p NPG U/ml de actividad betaglucosidasa y para actividad hemicelulasa entre 50 y 70 UI/ml, indicando que es importante el papel de la betaglucosidasa en la hidrólisis enzimática de sustratos lignocelulósicos y que no es necesario grandes cantidades de enzimas celulolíticas. Sino, una buena dosificación de éstas.
- El Índice Global de Hidrólisis, puede ser usado como una prueba preliminar para determinar la eficiencia de los cocteles de enzimas en la hidrólisis de sustratos lignocelulósicos.
- Enzimas que presenten una buena distribución de actividades enzimáticas acorde con su composición, tienen una acción sinérgica que se refleja en

una mejor velocidad de hidrólisis, tal es el caso de la mezcla enzimática E5 y en caso contrario las mezclas enzimática E1 y E2.

- El mayor índice global de hidrólisis se encontro en la pareja S6-E5, la cual indica el sustrato pretratado por el proceso organosolvente y la enzima con un contenido de 27.53 FPU, que representa 74% de la máxima actividad celulolítica que se puede alcanzar en las muestras enzimáticas propuestas en esta investigación.
- Dentro de los experimentos realizados, la mejor actividad hidrolítica para un sistema enzimático pretratado con organosolvente y bajo contenido de lignina, se presenta a una temperatura de 50 °C y pH entre 3.8 y 4.2.
- Para el modelo de Michaelis-Menten, el análisis de los datos experimentales arrojan las siguientes constantes cinéticas: $k_m = 20.37$ g/L y $v_m = 39$ g/L.h.
- La inhibición por sustrato no tiene un papel importante en la hidrólisis de residuos de la cosecha de caña de azúcar.
- El modelo cinético que mejor ajusta los datos experimentales de la hidrólisis de los residuos de la cosecha de la caña de azúcar, es el modelo de inhibición competitiva, teniendo como inhibidor la glucosa. El modelo cinético quedaría definido por la Ecuación 59.

$$\frac{dX}{dt} = \frac{39(1-X)}{S_o(1-X) + 20.37\left(1 + \frac{I}{0.442}\right)} \quad (59)$$

- No existe interacción entre los inhibidores por producto, los modelos cinéticos de doble inhibición no representan los datos experimentales en la hidrólisis de residuos de la cosecha de caña de azúcar.
- En la hidrólisis de residuos de la cosecha de caña de azúcar para relaciones E/S mayores de 0.5, se puede aplicar el modelo cinético de Michaelis-Menten.
- El costo de la hidrólisis de residuos de la cosecha de caña de azúcar, depende de la relación enzima/sustrato usada en la hidrólisis. La factibilidad de la hidrólisis enzimática, obedece en gran parte del costo de las enzimas
- Cuando se trabajan con diferentes relaciones E/S, en la hidrólisis de residuos de la cosecha de caña de azúcar. Los tiempos largos de hidrólisis

hacen que variables diferentes a la relación E/S, como costos operacionales, tomen importancia sobre la factibilidad económica de la hidrólisis. Esto se ve reflejado, cuando es menor el costo de la enzima

- Para costos de enzima por encima de 1.9 US\$/L, bajo las condiciones de la simulación en este trabajo, hace difícil que procesos de hidrólisis de materiales lignocelulósicos sean viables, para el caso de la enzima E5, corresponde 6.9 dólares /100000 FPU
- Se puede afirmar que el modelo cinético para la hidrólisis de los residuos de la caña de azúcar no está influenciada por problemas difusionales externos, ya que la reacción se llevó a cabo a una concentración por debajo de 120 g/L inferior a la seleccionada en la simulación (160 g/L), acompañado de un tamaño de partícula muy reducido. Esto indica que la viscosidad inicial a la que se realizó la determinación de los parámetros cinéticos, es inferior a propuestos en el análisis de modelo y en la validación experimental
- La poca presencia de celobiosa durante la hidrólisis del sustrato S6, se debe principalmente al contenido de β - glucosidasa en la enzima E5. Hecho este, que ocasionó no tomar la celobiosa como un inhibidor en el proceso de hidrólisis
- ✓ El contenido de lignina no es el único parámetro a tener en cuenta para un buen desarrollo de la hidrólisis de materiales lignocelulósicos. También, es importante la afinidad entre la enzima y el sustrato y el pretratamiento previo que se le haga al material original.
- ✓ Es difícil establecer un modelo cinético de inhibición por lignina para sustratos lignocelulolíticos debido a que hay otras variables involucradas que pueden actuar como inhibidores o factor de perturbación, tales como: tipo de material, interacción enzima – sustrato, etapas involucradas en el pretratamiento y contenido de otros constituyentes del material como hemicelulosa
- ✓ Al aumentar la relación E/S aumenta la velocidad de hidrólisis de residuos de la caña de azúcar, ya que disminuyen los problemas de inhibición por producto y lignina por un aumento de sitios activos, pero disminuye la factibilidad económica.
- ✓ Para sustratos pretratados por organosolvente, se pudo percibir contenido de lignina influye sobre la velocidad de hidrólisis.
- ✓ Es importante profundizar más, sobre el efecto de los pretratamientos sobre la hidrólisis enzimática de residuos de la cosecha de caña de azúcar,

continuando con investigaciones dirigidas a evaluar una cantidad mayor de sustratos y pretratamientos.

- ✓ Para poder generalizar sobre la composición actividades enzimáticas que actuarían de mejor manera sobre sustratos lignocelulósicos, se hace necesario ampliar la base de datos tanto de enzimas, sustratos de diferentes cultivos y pretratamientos (cuantificados a través de la cristalinidad) y de esta forma poder usar con certeza análisis con redes neuronales o lógica difusa.
- ✓ Para poder trabajar en sistemas sacarificación – fermentación simultánea, es necesario definir el sistema de mezclado y agitación para concentraciones de sólidos por encima del 15% que permitan una buena homogenización inicial de la mezcla de reacción que minimice los problemas difucionales
- ✓ Es importante en la preparación del material lignocelulósico para un proceso de hidrólisis enzimática garantizar que la matriz lignocelulósica cambie su estructura. Es trascendental, la interacción en los pretratamientos de materiales lignocelulósicos de los efectos químicos y térmicos sobre su estructura, que permita facilitar la hidrólisis. En este estudio, se percibe una influencia del contenido de lignina sobre la hidrólisis de los sustratos para las diferentes enzimas, lo que concluye que la lignina puede actuar como un inhibidor en la hidrólisis enzimática de los residuos de la caña de azúcar. Aunque, el contenido de lignina no es el único parámetro a tener en cuenta para un buen desarrollo de la hidrólisis de materiales lignocelulósicos.
- ✓ Los pretratamientos que estén relacionados con procesos organosolvente producen fuertes cambios en la estructura del material lignocelulósico obtenido de los residuos de la caña de azúcar, ya que eliminan lignina y coadyuvan a cambios en la estructura cristalina de la celulosa, generando, un aumento de la cristalinidad. Caso contrario a la deslignificación enzimática, donde los cambios no son apreciables comparado con los otros pretratamientos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adsula, M.G. Ghuleb, J. E. Shaikhb, H., Singhb, R., Bastawdea, KB., Gokhalea, DV, and y Varma AJ. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides, *Carbohydrate Polymers.*, 62, 6 –10, 2005
- Alberty, R. Determination of kinetic parameters of enzyme – catalyzed reactions with a minimum number of velocity measurements, *Journal of theoretical Biology.*, 254, 156-163, 2008
- Alves, L., Gurgela, V., Marabezia, K., Ramosa, L.A., Da Silva Curveloa, A.P. Characterization of depolymerized residues from extremely low acid hydrolysis (ELA) of sugarcane bagasse cellulose: Effects of degree of polymerization, crystallinity and crystallite size on thermal decomposition. *Industrial Crops and Products* 36, 560–571, 2012
- Almeida, JS. Predictive non- linear modeling of complex data by artificial neural networks, *Analytical biotechnology.*, 13, 72 -76, 2002
- Ander, P. and Ericksson, KE. Selective Degradation of Wood Components by White-Rot Fungi, *physiol plant.*, 41, 239-248, 1977
- Andric, A. Meyer, A.S., Jensen, P. And Dam-Johansen, K. Reactor desings for minimizing product inhibition during enzymatic lignocelluloses hydrolysis: I, significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulitic enzymes, *Biotechnology Advances.*, 28, 308-324., 2010
- Arantes, V., Jack, N. and Saddler, J. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels* Available. <http://www.biotechnologyforbiofuels.com>, [Citado diciembre 2010]
- Araque, E., Parra, C., Freer, J., Contreras, D., Rodríguez, R. And Baeza, J. Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. to ethanol, *Enzyme and Microbial Technology.*, 43, 214–219, 2008
- Asenjo, J. Maximazing the formation of glucose in the enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose, *Biothechnol Bioeng.*, 25, 3150-85, 1983
- Atalla, RH. And Vanderlhart, DL. Native cellulose a composite of two distint crystalline forms, *Science.*, 223, 283 – 285, 1984

- Bailey, M., Biely, P. And Pountanen, K. Interlaboratory testig of methods for assay of xylanase activity, *Journal of Biotechnology.*, 23, 257 – 270, 1992
- Bagga, P., Sandhu, D. and Sharma, S. Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*, *Journal of Applied Bacteriology.*, 68, 61-68, 1990.
- Bansal, P. Hall, M., Realf, M., Lee, J. And Bommarius, A. Modeling cellulase on lignocellulosic substrates. *Bioteechnology advances.*, xxx, 1-16, 2009
- Baker, J. Ehrman, Cl., Adney, WS., Thomas, SR. And y Himmel, ME. Hydrolysis of cellulose using ternary mixtures of purified cellulases, *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology.*, 70-72, 395-403, 1988
- Baş, D. Ceyda Dudak, F. and Boyac, IH. Modeling and optimization III: Reaction rate estimation using artificial neural network (ANN) without a kinetic model., *Journal of Food Engineering.*, Vol 79, 622-628, 2007
- Beldman, G., Rombouts, FM., Voragen, AG. And Pilnik, W. Application of cellulose and pectinase from fungal origin for the liquefaction and sacharification of biomass, *Enzyme micob. Technol.*, vol 6, 503-507, 1984
- Beltrame, PL., Carniti, P., Focher, B., Marzetti, A. And Sarto, V. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials, *kinetic study.*, 26, 1233- 8, 1984
- Berlin, A. Balakshin, M. Gilkes, N. Kadla, J. Maximenko, V. Kubo, S. And Saddler J. Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations, *Journal of Biotechnology.*, 125, 198–209, 2005
- Berlin, A. Gilkes, N. Kilburn, D., Maximenko, V. Bura, R. Markov, A., Skomarovsky, A., Gusakov, A., Sinitsyn, A., Okunev, O., Solovieva, I. and Saddler, J. Evaluation Of Cellulase Preparations For Hydrolysis Of Hardwood Substrates *Applied Biochemistry and Biotechnology.*..129–132, 529 -545, 2006
- Bennet, A. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening: Annual Review Plant physiology, *Plant Mol. Bio.l*, 42, 675-703, 1991
- Bezerra, R. And Dias, A. Discrimination Among Eight Modified Michaelis-Menten Kinetics Models of Cellulose Hydrolysis With a Large Range of Substrate/Enzyme Ratios, *Applied Biochemistry and Biotechnology.*, 112, 173-182, 2004

- Bhattacharya, D. Germinario, L. And Winter, W. Isolation, preparation and characterization of cellulose microfibrils obtained from bagasse, *Carbohydrate Polymers.*, 73, 371–377, 2008
- Bioinformatics Resource Portal, 2010, Herramienta Expasy, available [http\ www. Expasy.Org](http://www.Expasy.Org) [citado 2010]
- Bourbonnais, R., Paice, MG., Reid, ID. And Lanthier, R. Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization, *Applied and Environmental Microbiology.*, 65, 1876-80, 1995
- Bourbonnais, R, And Paice, MG. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation, *FEBS Letters.*, 267, 99-102, 1990
- Blumenkrantz, N. New methods for quantitative determination of uronic, *Anal Biochem.*, 54, 484 – 489, 1973
- Brown, SW. Oliver, SG. Harrison, DE. And Righelato, RC.. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: Differences in the magnitude and complexity of the effect. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology.*, 11, 151-155, 1981
- Carballo- Abreu, L.R. Orea Igarza, U. Cordero Manchado, E. Composición química de tres maderas en la provincia de Pinar del Rio, Cuba a tres alturas del fuste comercial. *Revista chapingo* parte 2 y 3, serie forestales y ambiente, 57-52, 2004
- Cai, Z. And Paszner, L. Catalyzed Wood bonding with hemicelluloses, *Holz Forschung.*, 42, 11 -20, 1988,
- Cara, C. Moya, M. Ballesteros, I. Negro, MJ. Gonzalez, A. And Ruiz, E. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass, *Process Biochem.*, 42, 1003-1009, 2007. .
- Castillo, M. Stenstrom, J. And Ander, P. Determination of Manganese Peroxidase with 3 – Methyl – 2- benzothialinone Hydrazone and 3 – (dimethylamino)benzoic acid, *Analytical Biochemistry.*, 218, 339-404, 1994,
- CENICAÑA. Informe Anual, Available, [http\ www.cenicaña.org](http://www.cenicaña.org) [citado, 2008]

- Chandra, RP. Bura, R. Mabey, WE. Berlin, A. and Pan, X. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic, *Adv Biochem Engin/Biotechnol.*, 108, 67-93, 2007.
- Chao, T. And Talalay, P. A simple generalized equation for the analysis of multiple inhibitions of michaelis-menten kinetic systems, *The journal of biological chemistry.*, 252, 6438-6442, 1997.
- Chao, T.C and Talaya, P. A Generalized Equations for the Analysis of Inhibitionsof Michaelis-Menten and Higher-Order Kinetic Systems with Two or More Mutually Exclusive and Nonexclusive Inhibitors, *Eur J. Biochem.*, 115, 207- 216, 1981.
- Cherry, J. And Fidantsef, AL. Directed evolution of industrial enzymes: An update, *Current Opinion in Biotechnology.*, 14, 438-443, 2003
- CINESTAV-UGPM, Métodos de precipitación para limpieza de proteínas. Available <http://www.cinvestav.mx>. (Citado en Noviembre 2009)
- Colom, X., Carrillo, F., Nogues, F., & Garriga, P. Structural analysis of photodegraded wood by means of FTIR spectroscopy. *Polymer Degradation and Stability*, 80, 543–549, 2003.
- Corazza, F. Calzavara, L. Moraes, F. Zanin, G. And Neitzel, I. Determination of inhibition in the enzymatic hydrolysis of cellobiose using hybrid Neural modeling, *Brazilian journal of Chemical engineering.*, 22, 19 -29, 2005
- Cullis, LF. Saddler, JN. Shawn, D. And Mansfield, S. Effect of initial moisture content and chip size on he bioconversion efficiency of softwood lignocellulosics, *Biotechnology And Bioengineering.*, Vol. 85, No. 4, 2004
- Desai, SG. And Converse, AO. Substrate reactivity as a function of the extent of reaction in the enzymatic hydrolysis of lignocelluloses, *Biotechnology and Bioengineering.*, 56, 650-655, 1977
- Dixon, M. And Webb, EC. Enzyme. 3rd. ed. *Longman Group Limited*. London. chap. 2, 1979
- Duarte, A, Introducción a la Ingeniería Bioquímica, Departamento de ingeniería Química, Universidad Nacional, Colombia, 1995

- Dubois, M. Hamilton, JK. Rebers, PA. And Smith, F. Colometer method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, vol. 28, 300-356, 1956.
- Eklund, R. Galbe, M. And Zacchi, G. The influence of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of willow prior to steam pretreatment, *Bioresource Technology*, 52, 225-229, 1995
- Eriksson, T. Karlsson, J. and Tjerneld, F. A Model Explaining Declining Rate in Hydrolysis of Lignocellulose Substrates with Cellobiohydrolase I (Cel7A) and Endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*., Vol. 101, 41-60, 2001
- Eriksson, T. Borjesson, J. And Tjerneld, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocelluloses, *Enzyme and Microbial Technology*., 31, 353-364, 2002
- Fan, ZL. South, C. Lyford, K. Munsie, J. van Walsum, P. and Lynd LR. Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor, *Bioprocess Biosyst Eng*; 26, 93-101, 2003.
- Fengel, D. and Wenwger, G. Wood: Chemistry, ultrastructure reaction, *De Gruyter*. Berlin, 300-329, 1984
- Filson, P. And Benjamin A. Sono-chemical preparation of cellulose nanocrystal from lignocelluloses derived materials, *Biosource Technology*; 100, 2259 – 2264, 2009
- Flórez, P L. Diseño de un complejo enzimático adaptado a la licuefacción de frutas tropicales, aplicación a la pulpa de maracuyá, Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, 160-162, 2002
- Frossling, N. Gerlands Beir. *Geophics*, 52, 170, 1938
- Fujji, M. Ooshima, K. And Taniguchi, M. A kinetic model of the synergism of endo and exoglucanase and β - glucosidase on hydrolysis of cellulose, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. ,Vol 28/29, 145- 156, 1995.
- Fu liu, C. Ren, J. Xu, F. Jui Liu, J. Jxia Sun, J. And Sun, R. Isolation and Characterization of Cellulose Obtained from Ultrasonic Irradiated Sugarcane Bagasse, *J. Agric. Food Chem*; 54, 5742-5748, 2006
- Galbe, M. And Zacchi, G. A review of the production of ethanol from softwood, *Appl. Microbial biotechnol*; 59, 618- 628, 2002

- GENENCOR[®], DANISCO DIVISION, Product information, Cellulase enzyme complex for lignocellulosic biomass hydrolysis, accessory beta- glucosidase enzyme for biomass hydrolysis, Xylanase/cellulose enzyme complex for biomass hydrolysis, , accessory Xylanase enzyme for biomass hydrolysis . Available <http://www.genencor.com> (citado 18 diciembre 2010)
- Ghose, TK. Measure cellulose activities, *Pure & Appl. Chem*; Vol. 59, No. 2, 257-268; 1987
- Gianfreda, L. Xu, F. And Bollag, J. Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes, *Bioremediation Journal*; vol 3, 1-26, 1999
- Given, JD. Air Quality Report, *Lousiana Department of environmental quality*, 1996
- Gómez, CH. Caracterización preliminar de los polisacáridos presentes en los residuos de cosecha (Hojas y cogollos) de tres variedades (CC8475, CC8592, V7151) de caña de azúcar, [MSc tesis], Universidad del Valle, Colombia, 2010
- Gonzales, A. Caracterización de hemicelulosas presentes en los residuos de cosecha de tres variedades (CC 84-75, CC 85-92 y V 71-51) de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), [tesis para optar titulo de Química], Universidad del Valle, Colombia, 2010
- Han, M. And Seong, B. Enzyme kinetic of multiple inhibitions in presence of two reversible inhibitors, *Bulletin of Korean Chemical Society*; Vol3. No 3, 1982
- Heitz, M. Carrasco. F, Rubio, M. Brown, A. Chornet, E. And Overend, R. Physico-chemical characterization of lignocellulosic substrates pretreated via autohydrolysis: an application to tropical woods, *Biomass*; 13, 255-273, 1987
- Henrissat, B. Cellulases and their interaction with cellulose, *Cellulose*; 1, 169-196, 1994
- Hetti, P. Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. [PhD Thesis]. Finland. Helsinki University of Technology, 2004
- Hodge, DB. Karim, MN. Schell, DJ. McMillan, JD. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocelluloses, *Bioresour Technol*; 99,8940-8948, 2008

- Holtzapple, M. Cognata, M. Shu, Y. And Hendrickson, C. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnology and Bioengineering*; 36 , 275-287, 1990.
- Holtzapple, M. Caran, H. And Humphrey, A. The HCH-1 model enzymatic cellulose hydrolysis, *Biotechnology and Bioengineering*; vol XXVI, 775 -780, 1984
- Hosokawa, M. Suzuki, S. Umezawata, T. And Sato, Y. Progress of lignification mediated by intracellular traspotation of monolignols during tracheary element differentiation of isolated zinnia mesophyll cells, *Plant cell physiol*; 42, 959-968, 2001
- Jorgensen, H. Kutter, J. And Olson, L. Separation and quantification of cellulases and hemicellulases by capillary electrophoresis, *Anal. Biochem*; 317, pp.85-93, 2003
- Jong-Rok, J. Murugesan, K. Kim, Y. Kim, E. And Chang, Y. Synergistic effect of laccase mediators on entachlorophenol removal by *Ganoderma lucidum* laccase, *Appl Microbiol Biotechnol*; 81, 783–790, 2008.
- Juha'sz, T. Szengyel, Z. Re'czey, K. Siika-Aho, M. And Viikari, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources, *Process Biochemistry*; 40, 3519–3525, 2005
- Jurado, M. Prieto, A. Martínez-Alcalá, A. And Martínez, MJ. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation Bioethanol, *Bioresource Technology*; 100, 6378 -6384, 2009
- Kaar, WR. Gutiérrez, WR. And Kinoshita, CM. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol, *Biomass and Bioenergy*; Vol. 14, No. 3, 277-287, 1998.
- Kadam, K L. Rydholm, E C. And Mcmillan, J D. 2004. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass, *Biotechnol Prog*; 20, 698–705, 2004.
- Kim, K. Tucker, M. Keller, F. Aden, A. And Nguyen, Q. Continuous countercurrent extraction of hemicellulose from pretreated wood residues, *Applied Biochemistry and Biotechnology*; Vol. 91–93, 253- 267, 2001

- Kristensen, J B. Felby, C. and Jorgensen, H. 2009 Yield-determining factors in high solids enzymatic hydrolysis of lignocelluloses, *Biotechnology for Biofuels*; 2, 1-11, 2009
- Knauf, M. And Moniruzzaman, M. Lignocellulosic biomass: a perspective, *International sugar journal*; vol 106 No 1263, 1-5, 2004
- Knowles, J. Lehtovaara, P. And y Teeri, T. Cellulase families and their genes, *Trends in Biotechnology*; 5 255-261, 1987
- Krishna, SH. Reddy, TJ. And Chowdary, GV. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast, *Bioresorse Technology*; 77, 193.196, 2001
- Kubicek, C. And Penttilä, M. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma* and *Gliocladium*, *Biological Control and Commercial Applications*; 2, 49 – 61, 1998
- Kumar, R. Singh, S. And Sinng, O. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives, *J. Ind Microbiol Biotechnol*; 35, 77–391, 2008
- Kuwahara, M. Glenn, J, Morgan, M. And Gold, M. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ -dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, *FEBS Lett*; 169, 247–50, 1984
- Larsson, P, Westland, P. Line sharps in CP/MAS C NMR spectro of cellulose I, *Spectrochim Acta part A*; 62, 539-546, 2005
- Laureano-Perez, L. Teymouri, F. Alizadeh, H. and Dale, B. Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass, *Applied Biochemistry and Biotechnology*; 121, 1081-1099, 2005
- Lee, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol, *Journal of Biotechnology*; 56,. 1-24, 1997
- Lee, H, Fan, L.. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: analysis of the initial rates, *Biotechnology and Bioengineering*; Vol XXIV, .2383-2406, 1982
- Levin, L. Herrmann, C. and Papinuti, V. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology, *Biochemical Engineering Journal* ;39, 207–214, 2008

- Lowry, O. Rosebrogh, N. Farr, A. And Randall R. Protein measurement with the phenol reagent, *Journal of Biol. Chem*; 3223 – 3239, 1951
- Mabee, W. Gregg, D. Arato, C. Berlin, A. Bura, R. Gilkes, N. Mirochnik, O. And Saddler J. Updates on Softwood-to-Ethanol Process Development, *Applied Biochemistry and Biotechnology* ;Vol. 129-132, 55-70, 2006
- Maganhotto de Souza Silva, M And Soares de Melo y De Oliveira P. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp, *Enzyme and Microbial Technology*; 37, 324–329, 2005
- Mais, U. Esteghlalian, A. Saddler, J. And Mansfield S. Enhancing the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using simultaneous ball milling, *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*; 98, 815-832, 2002
- Mandels, M. Andreotti, R. And Rocche, C. *biohecnol. Bioing. Symp*, 6- 17, 1976
- Mansfield, S. De Jong, E. Stephens, R. and Saddler J. Physical characterization of enzymatically modified kraft pulp fibers, *Journal of Biotechnology* ; 57, 205-216, 1977
- Mansikkamaki, P. Lahtinen, M. Rissanen, K. The conversion from cellulose I to cellulose II in NaOH mercerization performed in alcohol–water systems: An X-ray powder diffraction study. *Carbohydrate Polymers* 68, 35–43, 2007
- Marín, R. Caracterización y expresión recombinante de una celulasa de origen antartido,[trabajo de grado para optar título de ingeniero civil en biotecnología], *Facultad de Ciencias Físicas*, Universidad de Chile, 2007
- Margolles-Clark, E. Ilmén, M. and Penttilä, M. Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources, *Journal of Biotechnology*; 57, 167-179, 1977
- Martin, M. Delgenes, J. Moletta, R. And Navarro, J. Biomass degradation products affecting xylose fermentation by *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*, *Biomass Energy*; 1332-1336, 1992
- Martin, C. And Thonson, B. Next oxidation pretreatment of lignocellulosic residues of sugarcane, rice, cassava and peanuts for ethanol production, *Journal Technol Biotechnol* ; 82, 174 – 181, 2007

- Megazyme International Ireland Limited. Assay 1-4- β xylanase using Azo Xilan (OAT), SAXYO, available: <http://www.Megazyme.com>, [citado diciembre 2009]
- Megazine International Ireland Limited, ASSAY OF Rhamnogalacturonanase Using Azo- Rhamnogalacturonan AZRH 11/99) available: <http://www.Megazyme.com>, [citado diciembre 2009]
- Megazyme International Ireland Limited Ltda. Assay of endo 1-4- β -D Galactanase using AZO –GALACTAN (AGALP), available: <http://www.Megazyme.com>, [citado diciembre 2009]
- Megazyme International Ireland Limited, Assay of 1-4- β - endo Mannanase using AZO- CAROB GALACTOMANNAN available: <http://www.Megazyme.com>, [citado diciembre 2009]
- Millett, M. Effland, M. And Caulfield, D. Influence of Fine Grinding on the Hydrolysis of Cellulosic Materials—Acid Vs. Enzymatic, *Advances in Chemistry*, Vol. 181, 71–89, 1979
- Meza, L. Gonzales, E. Ruiz, E. Romero, I. Cara, C. Felissia, F. And Castro, E. Preliminary evaluation of organosolv pre-treatment of sugar cane bagasse for glucose production: Application of 2³ experimental design, *Applied Energy*; 87, 109-114, 2010.
- Mohagheghi, A. Tucker, M. Grohmann, K. And Wyman, C. High Solids Simultaneous Saccharification and Fermentation of Pretreated Wheat Straw to Ethanol, *Appl Biochem Biotechnol*; 33, 67-8, 1992
- Moreira, N. Growing expectations: new technology could turn fuel into a bump crop, *Sci News Online*; 168, 209-224, 2005
- Mosier, N. Hall, P. Ladisch, C. And Ladisch, M. Reaction kinetics, molecular action and mechanisms of cellulolytic proteins, *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 65, 23-40, 1999
- Mosier, N. Wyman, C- Dale, B. Elander, R. Lee, Y. Holtzapple, M. And Ladisch, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*; 96, 673–686, 2005
- Movagarnejad, K. Sohrabi, M. Kaghazchi, T. And Vahabzadeh, F. A Model for the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in heterogeneous solid – liquid systems, *Biochemical Engineering Journal*; 4, 197-206, 2000

- Movagarnejad, K. Sohrabi, M. A Model for the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in heterogeneous solid – liquid systems, *Biochemical Engineering Journal*, 14, 1-8, 2003
- Mooney, C; Mansfield, S. Touhy, M. And Saddler J. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods, *Bioresource Technology*; 64, 113-119, 1988
- Mooney, C, Mansfield, S. Beatson, R. And Saddler J. The effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulase accessibility to softwood substrates, *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 644-650, 1999
- Moriya, R. Adilson, R. Fabrícia, P. Enzymatic Bleaching of Organosolv Sugarcane Bagasse Pulps with Recombinant Xylanase of the Fungus *Humicola grisea* and with Commercial Cartazyme HS Xylanase, *Applied Biochemistry and Biotechnology*; Vol. 121–124, 95-203, 2005
- Miller, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars, *Analytical chemistry*; 31, 426- 426, 1959
- Mussato, S. Fernandez, M. Milagres, A. And Roberto, I. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain, *Enzyme and Microbial Technology*; 43, 124-149, 2008
- Mutis, D. Delignificación de residuos de la caña de azúcar (hojas y cogollos) con procesos químicos, Grupo de Investigación en Biocombustibles (GRUBIOC), [trabajo de grado para optar título de ingeniero químico], Universidad del Valle, Colombia, 2009
- Ohmine, K. Ooshima, H. And Harano, Y. Kinetic Study On Enzymatic Hydrolysis Of Cellulose By Cellulase From *Trichoderma Viride*, *Biotechnology and Bioengineering*; 25, 2041-2053, 1983
- Olsson, L. And Hahn – Hagerdal, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, *Enzyme and Microbial Technology*; 18, 312- 331, 1996
- Orsi, B. And Tipton, F. Enzyme kinetics and mechanism part A. Initial rate and inhibitor, *Methods Enzymology*; 63, 159-183, 1979

- Ortega, G. Bueno, G. Betancourt, D. Álvarez, I. And González, A. Biotransformación de Residuos Lignocelulósicos con Hongos *Pleurotus*, Revista *CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 36, No. Especial, 2005
- Palmqvist, B. Wiman, M. and Lidén, G. Effect of mixing on enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce: a quantitative analysis of conversion and power consumption, *Biotechnology for Biofuels*; 4, 1-10, 2011
- Palmieri, G. Giardina, P. Bianco, C. Scaloni, A. Capasso, A. And Sannia, G. Novel White laccase from *Pleurotus ostreatus*, *Journal of Biological Chemistry*; 272, 31301-31307, 1997
- Palonen, H. Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. [Dissertation for the degree of doctor of technology], *Helsinki University Technology*, 2004
- Pan, X. Role of functional groups in lignin inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose to glucose, *J Biobased Mater Bioenergy*; 2, 25-32, 2008
- Panagiotou, G. Olsson, L. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates, *Biotechnol Bioeng.* , 96, 250-258, 2007
- Park, S. Baker, J. Himmel, M. Parilla, P. And K Johnson, D. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance, *Biotechnology for Biofuels* , 3-10, 2010
- Peng, F, Rin, J. Xu, F. Bian, J. Peng, P. and Sun, R. Comparative study hemicellulose obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse, *J. agric. Food chem*; 57, 6305 – 6317, 2009
- Peri, S. Karra, S. Lee, Y. And Karim, N. Modeling intrinsic kinetics of enzymatic cellulose hydrolysis, *Biotechnol progress*; 23, 626-637, 2007
- Philippidis, G. and Smith, T. Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol, *Appl. Biochem and Biotech*; 51/52, 117- 124, 1995
- Philippidis, G. Smith, T. And Wyman C. Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification process, *Biotechnol. Bioeng*; 41, 846, -853, 1993

- Poletto, M. Pistor, V. Zeni, M. Zattera, A. Crystalline properties and decomposition kinetics of cellulose fibers in wood pulp obtained by two pulping processes. *Polym. Degrad. Stabil.* 96 (4), 679–685, 2011
- Quian, X. Ding, S; Ninlos, M. Johnson, D. And Himmel, M. Atomic and electronic structures of molecular crystalline cellulose I_β, A first- principles investigation, *Macromolecules*; 38,10580- 10589, 2005
- Ralph, J. Lundquist, K. And Brunow, G. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4 – hydroxyphenyl-propanoides, *Phytochem Rev* 3, 29-60, 2004
- Ramírez, N. Vargas, M. Ariza, J. And Martínez, C. Characterising laccase obtained by two production methods using *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol 5, No 2, 64-72 , 2003
- Ramos, R. And Gutiérrez, M. Determinación de patrones electroforéticos de celulasas producidas en fermentación sumergida *Trichoderma reesei* LM-UC4, *Revista ciencias biológicas*; XVIII, No 99, 1999
- Ranby, B. G. The Mercerization of cellulose. *Acta Chemica Scandinavica*, 6, 116–127, 1952.
- Rodríguez, S. And Sanroman, M. Application of solid-state fermentation to lignolytic enzyme production, *Biochemical Engineering Journal*, 22, 211-219, 2005
- Rolz, C. de Leon, R. De Arriola, M. and De Cabrera, S. White-rot fungal growth on sugarcane lignocellulosic residue, *Appl Microbiol Biotechnol*; 25, 535-541, 1987
- Rombouts, F. Voragen, A. Searle-van Leeuwen, M., Geraeds, C. Schols, H. And Pilnik, W. The arabinanases of *Aspergillus niger* — Purification and characterisation of two α -l-arabinofuranosidases and an *endo*-1,5- α -l-arabinanase, *Carbohydrate Polymers*; Volume 9, Issue 1, 25-47, 1988
- Rosgaard, L. Andric, P. Dam-Johansen, K. Pedersen, S. Meyer, A. Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw, *Appl Biochem Biotechnol*; 143,27- 40, 2007

- Ruiz-Dueñas, F. Martínez, M. And Martínez A. Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*, *Molecular Microbiology*; 31, 223-235, 1999
- Rydholm, S. In: pulping processes, *interscience.*, New York; 90 – 100, 1995
- Ruzene, D. Silva, D. Vicente, A. Teixeira, J. Pessoa de Amorim, M. And Gonçalves AR. Cellulosic Films Obtained from the Treatment of Sugarcane Bagasse Fibers with N-methylmorpholine-N-oxide (NMMO), *Appl Biochem Biotechnol*; 154, pp. 217–226, 2009
- Saad, M., Oliveira, L. Candido, R. Quintana, G. And Rocha, G. Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping, *Enzyme and Microbial Technology*; 43, 220–225, 2008
- Saha, B. Item, L. Cotta, M. And Wu, Y. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol, *Biotechnology Progress*; 21, 816–822, 2005.
- Salcedo, J. Pardo, L. y López, J. Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha de la caña de azúcar, *Revista Dyna*; 168, 182- 190, 2011
- Sanchez, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi, *Biotechnology Advances*; Vol 27, 185-294, 2008
- Sanchez, O. And Cardona, C. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresource Technology*; 99 , 5270–5295, 2008
- Santoyo, A. Garcia, H. Rodríguez, A. Celulosomas: sistemas multiEnzimáticos, *Journal of the Mexican chemical society*; vol 3, 137-142, 1999
- Saparrat, M. Mocchiutti, P. And Liggieri, C. Ligninolytic enzyme ability and potential biotechnology applications of the white-rot fungus *Grammothele subargentea* LPSC no. 436 strain, *Process Biochemistry*; 43, 368–375, 2008
- Sarrouh, B. Silva, S. Santos, D. And Converti, A. Technical/Economical Evaluation of Sugarcane Bagasse Hydrolysis for Bioethanol Production, *Chem. Eng. Technol*; 30, 270–275, 2007

- Segal, L. Creely, J. Martin, A. y Conrad, CM. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, Princeton, **29**(10):786-794, 195
- Singh, R. Singh, S. Trimukhe, K. Pandare, K., Bastawade, K. Gokhale, D. And Varma, A. Lignin–carbohydrate complexes from sugarcane bagasse: Preparation, purification, and characterization, *Carbohydrate Polymers*; Volume 62, 57-66, 2005
- Silva, R. Gonzáles, A. And Villar, J. Delignificación enzimática de pasta al sulfato de E. Globulus empleando lacasas fúngicas, *Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel*, CIADICYP; 2002
- Sluiter, A. Hames, B. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, *Technical Report NREL/TP-510-42618*; 2008
- Sørensen, I. Pedersen, S. Meyer, A. Optimization of reaction conditions for enzymatic viscosity reduction and hydrolysis of wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue, *Biotechnol Prog*; 22,505-513, 2006.
- Sterberg, D. VijayKumar, R. And Reese, E, *Can. J. Microbiol.* 23, 139, citado por Wood M and Bhat M; 1988.
- Sun, Y And Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review, *Bioresource Technol*; 83, 1-11, 2002
- Sun, R., Fang, J. And Tomkinsom, J. Fractional isolation physic chemical characterization and homogeneous sterification of hemicelluloses from fast – growing poplar wood, *Carbohydr polym*; 44, 29-39, 2001
- Sun, J. Sun, X. Zhao, H. And Sun, R. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse, *Polym. Degrad.Stab*; 84, 331-339, 2004
- Taherzadeh, M. And Karimi, K. Enzyme – based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials : A review, *Bioresources*; 2, 707-738, 2007
- Tassinari, T. Macy, C. And Spano Leo, A. Technology Advances for Continuous Compression Milling Pretreatment of Lignocellulosics for Enzymatic Hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXIV, 1495-1505 Published by John Wiley & Sons, Inc, 1982
- Teeri, T. Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases, *Trends in Biotechnology*; 15, 160-167, 1997

- Temborg, C. Galbe, M. Zacchi, G. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steampretreated softwood, *Biotechnology Progress*; 17, 110–117, 2001.
- Triana, O Abril, A. And Wong, A. Variedades de caña de azúcar de Iberoam alto contenido en fibra como fuente de fibras para la industria del papel, *V congreso Iberoamericano de investigación en celulosa y papel*; Gaudalajara, México), 2008
- Tsao, G., Ladish, M. And Voloch, M. Production of ethanol and chemicals from cellulosic materials, *Proc. Biochem*; 17, 34-38, 1982
- Van Soest, P. 1983. Use of detergents in the Analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content, *Journal of the AOAC*; 46, 829 – 835, 1983
- Van Zyl, C. Prior, B. And Du Preez, J. Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*, *Enzyme and Microbial Technology*; 13, 82-86, 1991
- Viamajala. S. McMillan, J. Schell, D. Elander, R. 2009. Rheology of corn stover slurries at high solids concentrations – Effects of saccharification and particle size, *Bioresource Technology*; 100, 925–934, 2009
- Watson, N. Prior, B. Lategan, P. And Lussi, M. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from d-xylose by *Pachysolen*, *Enzyme and Microbial Technology*; 6, 451-45, 1984
- Weast, R. *CRC handbook of chemistry and physics*, (66th ed.). Boca Raton: CRC, 1985.
- Weng, J. And Bonawitz, N. Emerging strategies of lignin engineering degradation for cellulosic biofuel production, *Current opinion in Biotechnology*; 19, 166-172, 2008
- Wenzl, H. The chemical thecnology of wood. *Academic press*, New York and London. 1970
- Wheals, A. Basso, L. And Álvarez, A. Fuel ethanol after 25 years, *Trend Biotechnol*; 17, 482-489, 1999

- Wingren, A. Galbe, M. Zach, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol, from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks, *Biotechnol prog*; 19:1109-1117, 2003
- Wood, T. And Bhat, M. Methods for measuring Cellulase activities, *Methods in Enzymology*; vol 60, 87 – 11, 1988
- Wood, T. And Saddler, J. Increasing the ability of cellulose in biomass materials. In: Wood WA, Kelloggs ST, *Methods in enzymology*; vol 160. Academic, San Diego, CA, 311, 1998
- Wyman, C. Handbook on Bioethanol: production and utilization. Washinnton, DC, Taylor & francis, 1996
- Yan, B. And Wyman, C. Pretreatment: the key to unlocking low – cost cellulosic ethanol, *Biofuels Bioproducts & Biorefining*; 2, 26-40, 2007
- Yeh, A. And Chen. S. Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose, *Carbohydrate Polymers*; 79, 192–199, 2010
- Yoshida, H. Chemistry of lacquer (Urushi), *J. Chem.Soc*; 43, 472-486, 1983
- Yu, Z. And Zhang, H. Ethanol fermentation of acid hidrolized cellulosic with *Saccharomyce Serevisae*, *Bioresourse technology*; 93, 199-204, 2004
- Yonetani, T. And Theorell, H. Studies on liver alcohol dehydrogenase complexes: III Multiple inhibition kinetics in the presence of two competitive inhibitors, *Archives of Biochemistry and Biophysics*; Vol106, 243-251, 1964
- Zabel, R. And Morrell, J. *Wood Microbiology: Decay and Its Prevention*; Academic Press, London, 1992
- Zadeh, L. Fuzzy sets Information & Control; 8, 338- 353, 1965
- Zach, G. Axelsosn, A. Economic- evaluation of preconcentration in production of ethanol from diluite sugar solutions, *Biotechnol Bioeng*; 34, 223-233, 1989
- Zhang, Y. And Lynd, L. Quantification of cell and cellulase mass concentrations during anaerobic cellulose fermentation: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay-based method with application to *Clostridium thermocellum* batch cultures. *Analytical Chemistry*, 75, 219-227, 2003

- Zhang, Y. And Lynd L. Kinetics and Relative Importance of Phosphorolytic and Hydrolytic Cleavage of Cellodextrins and Cellobiose in Cell Extracts of *Clostridium thermocellum*, *Applied and Environmental Microbiology*; 70. 1563-1569, 2004
- Zhang, S. Wolfgang, D. And Wilson, D. Substrate Heterogeneity Causes the Nonlinear Kinetics of Insoluble Cellulose Hydrolysis, *Biotechnology and Bioengineering*; vol. 66, no. 1, 1998
- Zhang, J. Chu, D. Huang, J. Yu, Z. Dai, G. Bao, J. Simultaneous Saccharification and Ethanol Fermentation at High Corn Stover Solids Loading in a Helical Stirring Bioreactor, *Biotechnology and Bioengineering*; Vol. 105, 718-728, 2010
- Zhang, J., Dongli, L., Zhang, X., & Yuguan, S. Solvent effect on carboxymethylation of cellulose. *Journal of Applied Polymer Science*, 49, 741–746. 1993
- Zykvisnka, F. Ralet, M. Garnier, C. And Thibault, F. Evidence for vitro binding of pectin side chains to cellulose, *Plant physiol*; 139, 397- 407, 2005

ANEXOS Y APÉNDICES

Anexo A. Enzimas Comerciales

Tabla 21. Característica de enzimas comerciales

ENZIMA	ACTIVIDAD DECLARADA	TIPO	PRODUCTOR	MICROORGANISMO
Celluclast® 1.5 L	700 EGU/g	Celulasa	Novozymes	<i>Trichoderma reesei</i>
Citrozym® Ultra L	4500 PECTU/ml	Polygalacturonase	Novozymes	<i>Aspergillus aculeatus</i> <i>Aspergillus niger</i>
ACCELLERASE™ 1500	2200 - 2800 CMC U/g, endoglucanasa 525 - 775 pNPG U/g Beta glucosidasa	Celulasa	Genecor	<i>Trichoderma reesei.</i>
ACCELLERASE® BG	3000 pNPG U/g (minimum) Beta-glucosidase	Glucosidasa	Genecor	<i>Trichoderma reesei.</i>
ACCELLERASE® XC	Endoglucanase Activity: 1000 - 1400 CMC U/g Xylanase Activity: 2500 - 3800 ABXU/g	Endoglucanasa xilanasa	Genecor	<i>Penicillium funiculosum.</i>
ACCELLERASE® XY	20,000 - 30,000 ABXU/g	Xylanase	Genecor	<i>Trichoderma reesei.</i>
Pectinex ultra SPL	9500 PGU/ml	Polygalacturonase	Novozyme	<i>Aspergillus aculeatus</i>
Optimash BG		Beta glucanasa	Genecor Danisco	
Rapidase –Adex		pectinasa	DMS	
Klerzyme -150		Pectinasa	DMS	
Clarex Citrus		Pectinasa	DMS	
Cytolase PCIS		pectinasa		
Viscozyme L		arabanase, cellulase, β- glucanase, hemicellulase, and xylanase	Novozyme	<i>Aspegillus Niger</i>
Ultrazym AFPL		Pectinasa	Novozyme	

Anexo B. Métodos para determinación de actividad enzimática.

Se han descrito diferentes métodos para la determinación de la actividad enzimática de enzimas usadas para la hidrólisis de sustratos de lignocelulíticos, partiendo de sustratos específicos. A continuación se describen algunos métodos.

Lacasa. La caracterización y evaluación de diferentes métodos de purificación y separación cromatográfica de caldos ricos en enzima lacasa, producida por una variedad del basidiomycete *Pleurotus ostreatus*, se puede llevar a cabo en diferentes procesos de producción como FES (Fermentación en Estado Sólido) y fermentación sumergida. El proceso FES se basa en la producción de un extracto de caldo crudo rico en enzima lacasa, a partir del crecimiento micelial sobre salvado con vinaza en relación 1:1 w/v durante 20 días. Se obtiene un caldo crudo con una actividad promedio de 20 U/ml. En el caso del proceso de fermentación en estado sumergido, se logra un crecimiento del hongo en forma *de pellets*, en un período de 15 días, con actividad promedio de 10 U/ml en el caldo crudo (Ramírez *et al*, 2003).

Levin L. *et al*, 2008, investigaron sobre la optimización en la producción de lacasa por el hongo de podredumbre blanca *Trametes trigii* en fermentación en estado sólido usando un diseño experimental de superficie de respuesta. Se determinó el impacto sobre la producción de enzimas de tres variables: pH, concentración de cobre y nitrógeno, utilizando como sustrato madera suplementada con extracto de malta. Las condiciones optimas alcanzadas fueron: pH 4,5, peptona 12,5 g/L y cobre 11 mM. Las actividades fueron: lacasa 901 U/g y Mn peroxidasa 20 U/g .

La valoración de la actividad fenoloxidasa, se realizó a 25 °C empleando ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)(ABTS 0.5mM), guaiacol, 2-3 dimetoxifenol y syrnaldadina como sustrato, en un buffer de acetato de sodio 125 mM, pH 4.5. La oxidación del ABTS se siguió por el incremento en la absorbencia a 420 nm ($s = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La actividad enzimática se expresa como unidades internacionales en función del volumen (U/ml) (Bourbonnais *et al.*, 1995; Palmieri *et al.*, 1997).

Manganeso Peroxidasa (MnP) y Lignina Peroxidasa (LiP). El ensayo se basa en el acoplamiento de la 3-metil-2- enzotiazolinona (MBTH) y ácido 3-(dimetilamino) benzoico (DMAB), la reacción de MBTH y DMAB en presencia de H_2O_2 , Mn^{2+} , y MnP, da un color azul púrpura profundo con un ancho de banda de 590 nm, el coeficiente de extinción es alto (5300M/cm), por lo que actividades bajas de MnP pueden ser detectadas. En este ensayo se usó una mezcla conteniendo 0,07 mM de MBTH, 0,99 nM de DMAB, 0,3 mM de MnSO_4 , 17 nM de MnP, 0,05 mM de H_2O_2 y 100 mM de un tampón de ácido láctico – succínico, pH de 4,5 en un volumen total de 2 ml. La reacción fue iniciada por la adición de

H₂O₂, cuando se probó el efecto de las diferentes concentraciones, la cantidad de los otros componentes se mantuvo constante, la reacción se realiza a 37 °C (Castillo *et al*, 1994).

La actividad de la lignina peroxidasa puede ser evaluada por espectrofotometría UV del veratryl aldehído producido en un ancho de banda de 310 (9300 M⁻¹cm⁻¹). Durante la oxidación del alcohol veratrílico, la mezcla de reactivos contiene 375 µL bufer de tartrato de sodio 0,33 M, pH 3, 125 µL de alcohol veratrílico 4 mM; 10 mM de peróxido de hidrógeno; 450 µL de agua destilada; 250 µL de enzima o medio de cultivo para un volumen final de 1250 µL (Maganhotto De Souza Silva *et al*, 2005).

La actividad de la MnP se puede medir a 610 nm (4460 M⁻¹cm⁻¹, una mezcla de reactivos (1 ml) conteniendo: enzima o medio de cultivo 500µL; rojo fenol (100 µL); lactato de sodio (500 µL); albúmina bovina 0,5 % (200 µL); sulfato de manganeso 2 mM (50 µL) y peróxido de hidrógeno 2 mM (50 µL) preparado en buffer succinato de sodio 20 mM pH 4.0. la reacción ocurre a 30 °C por 5 minutos y es interrumpida por NaOH (40 µL). (Kuwahara *et al*, 1984).

Xilanasa. En el procedimiento para determinar la actividad de la xilanasa, se incuban 0,5 ml de enzima en tampón de acetato de sodio (0,1 M) a pH 4,6 con sustrato 0,5 ml de cebada (S. AXYO) preequilibrada con el mismo tampón. Se mezcla vigorosamente la suspensión y se incuba a 40 °C por 10 minutos. La reacción se detiene con 2,5 ml de etanol al 95%, el sobrenadante se separa por centrifugación (1000 g por 10 minutos) y se lee a 590 nm. Adicionalmente, se prepara el blanco bajo iguales condiciones solo que se adiciona alcohol al sustrato por la enzima. La actividad se determina con referencia a una curva estándar, en la que se cuantifica la cantidad de xilosa por azúcares reductores (Megazyme International Ireland Limited, 2006).

1,4-β-D Mannanasa. Se determina incubando 2 mg/ml de sustrato (MANNAN P-MANCB de megazyme), con solución de enzima a pH 4 y 40 °C por 10 minutos. Después de separar el sobrenadante se cuantifican los azúcares reductores por el método DNS descrito por Miller en 1959 (Megazyme, 2009).

Endo – 1- 4 –β-D- galactanasa. Para determinar la actividad se procede con el protocolo de Megazyme (Megazyme, 2009), en el cual se incuban 0,5 ml de sustrato (azo galactato péptico de papa, S-AGALP), al 2% p/v en agua y se equilibra con tampón acetato a pH 4, 40 °C por 10 minutos. La reacción se detiene con 2,5 ml de etanol al 95% (v/v), se centrifuga a (1000 g por 10 minutos) a 590 nm. El blanco se prepara adicionando etanol, antes de la adición

de enzima, la actividad se mide con respecto a una curva estándar, en la que se cuantifica la cantidad de galactosa por medio de azúcares reductores.

Arabinofuranosidasa (α -L – arabinofuranosidasa). Se define como la cantidad de enzima capaz de liberar un μ mol de α - L- arabinofuranosida por minuto, a partir de la adición de 0,05 ml de una solución de enzima y 0,10 ml de sustrato p-nitrofenil α -L-arabinofuranosida (sigma N- 3641) al 0,1% (w/v) a 0,35 ml de 0,05 M de buffer de acetato de sodio, pH 5,0. Después de la incubación por 1 hora a 30 °C, la reacción se detiene con 0,5 ml de 0,5 M de glicina – buffer de hidróxido de sodio a pH 9,0, el cual contiene 2 mM de disodium etilendiaminetetraacetato. La concentración de p- nitrofenol se determina por lectura de a 400 nm y usando coeficiente de extinción de 13 700 M⁻¹/cm (Rombouts *et al*, 1988).

Endo-rhamnogalacturoronasa. Para la determinación de la actividad se prepara una solución preequilibrada (0,2 ml), que se adiciona a un 0,5 ml de una solución 100 mM de un tampón de acetato de sodio de pH 5,5. La solución se mezcla en un vórtex y se incuba a 40 °C por 0, 5 y 10 minutos. La reacción finaliza cuando los sustratos de alto peso molecular se precipitan por adición de 2 ml de etanol (95% v/v) con vigorosa agitación por 10 segundos. Los tubos se dejan reposar por 5 minutos, posteriormente se centrifugan a 3000 rpm (1000 g) por 10 minutos. Se mide el incremento de la del sobrenadante a 590 nm. El blanco se prepara de la misma manera, pero adicionando alcohol al sustrato, antes que la enzima (Megazine International Ireland Limited, 2009).

La comisión de Biotecnología “International Unión of pure Applied Chemistry” (IUPAC), en 1984 publicó procesos estándares para la medida de la actividad de la celulosa y los sustratos que podrían ser tomados como referencia (ver Tabla 22)

Tabla 22. Sustratos de referencia para determinación de actividad enzimática de celulosa

ENZIMA	SUSTRATO
Celulosa completa	Algodón, papel filtro, hidrocélulosa, avicel
Celobiohidrolasas, exocelulasas, avicelasas	Avicel, hidrocélulosa, Celulosa amorfa, celu-oligosacáridos
Endo – 1 – 4 - β – glucanasa, CM celulasas, endoglucanasas, endocelulasas	Carboximetil celulosa, Hidroxyetilcelulosa, celu-oligosacáridos
β- glucosidasa	P nitrofenil β -D glucósido, salicin, esculin, celobiosa, celuoligosacáridos

Referencia: Methods for measure of cellulase activities, Ghose, 1987; methods for cellulose activities, Wood *et al* , 2007

Se pueden especificar tres enzimas principales encontradas en la celulasa que pueden degradar la celulosa, la endo-1-4- β - glucanasa, exo – 1-4- β - glucanasa y la β - glucosidasa.

Endo – 1-4- β - glucanasa. Hidroliza cadenas de celulosa al azar para producir cambios en el grado de polimerización. Incluye sustratos como carbometil celulosa (CMC), celulosa amorfa. Pero la celulosa cristalina como la fibra de algodón no es atacada de manera significativa. La hidrólisis de celulosa amorfa produce mezclas de glucosa, celobiosa y celuoligosacáridos solubles. La IUPAC recomienda el método usando carboximetil celulosa, el cual se describe de la siguiente forma.

A 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. Tal que, estén en el rango de reducción de 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) a 50 C° por 30 minutos. Posteriormente después de haber transcurrido el tiempo de reacción, se adicionan 3 ml de DNS, se lleva a ebullición por 5 minutos. 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)

Exocephidrolasas (exo- 1-4 - β glucanasas). Esta actúa removiendo glucosa y celobiosa de las cadenas finales no reductoras de la celobiohidrolasas. Es la enzima más común del sistema celulasa. avicel es un sustrato que puede ser de mucha ayuda en el aislamiento y medida de las actividades de celobiohidrolasas. El procedimiento de determinación de actividad de esta enzima con avicel, consiste en hacer reaccionar una mezcla que contiene 1% (w/v) de suspensión de avicel en buffer 0,1 M de acetato de sodio pH 4,8, agua y enzima hasta un volumen de 2 ml incubando, a 50 °C por 2 horas. Los tubos donde ocurre la reacción son centrifugados y la parte suspendida se le miden azúcares reductores. La curva de calibración se determina con cantidades conocidas de celobiosa, los azúcares son expresados en glucosa equivalente. (Ghose, 1987; Wood y Bhat, 1988; Mandels *et al*, 1976)

Flórez L. en el 2002, midió la actividad C1, utilizando como sustrato celulosa cristalina insoluble al 3% w/v en tampón acetato 0,05 M a pH 4,8. En este procedimiento se mezclan 4 ml de este sustrato con 1 ml de enzima diluida en el mismo tampón, se procede a la digestión por 1 hora a 50 C°. La reacción se detiene con 1 ml de NaOH 0.075 M. después, se procede a enfriar la suspensión y se centrifuga a 6000 g por 10 minutos, se toman 3 ml del sobrenadante para de cuantificar los azúcares reductores por el método DNS

β - glucosidasa. Estrictamente hablando la β - glucosidasa no es una celulasa, pero si un componente fundamental en el sistema de enzimas que componen la celulasa, ya que con ellas se completa la hidrólisis a glucosa de las cadenas cortas de celuoligosacáridos y celobiosa. El sistemas de enzima celulasa que contiene bajos niveles de β - glucosidasas tienen poca potencia sacarificante por la inhibición de endoglucanasas y celobiohidrolasas por celobiosa.

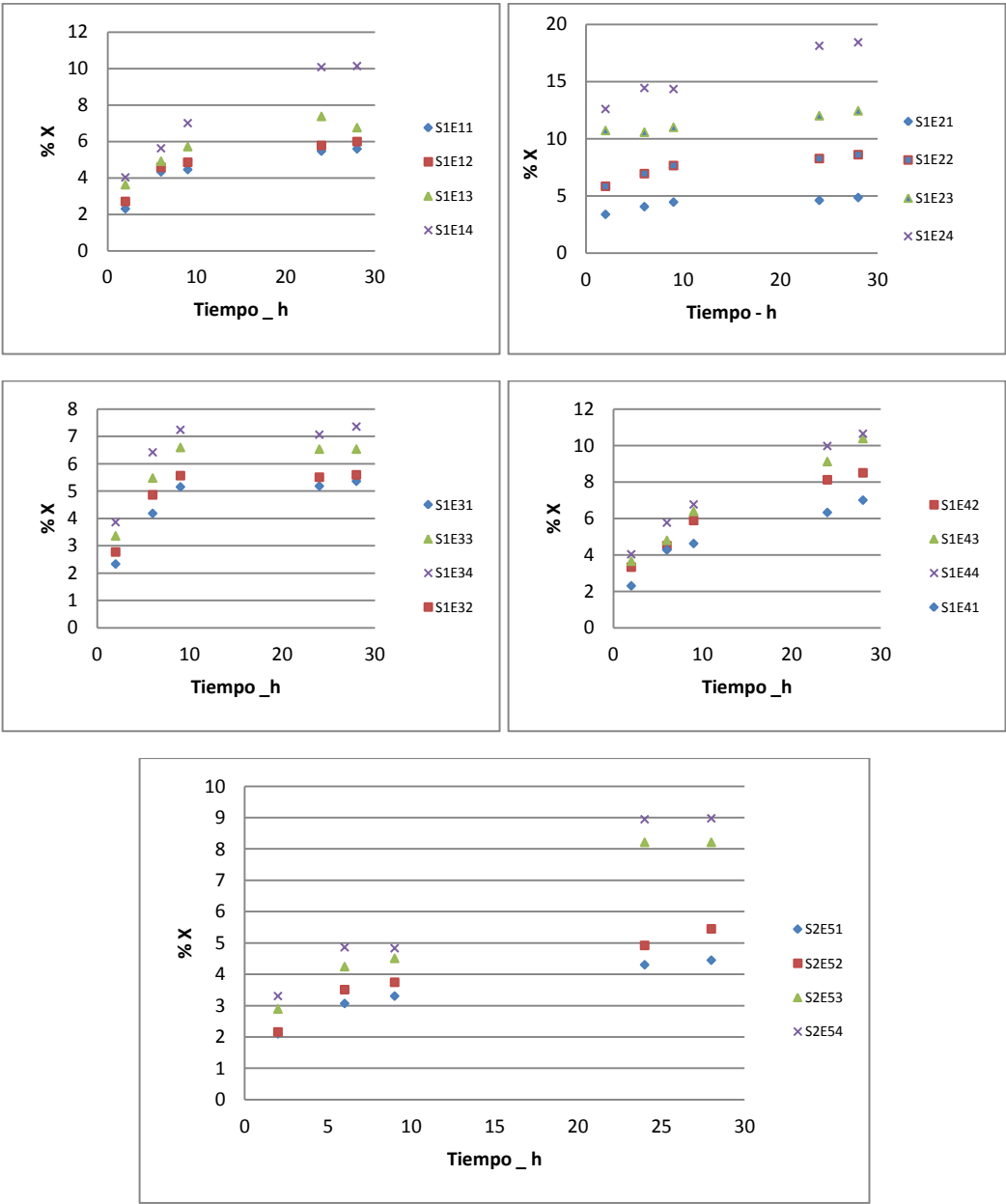
El procedimiento propuesto por la IUPAC utiliza como sustrato 15 mM de celobiosa en un buffer de citrato 0,05 M, pH 4,8. Se procede con la dilución de 1 ml de enzima en el buffer a temperatura de 50 °C y se adiciona 1 ml de solución de sustrato por 30 minutos. La reacción finaliza por inmersión en agua a ebullición por 5 minutos. Se determina el contenido de glucosa usando el método (kit de la reacción glucosa oxidasa GOD (Ghose, 1987; Wood y Batch, 1988; Sternberg *et al* ,1977).

Otro método, utiliza 200 μ l una solución 2 mM de pNPG(4-nitrophenyl β -D glucopyranosida), en un buffer acetato de sodio (50 mM, pH 5.0). La solución depende mucho de la actividad de la enzima. A los 200 μ l de pNPG se agregas μ l de solución de enzima, se deja reaccionar a 55 °C por 5 minutos. Se detiene la reacción adicionando una solución de carbonato de sodio 1 M (600 μ l) y finalmente se lee en espectrofotómetro a 405 nm.

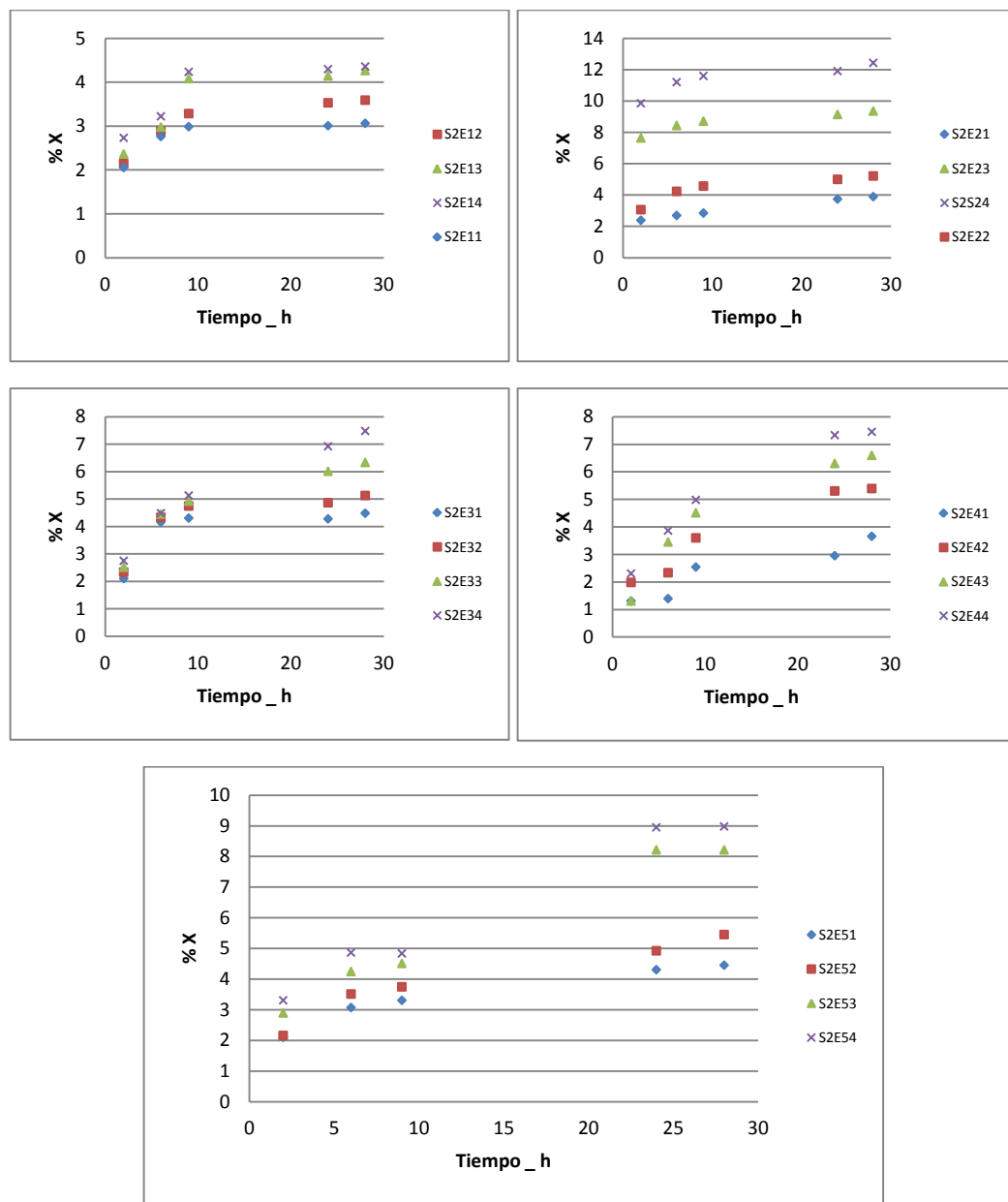
Sistema celulasa. Para la determinación de la actividad total de la celulasa, es importante el ensayo recomendado por IUPAC, que se basa sobre una cantidad fija (2 mg) de glucosa obtenida desde 50 mg de papel filtro.

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 buffer. El sustrato consta de tiras 1 X 6 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, el color formado se cuantifica 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).

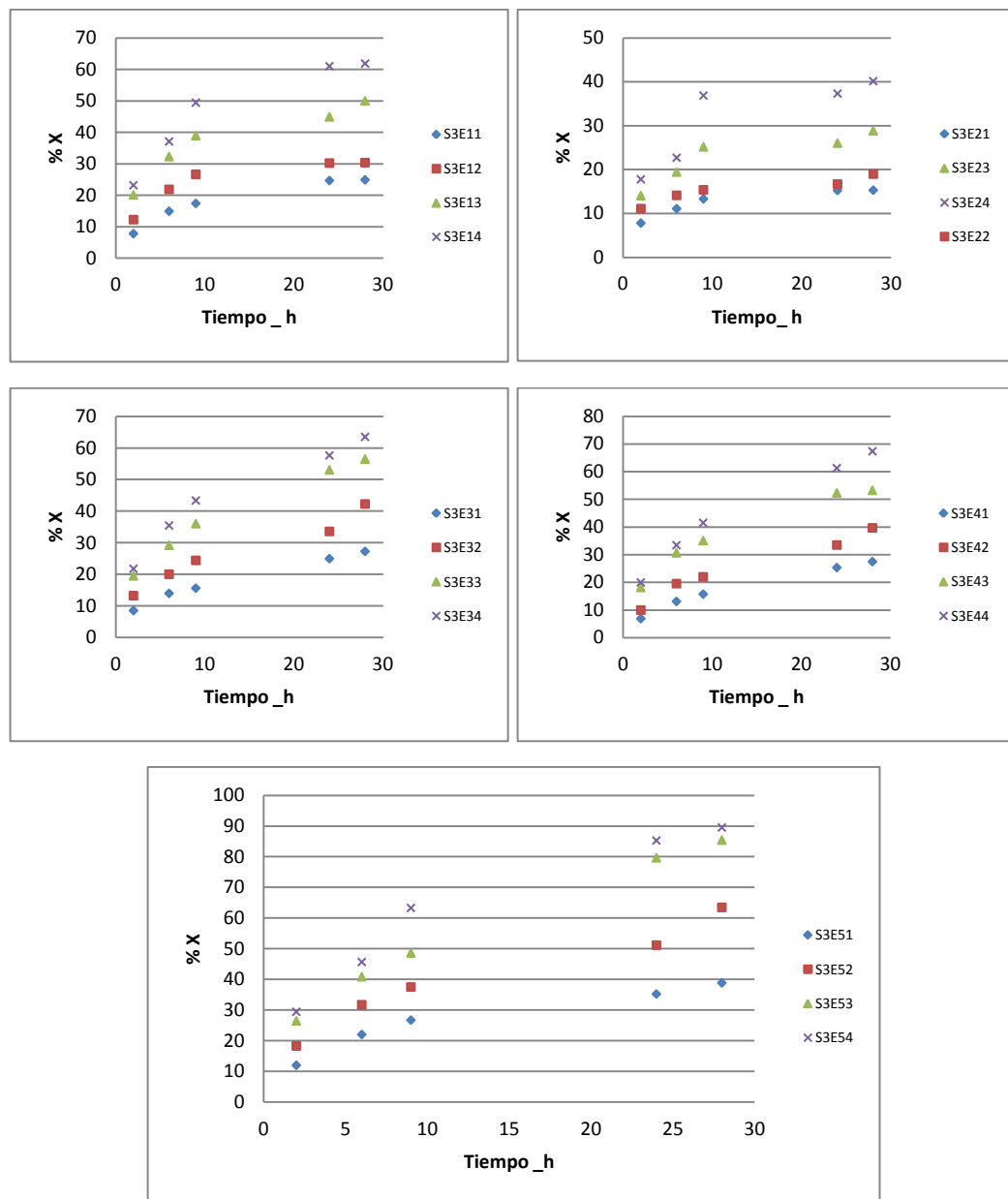
Anexo C. Curvas de progreso de porcentaje de sacarificación contra tiempo



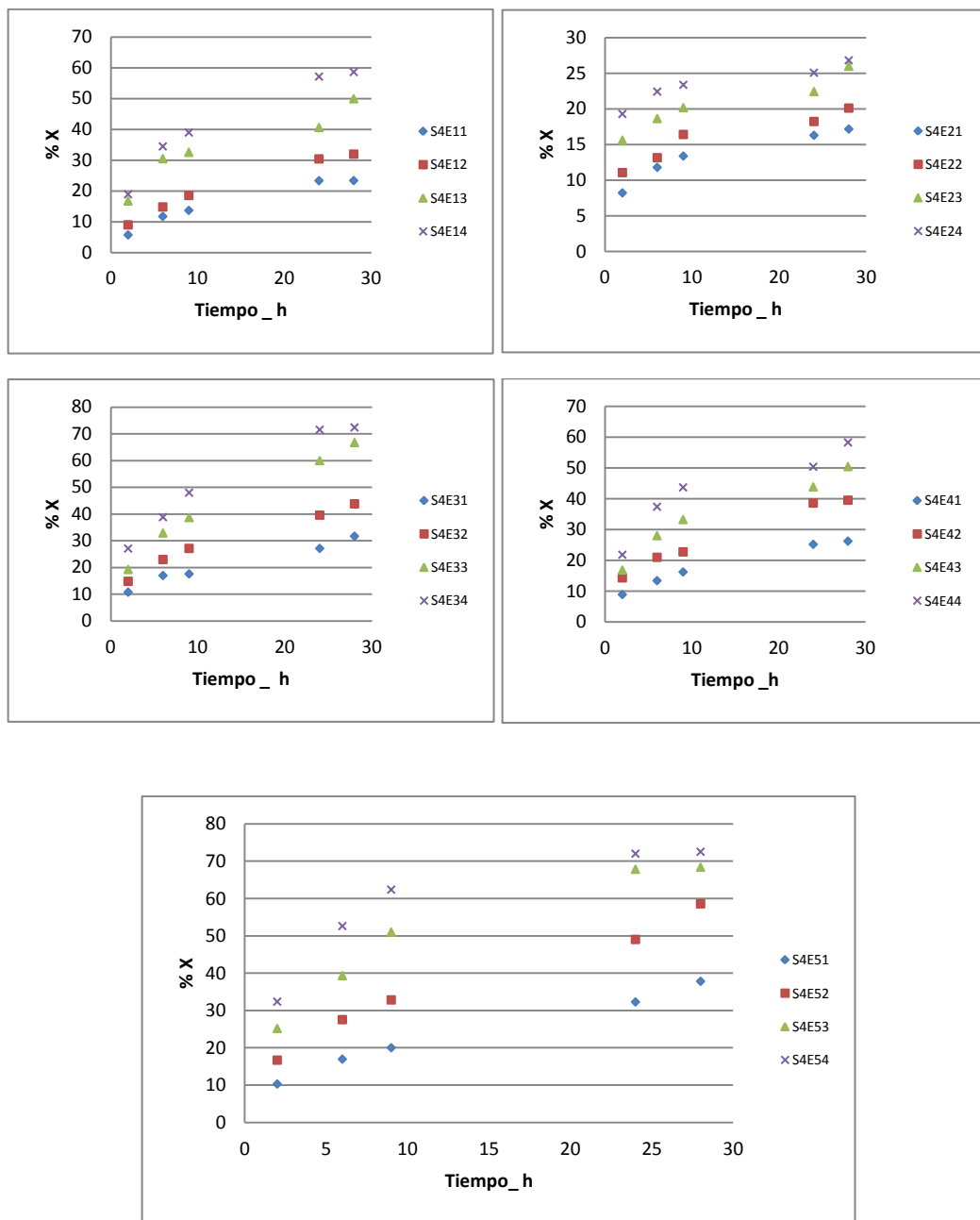
Gráfica 40. Curvas de progreso para el sustrato S1 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5; relaciones E/S (ml/g sustrato) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3



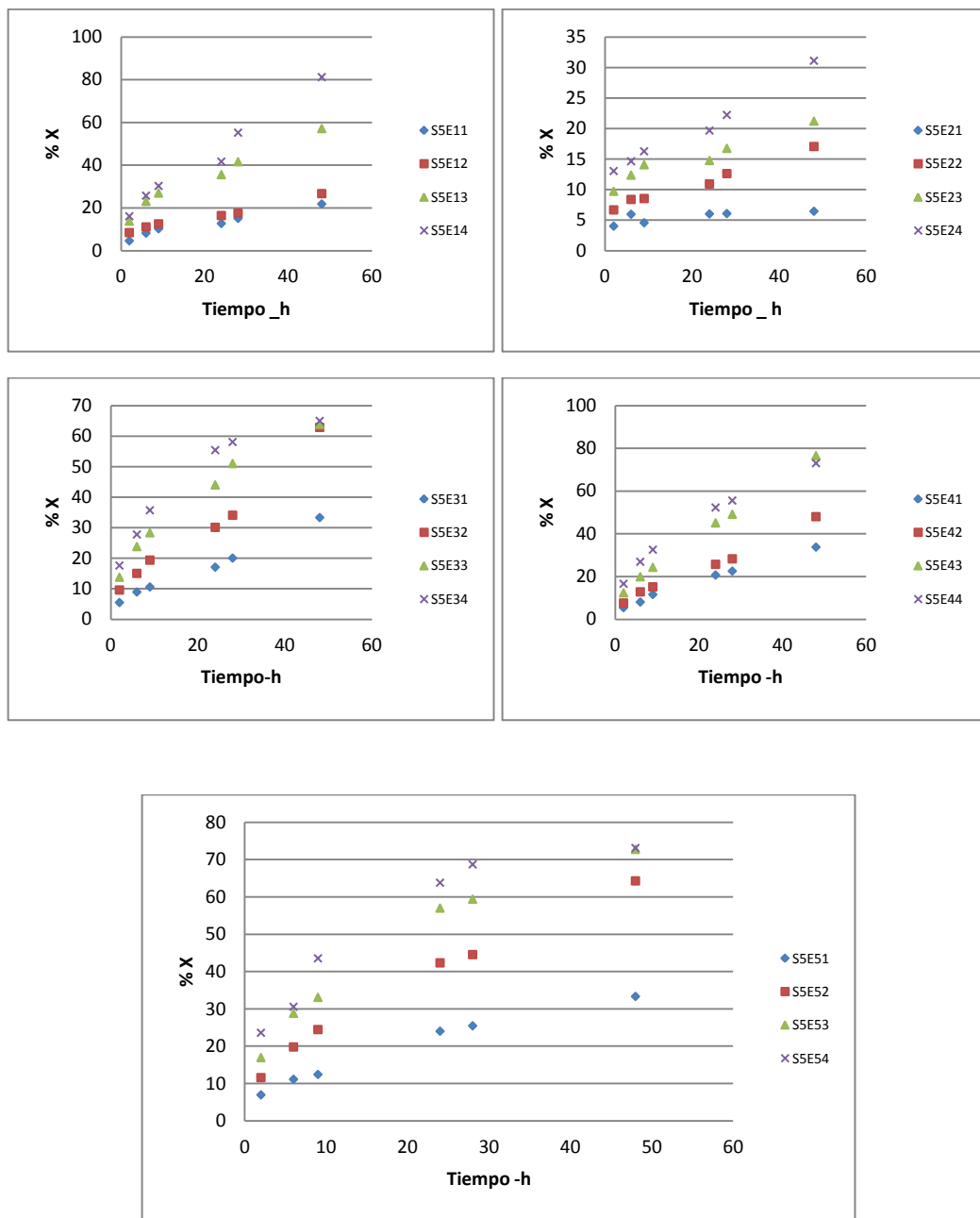
Gráfica 41. Curvas de progreso para el sustrato S1 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5; relaciones E/S (ml/g sustrato) de 0.05, 0.1, 0.2, 0,3



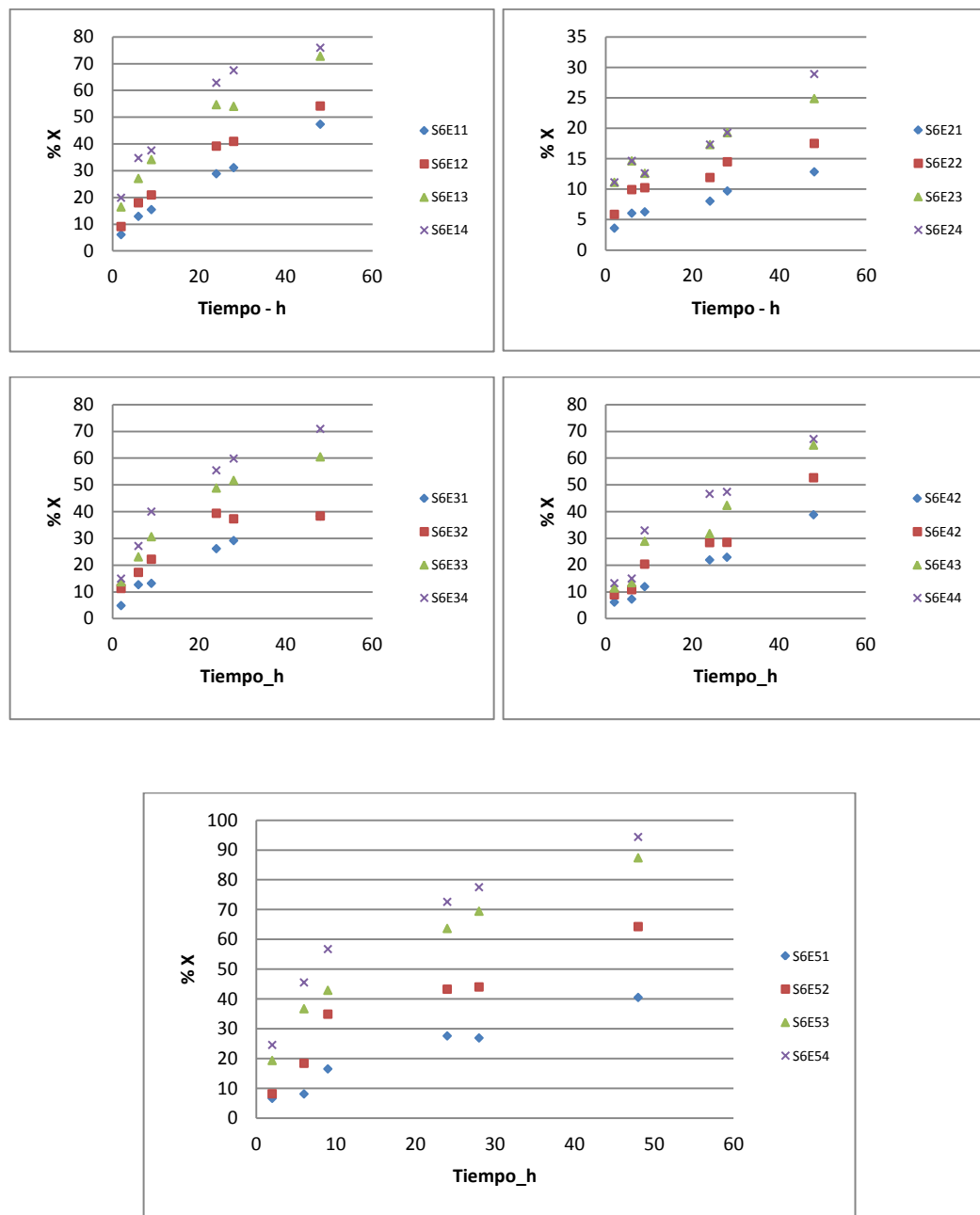
Gráfica 42. Curvas de progreso para el sustrato S3 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5; relaciones E/S (ml/g sustrato) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3



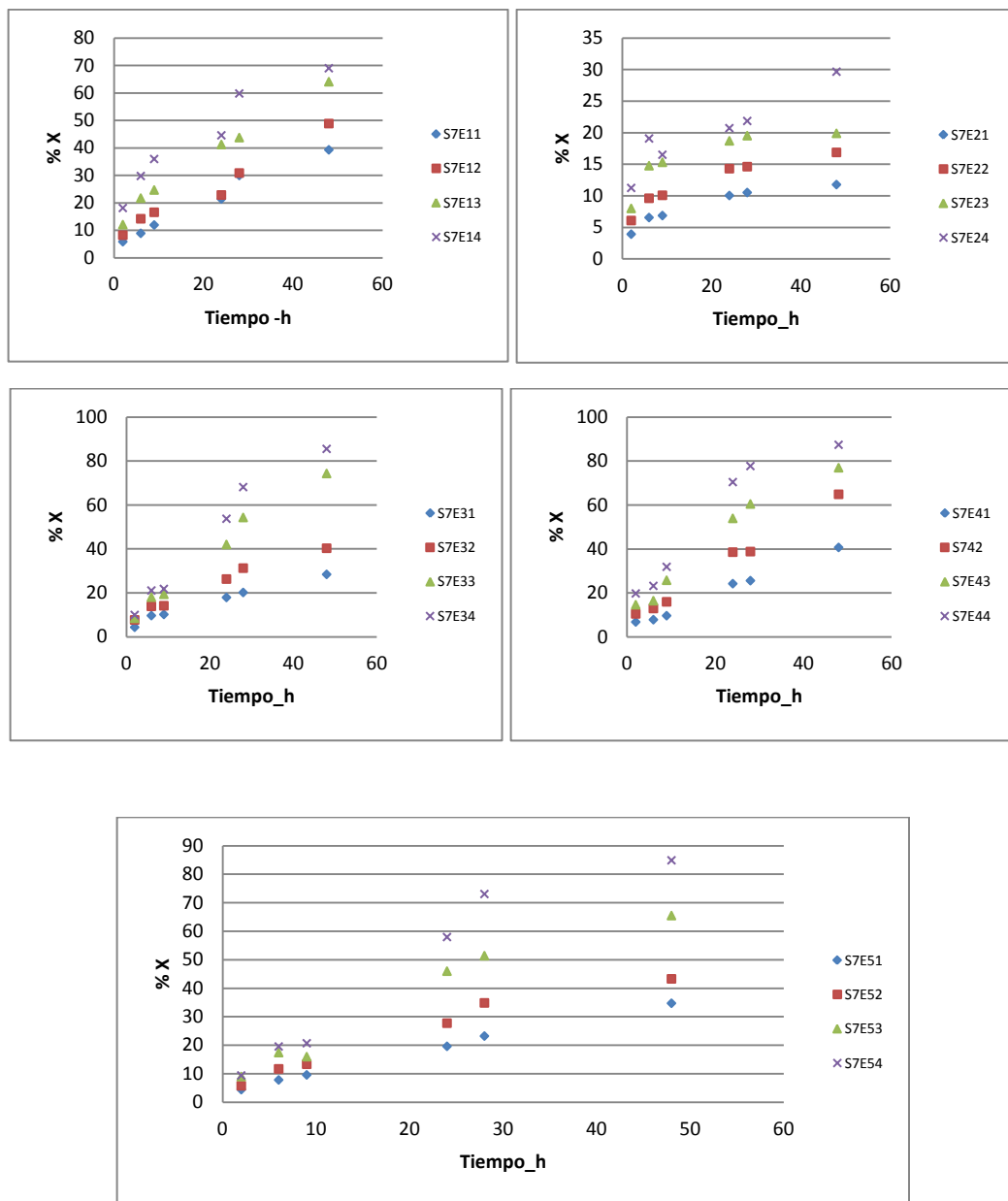
Gráfica 43. Curvas de progreso para el sustrato S4 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5; relaciones E/S (ml/g sustrato) de 0.05, 0.1, 0.2, 0,3.



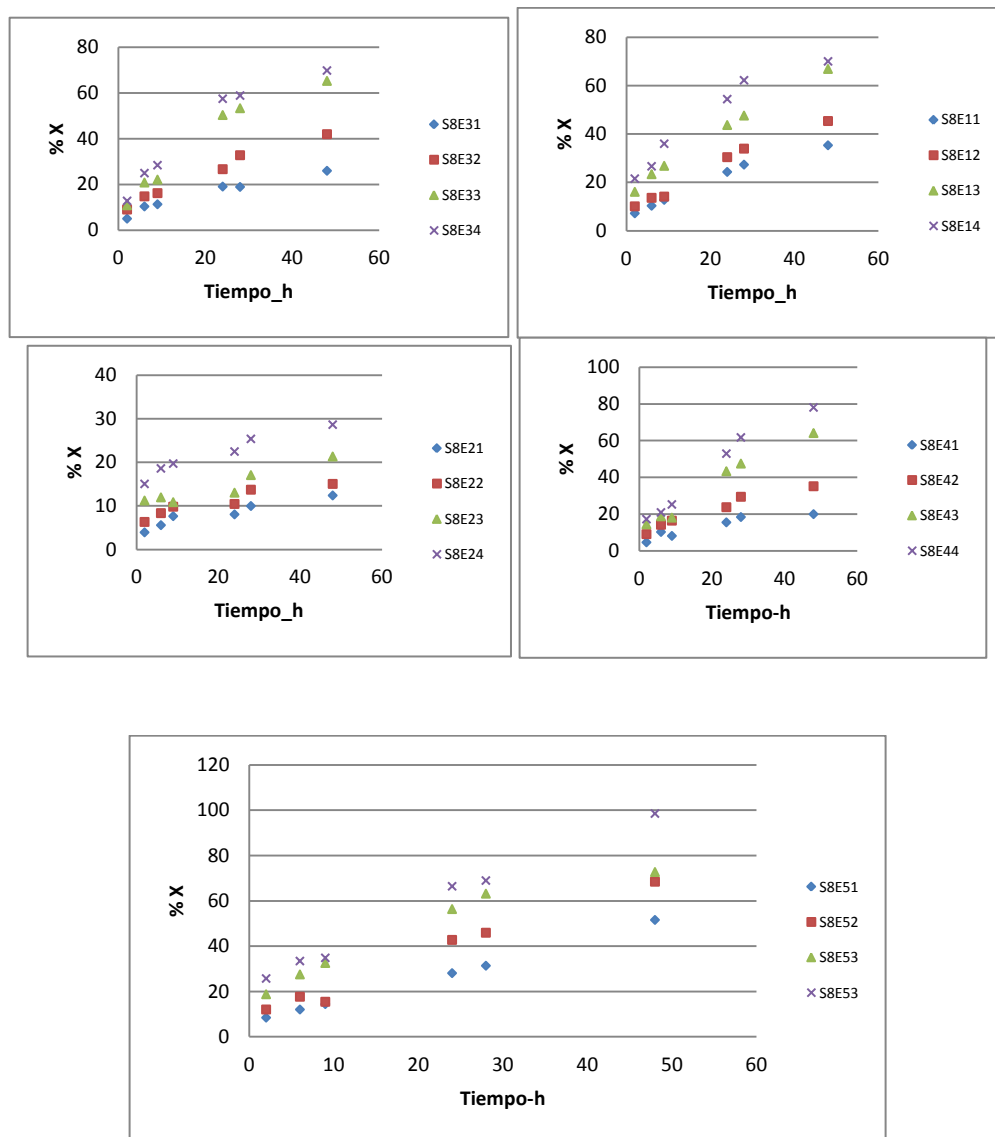
Gráfica 44. Curvas de progreso para el sustrato S5 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5; relaciones E/S (ml/g sustrato) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3.



Gráfica 45. Curvas de progreso para el sustrato S6 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5; relaciones E/S (ml/g sustrato) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3.



Gráfica 46. Curvas de progreso para el sustrato S7 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5; relaciones E/S (ml/g sustrato) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3.



Gráfica 47. Curvas de progreso para el sustrato S8 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5, relaciones E/S (ml/g sustrato) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3.

Apéndice 1. Análisis difusional.

Para obtener alta concentración de etanol después de la fermentación de materiales lignocelulósicos, es necesario incrementar el contenido de sólidos insolubles en la solución que se necesita hidrolizar, produciendo una disminución de los rendimientos (Kristensen *et al*, 2009), debido a que la alta concentración de sólidos solubles produce un aumento de la viscosidad (Fan *et al*, 2003; Mohagheghi *et al*, 1992), generando problemas difusionales de la enzima hacia el sustrato sólido y un aumento de la demanda de consumo de energía para un eficiente mezclado.

La reducción de la conversión con el incremento de la concentración de sólidos insolubles en la hidrólisis enzimática de lignocelulosa, tiene un efecto intrínseco, que describe una correlación lineal desde el 5 al 30% del contenido inicial de sólidos, un insuficiente mezclado ha mostrado no estar involucrado en este efecto (Kristensen *et al*, 2009). Cuando se incrementa la carga de sólidos, se incrementa la concentración de azúcares y por consiguiente la concentración de etanol, generando un costo significativo sobre los costos de proceso, en particular la destilación (Wingrem *et al*, 2003; Zacchi y Axelsonsn, 1989). Igualmente, cuando se aumenta la concentración de sólidos se producen algunas desventajas, la concentración de productos finales e inhibición aumentan, causando que las enzimas y los microorganismos de fermentación no funcionen bien. También, puede causar insuficiente mezclado, produciendo demasiado consumo de energía, ya que la viscosidad del lodo (solución) se incrementa abruptamente para concentraciones de sólidos por encima del 20% (Fan *et al*, 2003; Mohagheghi *et al*, 1992).

Algunos investigadores han sugerido que el mecanismo del fenómeno de sólidos insolubles sobre la velocidad de hidrólisis, va mas lejos de la inhibición por producto (Mohagheghi *et al*, 1992; Hodge *et al*, 2008; Cara *et al*, 2007) o inhibición por otros compuestos tales como inhibidores derivados de los azucares como furfural e hidrometilfurfural (Panagiotou and Olsson, 2007) y lignina (Pan X, 2008). Otros han propuesto que puede ser explicado por limitaciones en la transferencia de masa u otro efecto relacionado con los sólidos insolubles tales como adsorción no productiva de enzima (Rosgaard *et al*, 2007; Sorensen *et al*, 2006).

Tambien, es clave la agitación. Por ejemplo, se encontró una marcada diferencia en la hidrólisis del abeto pretratado con vapor, se presenta cuando se aumenta la velocidad de agitación de 25 a 500 rpm. La conversión se duplicó depues de 48 horas de reaccion y se mantuvo hasta las 90 horas de hidrólisis, usando un reactor de tanque agitado (Palmqvist *et al*, 2011).

Todos estos argumentos, condujeron a generar un análisis de la incidencia de la agitación sobre la hidrólisis de materiales lignocelulósicos pretratados, que sirva

como base para determinar que el modelo cinético obtenido en este estudio, no estuvo afectado por efectos difusionales debido a la transferencia de masa.

Para lograra esto, se implementó el cálculo del coeficiente de transferencia de masa, a través de un balance de masa, basado en la difusión de la enzima en la fase líquida y la velocidad de consumo de sustrato por reacción química en la superficie del material lignocelulósico, comparándolo con el coeficiente de transferencia de masa evaluado a partir de las propiedades físicas y dinámicas de la solución reactante basado en el modelo de Frossling (Frossling, 1938).

Evaluación del coeficiente de transferencia de masa (k_y) basado en la velocidad de reacción. Para el cálculo del coeficiente de difusión, se tuvo en cuenta el balance de materia, entre la velocidad de consumo de sustrato en la superficie del material lignocelulósico y la velocidad de difusión de la enzima en la fase líquida. Este balance se representa por la Ecuación 60.

$$r_s V_r = k_y * A_{Tp} [C_{Eo} - C_{Es}] \quad (60)$$

$$k_y = \frac{r_s V_r}{(C_{Eo} - C_{Es}) A_{Tp}} \frac{1}{1}$$

Donde

r_s = Velocidad de reacción obtenida del modelo IC o Michaelis Menten, evaluada en la superficie del material lignocelulosico, g/Lh

A_{Tp} = área total de partículas, m^2

k_y = coeficiente de transferencia de masa, m/h

C_{Eo} = concentración de enzima en los lodos, (g/m^3)

C_{Es} = concentración de la enzima en la superficie del material

V_r = Volumen del reactor, m^3

En el desarrollo de esta simulación se asumió una concentración de sustrato en la solución por encima 100 g/L, que garanticen una alta producción de azúcares reductores y diferentes concentraciones de enzima en los lodos. Así mismo, se asumió una disminución de la concentración de la enzima desde los lodos hasta en la superficie de los sustratos de 40, 29.92, 20 y 14.88 g/L. tal que, este rango de valores permitiera vislumbrar los problemas difisionales. En la ilustración 3, se presenta un bosquejo general del fenómeno difusional.

$C_{Es} = 40 \text{ g/L}$

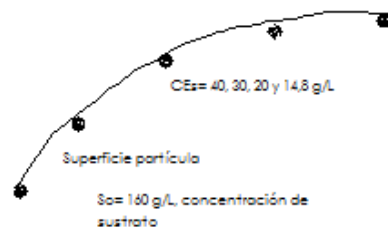


Ilustración 3. Representación del fenómeno de difusión de enzima hacia el sustrato celulósico

Las consideraciones tenidas en cuenta para obtener el valor de k_y en este modelo matemático fueron las siguientes:

- En la superficie sólida del material lignocelulósico ocurre la reacción enzimática. En este caso específico, la enzima es la que se difunde en la fase acuosa, generando que la resistencia a la transferencia de masa ocurra en esta fase.
- El diámetro de la partícula del material tomado para el estudio estuvo alrededor de una malla 30, que equivale a 0.6 mm. Se tuvo en cuenta que para partículas muy pequeñas después del pretratamiento, al someterlo a secado se aglomera. Este material aglomerado es el que inicialmente se alimenta al reactor. Posteriormente, cuando el material es sometido a esfuerzos cortantes por la agitación se redispersa. Empieza un proceso de adsorción de agua, fenómeno que tiene incidencia sobre la viscosidad de la solución. Estudios han mostrado que las propiedades reológicas de los lodos de materiales lignocelulósicos, dependen de la composición química y sus características físicas, tales como, tamaño de la partícula, porosidad y polímeros hidrofílicos dentro de la pared celular (xilanos o pectinas). Los altos tamaños de poros, facilitan el secuestro de agua por parte de la fase sólida, disminuyendo la disponibilidad de agua libre, que incide sobre la conversión final (Viamajala *et al*, 2009). En este estudio se usaron diferentes tamaños de diámetro de la partícula.

- Se admite, que la velocidad con que desaparece la celulosa en la superficie del sustrato es igual a la velocidad que desaparece la enzima en la superficie para formar el complejo enzima- sustrato.
- En la simulación para la determinación de k_y , se utilizó la enzima E5, sustrato S6 y el modelo de inhibición competitiva. La hidrólisis se lleva a cabo a pH 4.2 y temperatura de 50 °C.

Evaluación del coeficiente de transferencia de masa k_y a partir del modelo Frossling (1938). Para la evaluación del coeficiente de difusividad, se tuvo en cuenta la difusión de la enzima en la fase líquida. Se utilizó la relación de Frossling, descrita por la Ecuación 60. Además, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios.

- Para el cálculo del número de Reynolds, se proponen velocidades de agitación entre 50 y 250 rpm.
- La viscosidad de la solución (sólidos insolubles), se determinó tomando como base el perfil de viscosidad en la hidrólisis de un material lignocelulósico (*Eucaliptus globulus*). La información fue suministrada por la facultad de Bioingeniería de Universidad Católica de Valparaíso (Chile).
- La densidad de la solución en el reactor se definió por la Ecuación 61 (Weast, 1985).
- No se reportan datos para la cuantificación de la difusividad de enzimas en soluciones con sólidos no solubles en hidrólisis de materiales lignocelulósicos, para esta simulación se asumió el modelo de difusividad modificado de Stokes –Einstein, el cual es válido para volúmenes molares por encima de 500 cm³/g-mol.
- El peso molecular de celulasas oscila entre 30.000 Da y 300.000 (Ramos y Gutierrez, 1999; Romela, 2007; Bagga *et al*, 1990; Bioinformatics Resource Portal, 2010). Para este caso se tomó la información arrojada por la base de datos Expasy (SIB Bioinformatics Resource Portal), para celulasas de 98000 g/gmol.

$$S_h = 2 + 0.6R_e^{0.5}S_c^{1/3} \quad (60)$$

$$\rho = 0,377(C_g + C_{cb} + C_x) + \rho_w \quad (61)$$

Donde

$$S_h = \frac{k_y d_p}{D_e} \quad \text{Número de Sherwood}$$

$$D_e = \frac{1,05 \times 10^{-9} T}{\mu V_A^{1/3}} \quad \text{Ecuación modificada de Stokes-Einstein, para } V_A > 500 \text{ cm}^3/\text{mol}$$

$$V_A = \frac{\delta_{enz}}{PM}$$

μ = viscosidad cp

δ_{enz} = Densidad de la enzima

PM= peso molecular de la enzima (98000 g/gmol)

d_p = diámetro de la partícula (mm)

D_e = difusividad m^2/s

T= temperatura K^0

V_A = Volumen molar del soluto (enzima), $\text{cm}^3/\text{g-mol}$

C_g = concentración de glucosa, g/l

C_{cb} = concentración de celobiosa, g/L

C_x = concentración de xilosa, g/L

ρ_w = densidad del agua, 998 g/L

$$S_c = \frac{\gamma}{D_e} \quad \text{Número de Schmidt}$$

γ = Viscosidad cinemática, m^2/h

$$R_e = \frac{N D_a \delta}{\mu} \quad \text{Número de Reynolds}$$

N = revoluciones por hora, 1/h

D_a = diámetro del agitador

δ = Densidad de la mezcla reaccionante, g/m^3

La viscosidad es una variable importante en la simulación, para la evaluación del coeficiente de transferencia de masa y esta cambia durante el progreso de la

hidrólisis. Por lo que fue necesario determinar su comportamiento, utilizando material lignocelulósico (*Eucalyptus globulus*). La hidrólisis se realizó en un reactor de 2 litros con un mezclador helicoidal y agitadores segment blade, similar al propuesto por Zhang *et al*, 2010 con una agitación entre 160 y 260 rpm (ver ilustración 4) a 50 °C y pH de 4.5.

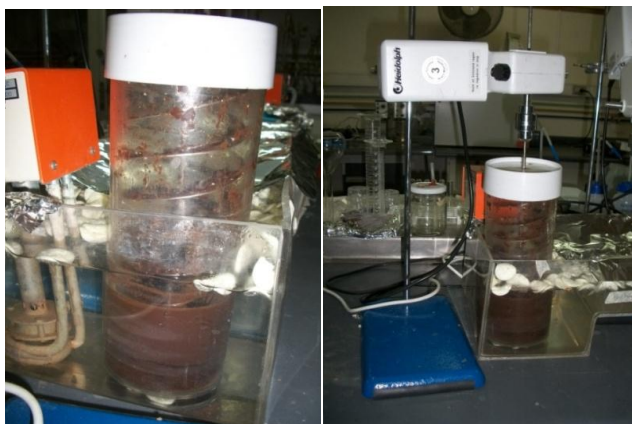
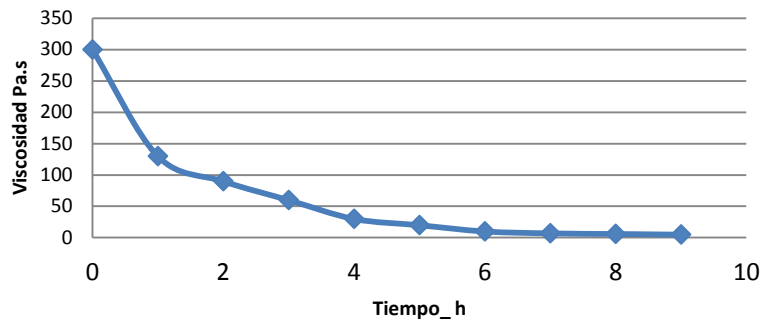


Ilustración 4. Reactor de mezclador helicoidal

El material lignocelulósico (*Eucalyptus globulus*) pretatado por el proceso organosolvente, tuvo un contenido de glucano del 71.3%, lignina de 21.47%, xilanos 4.57% y una humedad de 168 % b.s y una relación solido/líquido del 23% p/p. La enzima (NS 50010) usada fue proporcionada por Novozyme® con las siguientes características 18.8 FPU/ml, 1782 CMC/ml, 422,9 p NPG/ml (La información para este estudio fue suministrados por la facultad de Bioingeniería de Universidad Católica de Valparaíso, Chile. Los resultados promedios de la viscosidad de la solución hidrolizada se muestran en la Gráfica 52.



Gráfica 48. Perfil de viscosidades de material lignocelulósico con una concentración del 23% de sólidos insolubles para diferentes tiempos de hidrólisis con una relación E/S de 0.2 g de enzima/ g de sustrato.

El modelo matemático que representa los datos experimentales de la Gráfica 66, se expresa por la Ecuación (62).

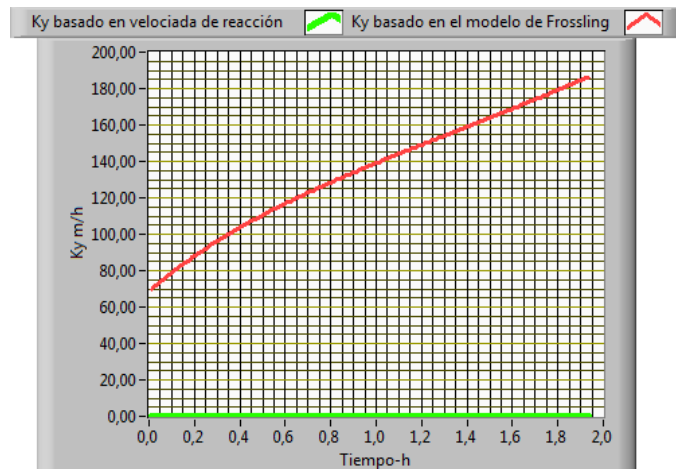
$$\mu = 36 * \frac{1}{[9.61566*10^{-6}+4.39584*10^{-7}t^{2.5}-6.2831*10^{-6} \exp(-t)]} \quad (62)$$

$$r^2=0.99$$

t = tiempo, horas

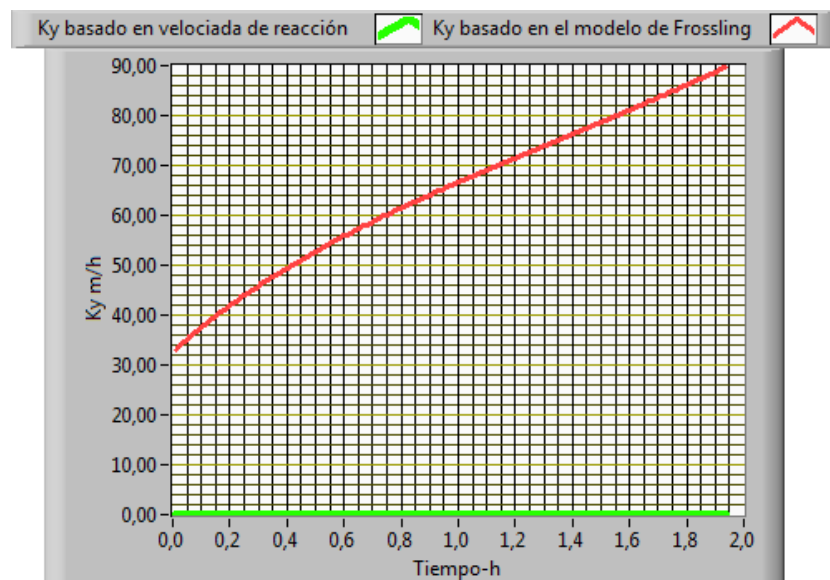
μ = Viscosidad g/m h

El software Labview 9, se utilizó para realizar la simulación del cálculo de los coeficientes de transferencia de masa basado en la reacción de hidrólisis o por el modelo de Frossling. La Gráfica 53, presenta los coeficientes de transferencia de masa para una velocidad de agitación de 250 rpm, un tamaño de partícula de 0.6 mm que es igual al que se trabajó en esta investigación, una concentración de enzima en los lodos de 120,4 g/L, una concentración de enzima en la superficie de las partículas de 16 g/L y la concentración de los lodos de 195 g/L. Estos resultados muestran, que el coeficiente de transferencia de masa obtenido por el equilibrio de la reacción de hidrólisis con la velocidad de transferencia de masa por difusión es pequeño comparado con el valor obtenido por el método de Frossling, esto es un indicador que la velocidad de reacción de hidrólisis es la que controla la velocidad global de reacción.



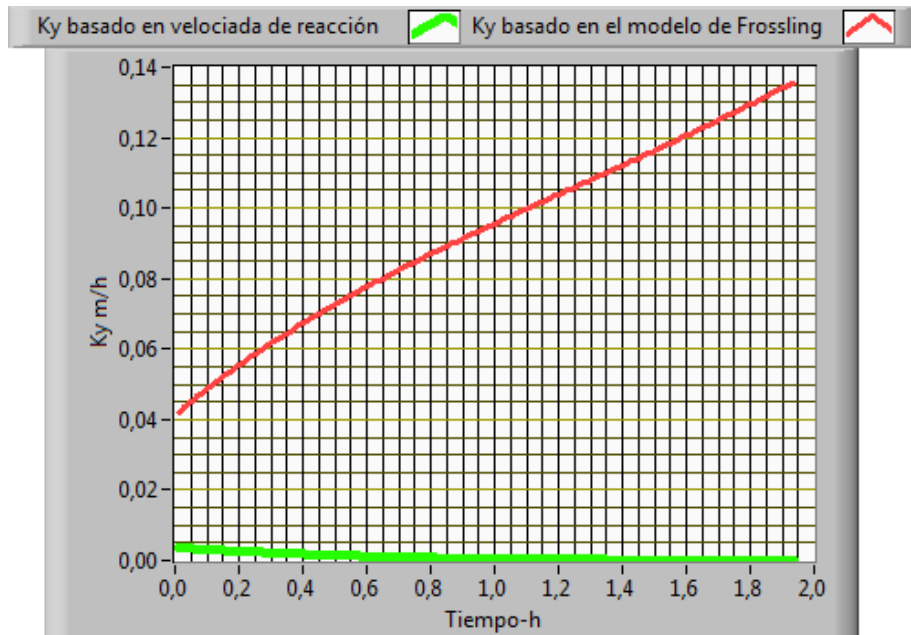
Gráfica 49. Perfil de coeficientes de transferencia de masa para las condiciones de operación: concentración de sustrato de 195 g/L, C_{ES} de 16 g/L, C_{EO} de 120.7 g/L, velocidad de agitación 250 rpm y un diámetro de partícula de 0.6 mm.

La Gráfica 54, presenta el comportamiento de los perfiles de coeficientes de transferencia de masa para las condiciones anteriores, exceptuando la velocidad de agitación, la cual se disminuye a 50 rpm. El resultado muestra que los coeficientes de masa por el método de Frossling, siguen siendo superiores a los calculados por el equilibrio entre la reacción de hidrólisis y la difusión de la enzima.



Gráfica 50. Perfil de coeficientes de transferencia de masa para las condiciones de operación: concentración de sustrato de 195 g/L, C_{ES} de 16 g/L, C_{EO} de 120.7 g/L, velocidad de agitación 50 rpm y un diámetro de partícula de 0.6 mm.

Continuando con los datos arrojados por la simulación, la Gráfica 55 presenta un caso extremo, donde el tamaño de la partícula se aumenta a 50 mm, no se permite la agitación y la concentración de enzima en los lodos se aumenta a 277.7 g/L. En este caso se aprecia un acercamiento en los valores de los dos coeficientes de transferencia de masa.



Gráfica 51. Perfil de coeficientes de transferencia de masa para las condiciones de operación: concentración de sustrato de 195 g/L, C_{ES} de 16 g/L, C_{EO} de 277.7 g/L, velocidad de agitación 0 rpm y un diámetro de partícula de 50 mm.

Los resultados arrojados por la simulación realizada en Labview® concluyen que bajo las suposiciones y condiciones en que se realizaron las corridas experimentales (250 rpm, concentraciones de enzimas de 220 g/L, diámetro de partícula 0.6 mm) no se producen resistencia a la transferencia de masa.

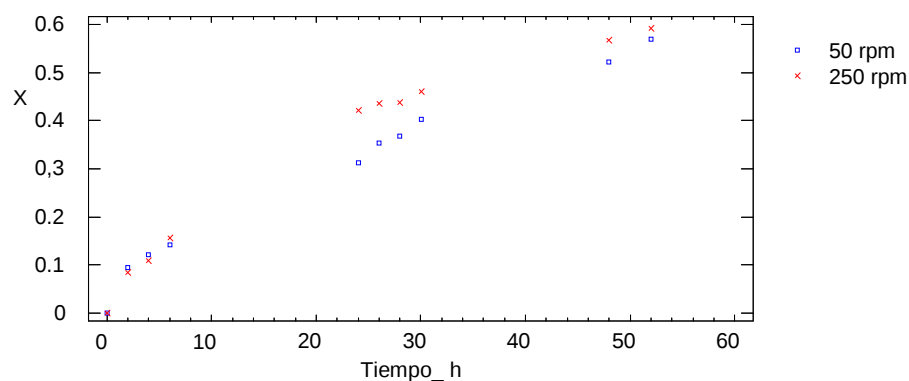
En este estudio se determinó el coeficiente de transferencia de masa de una enzima celulolítica a través de un lodo compuesto por residuos lignocelulósicos en una reacción de hidrólisis para producir azúcares fermentables. Se evaluó el coeficiente de transferencia de masa (K_y) por dos rutas. La primera consistió en el cálculo de k_y utilizando el concepto “en equilibrio la velocidad con que se difunde la enzima al sustrato sólido es igual a la velocidad con que la enzima reacciona en la superficie del sólido “. La segunda se basa en el cálculo de K_y utilizando el modelo de Frossling el cual se basa en propiedades físicas del material que difunde y de la solución. El resultado reveló, que la transferencia de masa externa

(en el seno del fluido) no es la controlante de la velocidad de hidrólisis, si no la reacción misma, siempre y cuando no se produzca un aumento muy grande del aglomerado de sustrato lignocelulósico. Por lo tanto, se debe pensar que para tiempos iniciales de reacción se tenga un buen sistema de mezclado, antes que una buena agitación.

El software bajo Labview[®] de National instruments, para la determinación de los coeficientes de transferencia de masa se adjunta a este trabajo de investigación para que el lector pueda simular las condiciones diferentes a las mostradas en este estudio (ver Apendice 4).

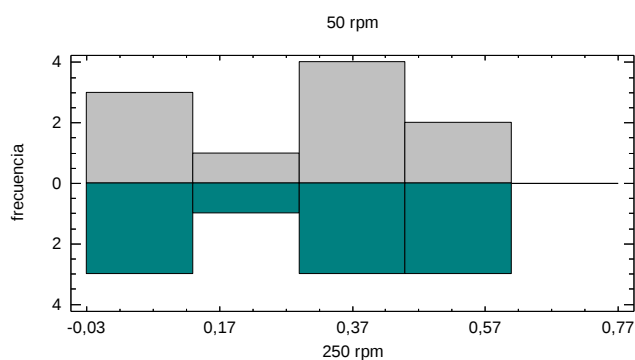
Para hacer un acercamiento experimental de la incidencia de la agitación sobre la velocidad de hidrólisis de materiales lignocelulósicos, se utilizó el reactor helicoidal y agitador (segment blade) como el mostrado en la ilustración 3, un sustrato obtenido por pretratamiento organosolvente del Eucalipto (*Eucalyptus globulus*), con una concentración 10% en base seca de material lignoceluloso, el cual tiene un contenido de glucanos del 71.3%, 21.47% de lignina, 4.57% de xilanos, y una humedad de 168 % b.s. Además, la reacción se llevo a cabo a una una relación sólido/líquido del 23% p/p, un pH de 4,5 y una temperatura de 50 °C. La enzima usada fue la NS 50010, suministrada por Novozyme[®] en una relación enzima /sustrato de 0.2 g de enzima/ g de sustrato, tal que, que produjera 5.5 FPU/ g de sustrato. El reactor usado tenía una capacidad de 2 litros, del cual solo se uso ¼ de su volumen. El sistema de mezclado de este reactor giraba a la misma velocidad del agitador, por lo que inicialmente producía una segregación de material por encima del nivel del líquido, que generaba problemas de mezclado y homogeneidad, generando que una parte del se quedara en la parte superior del reactor.

Se usaron dos condiciones de agitación 50 y 250 rpm. Los perfiles de conversión en el tiempo se muestran en la Gráfica 56. Durante el inicio de la reacción se logró percibir una zona muerta en el fondo del reactor, hecho que conduce a generar algunos cambios en el sistema de agitación mezclado.



Gráfica 52. Perfil de conversión en el tiempo del material lignocelulósico obtenido a partir *Eucaliptus globulus* para dos velocidades de agitación 50 y 250 rpm.

La distribución de frecuencia de la conversión con respecto al tiempo (Gráfica 57), muestra en el rango de conversiones 0.27 a 0.47 que corresponden a tiempos entre 20 y 30 horas, la mayor diferencia entre las conversiones de las dos muestras experimentales, esto es posible a la segregación que se produce debido al diseño del equipo de reacción.



Gráfica 53. Distribución de frecuencia de la conversión con respecto al tiempo para la hidrólisis enzimática de un material *Eucaliptus (Eucalitus globulus)*

Aunque el experimento no fue llevado a condiciones bien controladas, si se puede concluir la poca relevancia de los fenómenos de transferencia de materia externos con respecto a la velocidad de reacción.

Este resultado conduce que la construcción de un sistema de agitación – mezclado para la hidrólisis de material lignocelulósico, debe tener en cuenta los siguientes criterios.

- Tener dos sistemas de agitación, uno para mezclado y otro de agitación propiamente dicha, hecho que coincide con lo planteado por Zhang et al, 2009. Donde , indica que el uso del agitador helicoidal bajo condiciones de altas viscosidades produce una alta circulación vertical dentro del reactor entre el final del agitador y la pared del reactor (Acción de mezclado) y los agitadores segment blades o Rushton actúan en mezclado y agitación.
- El sistema de mezclado puede ser helicoidal, en el fondo debe tener un agitador de paletas que remueva en las fases iniciales de la reacción los sedimentos del fondo del reactor.
- Tener sistema de agitación tipo turbina que permita mantener un perfil de flujo ascendente, descendente (incluir baffles).
- El mezclador helicoidal debe girar a una velocidad menor que la del agitador de turbina, y solamente será utilizado en las primeras horas de reacción, donde el mezclado de la masa de sólidos es fundamental.
- El agitador de turbina seguirá trabajando durante toda la reacción.
- La altura del mezclador helicoidal debe estar por debajo del nivel del líquido.

Apéndice 2. Selección de la relación enzima- sustrato (E/S) para el sustrato S6 y enzima E5

Hay dos etapas importantes involucradas en la conversión de biomasa a alcohol, la hidrólisis de la celulosa para producir azúcares reductores y la fermentación de azúcares a alcohol. Los costos de producción de alcohol a partir de material lignocelulósico son relativamente altos y se centran en sus bajos rendimientos y altos costos del proceso de hidrólisis.

Considerables esfuerzos se han hecho para mejorar la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos, entre los que se encuentran el pretratamiento de materiales lignocelulósicos para remover lignina que faciliten significativamente la hidrólisis de la celulosa, la optimización de las enzimas basadas en mezclas de actividades enzimáticas y la carga de enzima [Sun and Cheen, 2002]. Encontrar la mezcla de actividades enzimáticas que produzca una enzima capaz de convertir los componentes de los materiales lignocelulósicos en azúcares fermentable, a una relación enzima/sustrato adecuada que permita un proceso de hidrólisis económicamente viable, es un reto para la industria productora de biocombustibles a partir de biomasa. Los costos de obtención de celulasas y hemicelulasas por fermentación en estado sólido de acuerdo a evaluaciones del NREL (National Renewable Energy Laboratory) producidos en cultivo sumergido en situ es de 0.38/ 100000 U\$/ FPU, solamente los costos de las celulasas pueden alcanzar el 20% de los costos de producción de etanol. De otra forma, costos de enzimas comerciales alrededor de US\$ 16/100000 FPU es prohibitivo para este proceso (Sánchez y Cardona, 2008). En este Apéndice, se presentan algunos criterios que permitan ayudar a seleccionar la relación enzima/ sustrato en la hidrólisis de materiales lignocelulósicos de residuos de cosecha de la caña de azúcar, utilizando un preparado enzimático obtenido de mezclas de enzimas comerciales, el cual se estaba constituido por 27.53 FPU/ml, 1782 CMC/ml, 550 pNPG U/ml y una actividad global de hemicelulasas 52.75 UI/ml (Enzima E5). La dosis, la calidad de enzima, la estructura, tamaño de partícula y la composición del material lignocelulósico, tienen un papel importante sobre la velocidad de hidrólisis (Temborg *et al*, 2001; Saha *et al*, 2005; Yeh *et al*, 2010). Para la evaluación de los costos involucrados en la hidrólisis, se tuvieron en cuenta variable de producción y operacional como valores de enzimas, materia prima, consumo energético y mano de obra utilizada en una reacción de hidrólisis en un sistema batch. Además, se propuso una función objetivo denominada beneficio como indicativo de la viabilidad económica. Para este estudio, se utilizó el modelo cinético obtenido en este estudio de inhibición competitiva (IC) basado en el sustrato S6 y la enzima E5.

Para la modelación de la hidrólisis del material lignocelulósico, se implementó una simulación en un reactor por cochadas, para lo que fue necesario describir el

modelo que representa un reactor por lotes, que puede ser definida por la Ecuación 63.

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{AZ}{dt} = S_o \frac{dx}{dt} = r_x \quad (63)$$

r_x = velocidad de producción de azúcares (depende de la relación E/S) g/Lh

t = tiempo en horas

Az = Azúcares reductores, g

S= concentración de sustrato, g/L

So= concentración inicial de sustrato, g/L

En la solución de la Ecuación anterior, se plantea como condición inicial, cuando el tiempo tiende a cero, la concentración de azúcares reductores en el reactor es cero. Esta condición se puede escribir de la siguiente forma.

$$Az_{t=0} = 0$$

La integración del sistema de reacción por cochadas se presenta en la Ecuación 64.

$$Az = V \int r_x dt \quad (64)$$

Donde

V= volumen de la reacción, L

La función objetivo “**Diferencia**” es la diferencia entre el valor comercial del jarabe de glucosa en cualquier instante de la reacción, asumiendo éste como el precio comercial de la glucosa que tendría que pagarse si quisiéramos producir alcohol a través de una fermentación, y los costos que llevaría producir el jarabe glucosado a partir de los residuos de la caña de azúcar (Ecuación 65). Si la diferencia entre el valor del jarabe de glucosa en cualquier instante de la reacción y los costos de producción resulta negativa, es un indicador que los costos de producción del producto sobrepasan el costo de producción comercial por lo que a estas condiciones desarrollar la hidrólisis con una relación E/S especificada no es viable.

Diferencia = valor comercial de azúcares producidos – (valor materia prima consumida + valor enzima consumida + valor Consumo energia + Depreciación + costo operacional mano de obra) (65)

Para determinar la cantidad de azúcares que se producen en cualquier instante, se utilizaron los modelos cinéticos obtenidos en esta investigación, para relaciones E/S mayores a 0.75 se tuvo en cuenta el modelo cinético de Michaelis-Menten y el modelo de inhibición competitiva (IC) para relaciones de E/S menor o igual a 0.75.

El cálculo de la cantidad de azúcares producidos en cualquier instante en la reacción de hidrólisis se obtuvo a través de las herramientas para resolver ecuaciones diferenciales ordinarias del software Matlab[®]. Esta solución arroja el perfil de concentraciones de glucosa y de velocidades de reacción para diferentes relaciones E/S. conjuntamente, con el valor de producción comercial de glucosa de 0.9 US\$/kg (States Department of Agriculture, USDA), se generó el valor de producción de glucosa en cualquier instante a partir de residuos de la caña de azúcar, que tendría que pagarse si quisiéramos producir alcohol a través de una fermentación. En la ilustración 5, se presentan algunas consideraciones que se tuvieron en cuenta para la obtención del valor del azúcar.

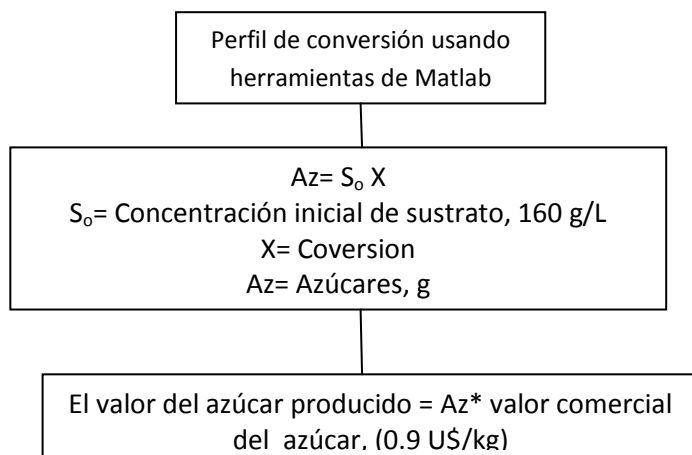


Ilustración 5. Algoritmo para el cálculo del valor del azúcar basado en precio comercial

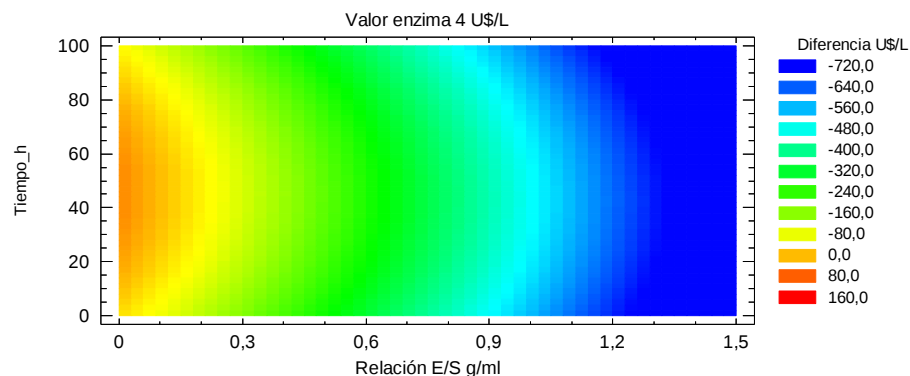
En la determinación del costo operacional de producir jarabes glucosados a partir de residuos de cosecha de caña de azúcar, se tuvo en cuenta diferentes relaciones E/S desde 0.125 hasta 1.5. El valor de la enzima comercial se varió

desde 0.5 US\$/L hasta 4 US\$/L. para la determinación del precio de los residuos de la caña de azúcar se tuvo como referencia el precio de la caña de azúcar, el valor asumido fue de 0.06 dólares/kg, los costos de operacionales de mano de obra se evaluaron en un valor de 0.77 US\$/h, se asumió una depreciación lineal a 15 años. Para la simulación se tomó como base un reactor de 1000 L, con un costo total del equipo de US \$ 10.000, valor que fue suministrado por NOVOA equipment Limited (www.novoa-ltd.com), el cual incluye el costo reactor, instalación, instrumentación, aislación, mantenimiento etc. A continuación se presentan algunas consideraciones que se tuvieron en cuenta para la simulación de la función objetivo.

- Costo Materia prima = $S_o \cdot V \cdot (\text{valor residuos de cosecha})$
- $\text{Costo enzima} = \text{relación} \frac{E}{S} \cdot S_o \cdot V \cdot (\text{valor enzima})$
- Valores de E/S = 1.5, 0.75, 0.375, 0.25, 0.187 y 0.125
- Valor del kw/h = 0.066 dólares
- El sustrato S6, presenta un contenido de celulosa del 82% p/p y hemicelulosa del 7% p/p

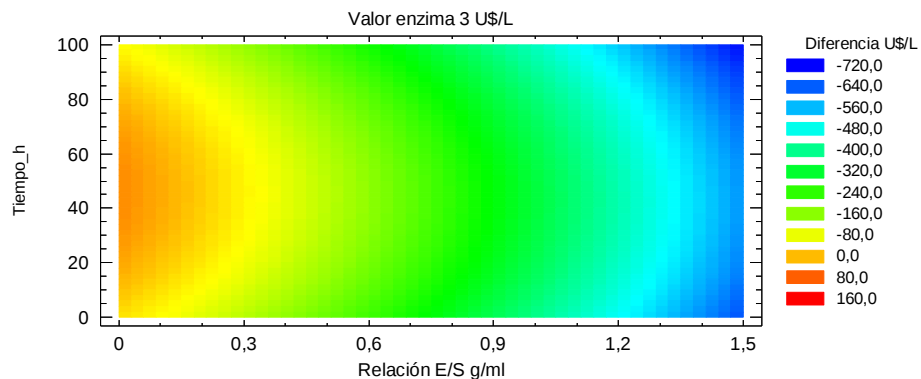
Se implementó un diseño factorial para la simulación, que tuvo como variable dependiente la función objetivo, la cual se denominó “diferencia” y como variables independientes las relaciones E/S, perfil del tiempo de reacción y valor comercial de la enzima.

La Gráfica 58, presenta la evaluación de la función objetivo para costos de enzima de 4 US\$/L, que no es viable económicamente producir la glucosa a través de esta hidrólisis enzimática para ninguna reacción enzima/sustrato.



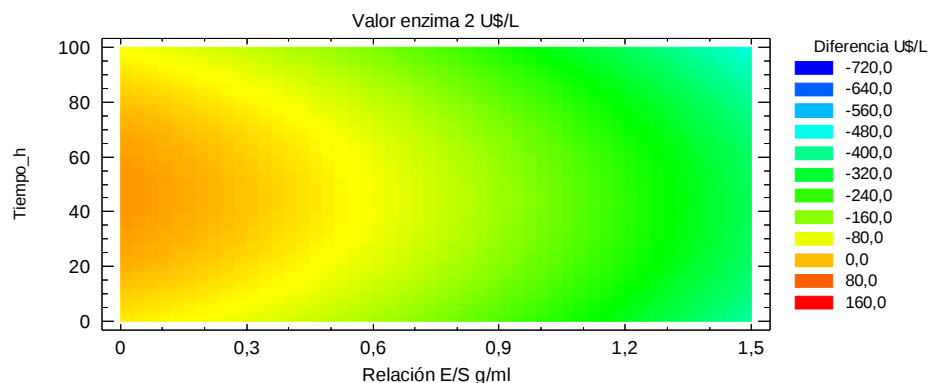
Gráfica 54. Contorno de Superficie de la diferencia entre valor comercial de jarabes de glucosa y costo de producción de jarabes de glucosa a partir de material lignocelulósico, para valores de enzimas de 4 US\$/L

La Gráfica 59, presenta el análisis para un costo de enzima de 3 US\$/L. Se observa que existe la factibilidad de usar relaciones E/S, a valores 0.3. El rango de tiempo de hidrólisis se acorta, ahora es factible a partir de 15 horas hasta 85 horas. Para estas relaciones E/S, para tiempos mayores de 60 horas, la simulación de los modelos de IC presentan conversiones cerca del 92%, no alcanzan a producir los 140 g/L de azúcares fermentables, hecho éste, que no permite conducir un proceso de fermentación alcohólica en condiciones óptimas.



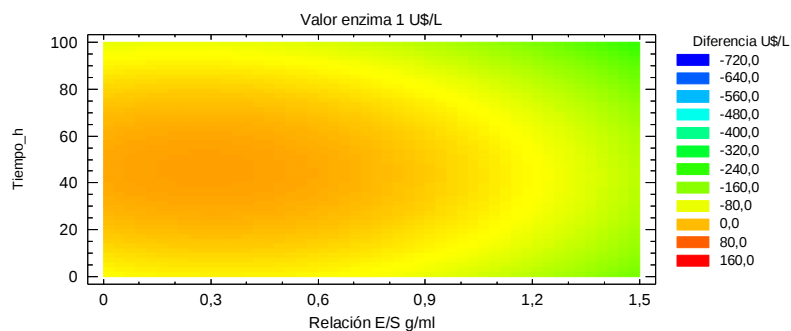
Gráfica 55. Contorno de Superficie de la diferencia entre valor comercial de jarabes de glucosa y costo de producción de jarabes de glucosa a partir de material lignocelulósico, para valores de enzimas de 3 US\$/L

En las Gráficas 60, 61 y 62, se expresan las superficies de contorno para función objetivo “diferencia”, para valores de enzima de 2, 1 y 0.5 US\$/L. Cuando el costo de la enzima es de 2 US\$/L, el rango de la relación E/S que hace factible la hidrólisis alcanza el valor de 0.45. Los tiempos de hidrólisis se reducen por debajo de 8 horas, alcanzando conversiones del 100% y producciones de azúcares reductores sobre 140 g/L, suficiente para producir una fermentación por encima del 8% v/v.



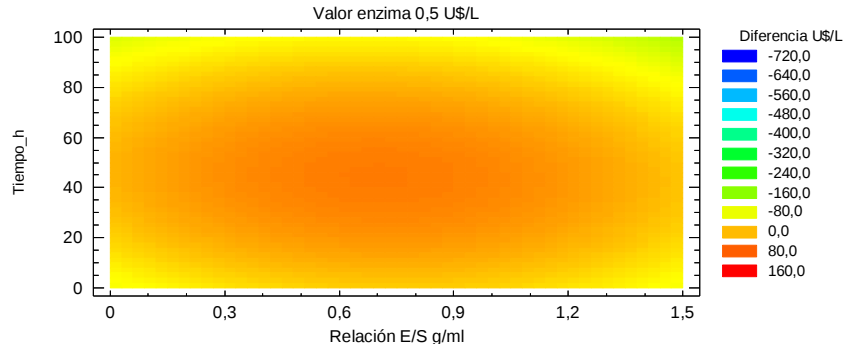
Gráfica 56. Contorno de superficie de la diferencia entre valor comercial de jarabes de glucosa y costo de producción de jarabes glucosa a partir de material lignocelulósico, para valores de enzimas de 2 US\$/L

Cuando el valor de la enzima es de US\$ 1/litro (ver Gráfica 65), se amplía mucho mas el rango de relaciones E/S que se pueden usar, alcanzando valores hasta 0.8, en este caso para relaciones E/S altas los tiempos de hidrólisis para alcanzar conversiones del 100% se reducen a 5 horas.



Gráfica 57. Contorno de Superficie de la diferencia entre valor comercial de jarabes de glucosa y costo de producción de jarabes de glucosa a partir de material lignocelulósico, para valores de enzimas de 1 US\$/L

La Gráfica 66, presenta el contorno de superficie cuando el valor de la enzima es de 0.5 US\$/L, aumenta el área de factibilidad, extendiéndose la relación E/S hasta 1. En este caso se pueden alcanzar conversiones del 100% a tiempos de 4 horas.



Gráfica 58. Contorno de Superficie de la diferencia entre valor comercial de jarabes de glucosa y costo de producción de jarabes de glucosa a partir de material lignocelulósico, para valores de enzimas de 1 US\$/L

Con la información recolectada se puede concluir que:

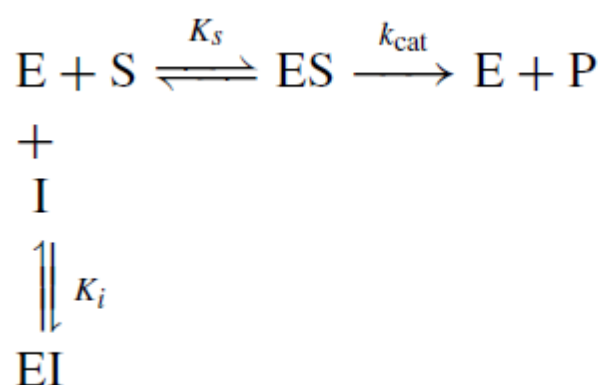
- El costo de la hidrólisis de residuos de la cosecha de caña de azúcar, depende de la relación enzima/sustrato usada en la hidrólisis. La factibilidad de la hidrólisis enzimática obedece en gran parte del costo de las enzimas.
- Cuando se trabajan con diferentes relaciones E/S en la hidrólisis de residuos de la cosecha de caña de azúcar. Los tiempos largos de hidrólisis hacen que variables diferentes a la relación E/S tomen importancia sobre la factibilidad económica de la hidrólisis. Esto se refleja más, cuando es menor el costo de la enzima.
- Para costos de enzima por encima de 1.9 US\$/L, bajo las condiciones de la simulación es difícil que procesos de hidrólisis de materiales lignocelulósicos sean viables, para el caso de la enzima E5, corresponde 6.9 dolares /100000 FPU.

En el Apéndice 4, se hace referencia a un software bajo LABVIEW[®], que simula la relación E/S viable.

Apéndice 3. Análisis del Modelo de inhibición competitiva.

Seleccionado el modelo de inhibición competitiva, como el modelo que representa la hidrólisis de los residuos de la cosecha de caña de azúcar, es necesario establecer un análisis de la simulación de dicho modelo.

En el modelo de inhibición competitiva, el inhibidor compite con el sustrato por el sitio activo de la enzima, el mecanismo propuesto se muestra en el esquema 1, donde existe una aparente disminución de la constante de disociación k_s , sin afectar la velocidad máxima.



Esqema1. Mecanismo de inhibición competitiva

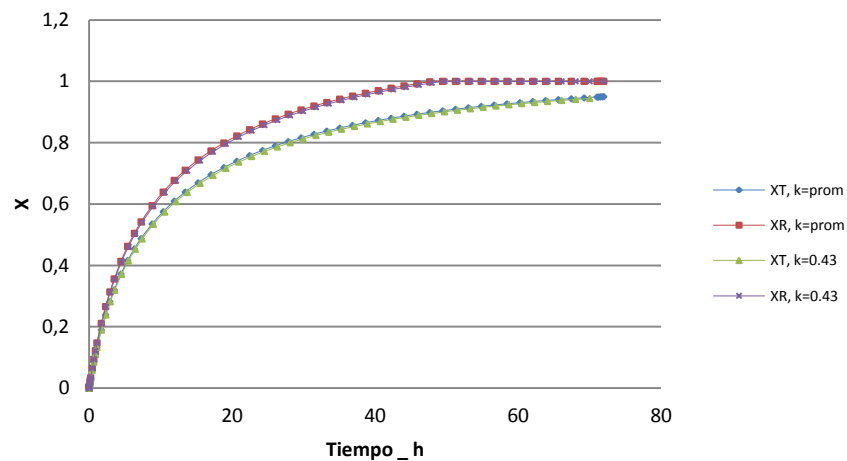
El modelo matemático que describe la inhibición competitiva se presenta por la Ecuación 65.

$$v = \frac{V_m \times S}{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \times k_s + S} \quad (65)$$

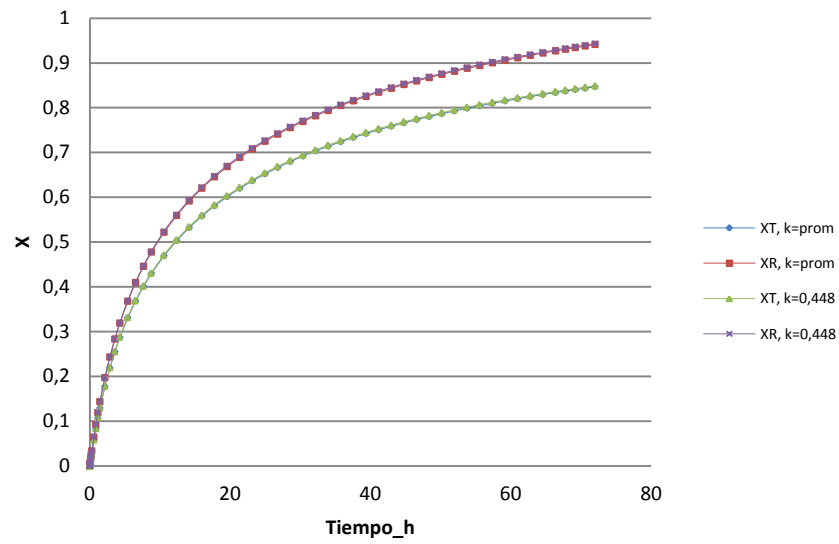
El modelo de inhibición competitiva (IC) obtenido en este estudio, presenta una constante de inhibición entre 0.427 g/L y 0.464 g/L, para un promedio de 0.442 g/L. Teniendo en cuenta, que el contenido total de celulosa y hemicelulosas del sustrato S6, que se utilizó para la determinación de los modelos cinéticos alcanza el 89.97%. La conversión se puede expresar de dos formas, una tomando como

base el material total en la muestra (XT) o con respecto al material que se pueda hidrolizar (XR).

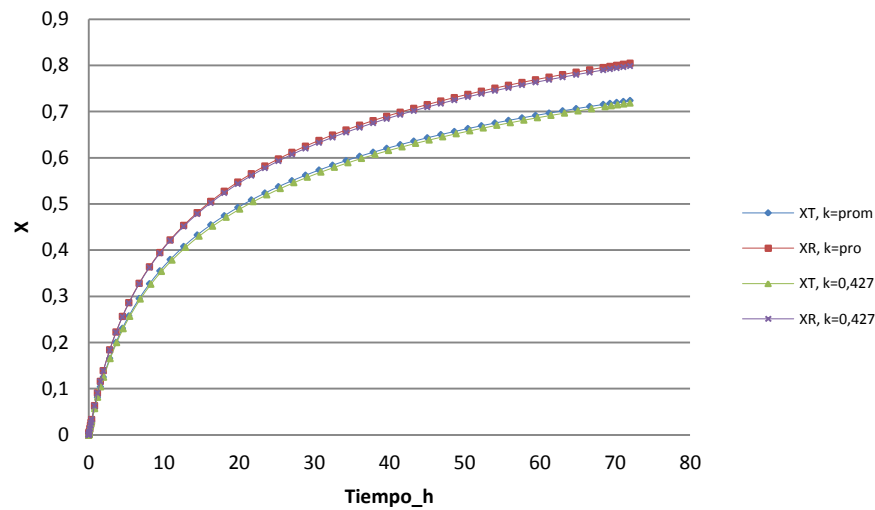
Las Gráficas 63, 64 y 65, presentan las curvas de progreso de la simulación del modelo de inhibición competitiva (IC), para las constantes de inhibición arrojadas por el modelo para las relaciones E/S de 0.375, 0.25, 0.187, 0.125 y el valor de la constante de inhibición promedio (0.442 g/L). En estas Gráficas la conversión total (XT), es la relación de los azúcares reductores producidos durante la hidrólisis y el contenido material lignocelulósico. La conversión (XR), se expresa como la relación entre los azúcares reductores producidos durante la hidrólisis y el material que pueda producir azúcares reductores del total del material lignocelulósico.



Gráfica 59. Curvas de progreso para conversión total (XT) para constantes de inhibición promedio y conversión (XR) para la constante de inhibición del modelo $k = 0.43$ ($E/S=0.375$)



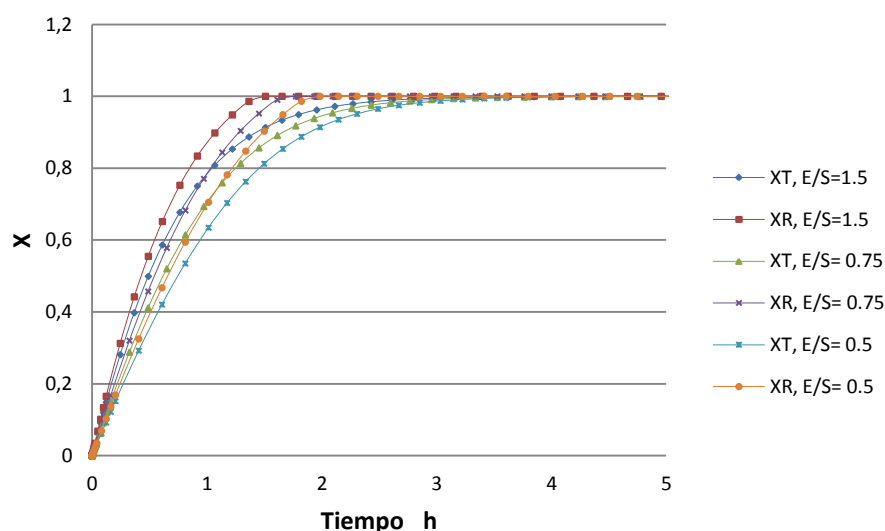
Gráfica 60. Curvas de progreso para conversión total (XT) para constantes de inhibición promedio y conversión (XR) para la constante de inhibición del modelo $k = 0.448$ ($E/S=0.187$)



Gráfica 61. Curvas de progreso para conversión total (XT) para constantes de inhibición promedio y conversión (XR) para la constante de inhibición del modelo $k = 0.427$ ($E/S=0.125$)

Como se puede observar en las Gráficas, para cada relación E/S, es indiferente utilizar la constante de inhibición particular o la constante de inhibición promedio para la evaluación del modelo de inhibición competitiva (IC), ya que sus curvas coinciden. Para relaciones enzima-sustrato mayor que 0.25, es posible alcanzar conversiones (XR) del 100% para tiempos de hidrólisis de 80 horas, teniendo en cuenta la parte del sustrato que es posible hidrolizar.

Para relaciones E/S mayores a 0.5, usando en la simulación el modelo de Michaelis–Menten, se podrían alcanzar conversiones del 100% en tiempos muy cortos, como se muestra en la Gráfica 66.



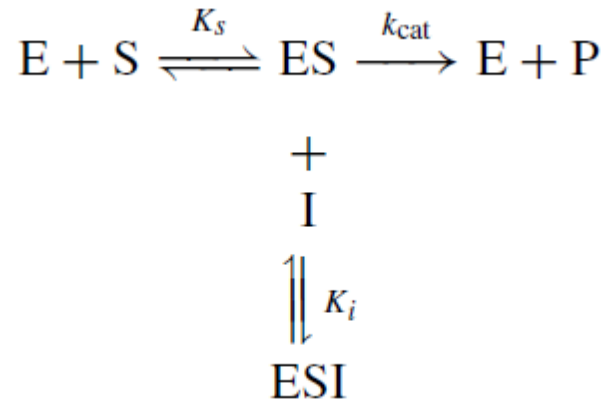
Gráfica 62. Curvas de progreso para el modelo de Michaelis- Menten con relaciones E/S de 1.5 (10 g/L), 0.75 (20 g/L) y 0.5 (30 g/L)

Operar a condiciones altas de relación E/S, reduce los tiempos de hidrólisis, pero aumenta los costos debido al precio actual de las enzimas comerciales. Es importante encontrar condiciones de operación para la hidrólisis enzimática que disminuyan la inhibición por glucosa, una alternativa sería trabajar con sistemas simultáneos de sacarificación – fermentación. Otra alternativa, estaría dirigida a producir enzimas de bajos costos.

Otros modelos tenidos en cuenta durante la investigación son analizados a continuación:

Inhibición incompetitiva. En este tipo de inhibición, el inhibidor se une al complejo ES (enzima- sustrato) y no a la enzima libre un compuesto interactúa con el complejo enzima – sustrato en un lugar diferente al sitio activo. La enzima se

distribuira entre el complejo ES formador de producto y el complejo inhibidor ESI (ver esquem 2)

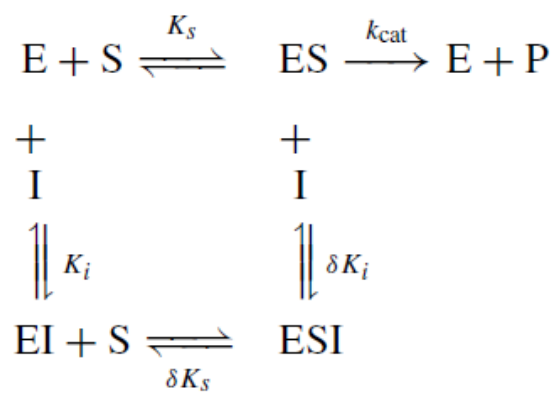


Esquema 2. Mecanismo de inhibición incompetitiva

La Ecuación 66, expresa el modelo matematico que describe la inhibición incompetitiva

$$v = \frac{V_m \times S}{k_s + S \times \left(1 + \frac{I}{k_i}\right)} \quad (66)$$

Inhibición no- competitiva: El inhibidor no competitivo se puede unir a la enzima libre, E, y al complejo enzima-sustrato, ES, para formar EI e ESI. ESI no se puede descomponer para dar el producto y la enzima (esquema 3)



Esquema 3. Mecanismo de inhibición no- competitiva

El modelo cinético se expresa en la Ecuación 67

$$v = \frac{V_m \times S}{k_s \times \left(1 + \frac{I}{k_i}\right) + S \times \left(1 + \frac{i}{k_i}\right)} \quad (67)$$

Apéndice 4. Cálculos computacionales (LABVIEW®)

Se implementó una simulación bajo Labview®, para el cálculo de la función objetivo “diferencia” y el coeficiente de transferencia de materia “ K_y ”. La ilustración 6, muestra el pantallazo de la forma como se presenta el software, en el cual aparecen cuatro ítems (evaluación económica, análisis difisional y costos, reaaccion de hidrólisis y graficas adicionales).

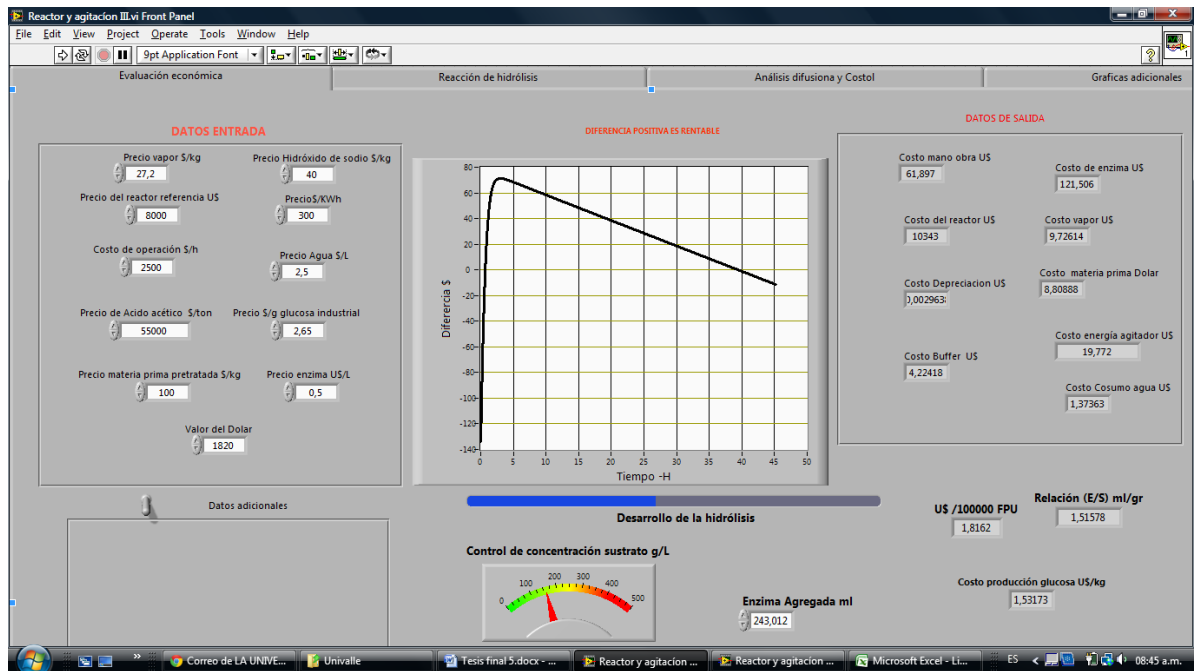


Ilustración 6. Primer pantallazo, el cual indica los datos de alimentación al software y grafica de la función objetivo “diferencia” en función del tiempo

El ítem “evaluación económica”, presenta los valores utilizados en la evaluación del costo de producción de glucosa en un reactor por cochadas. La ilustración 7, muestra un segmento de este ítem, donde se observan los valores por defecto que se usaron en la simulación. Es importante recalcar, que estos datos pueden ser variados por el usuario.

Es primordial aclarar, que los costos de operación comprenden los gastos de mano de obra y dirección. El costo del vapor se determinó con base en información suministrada por Thermal Engineering LTDA ([www. Termal.cl](http://www.Termal.cl))

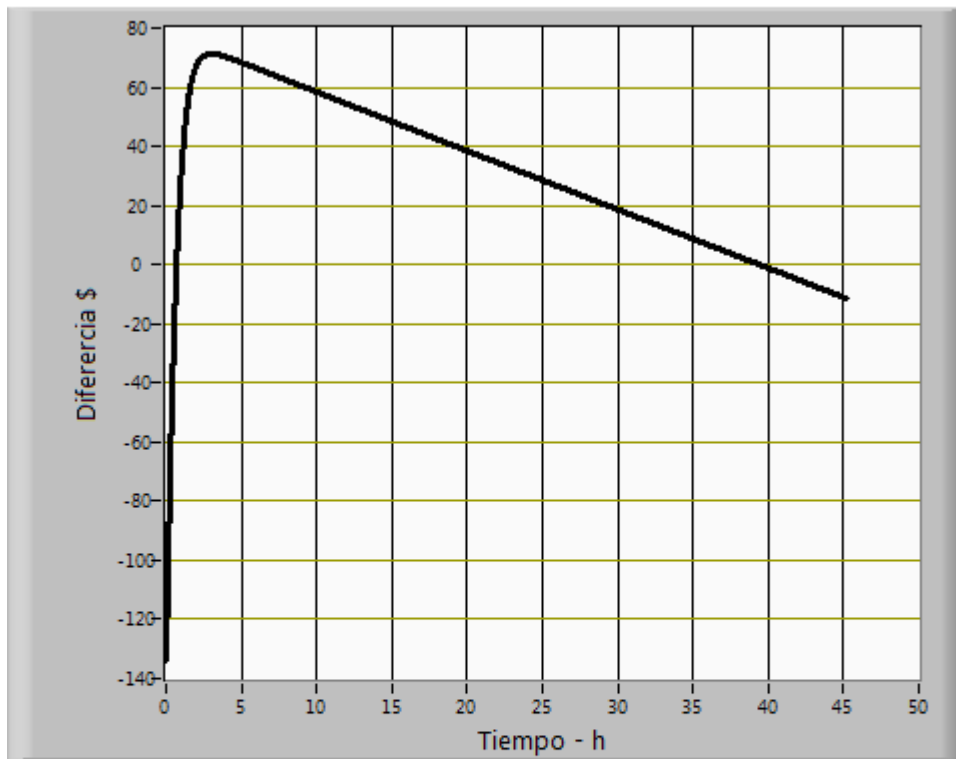
DATOS ENTRADA

Precio vapor \$/kg 27,2	Precio Hidróxido de sodio \$/kg 40
Precio del reactor referencia US 8000	Precio\$/KWh 300
Costo de operación \$/h 2500	Precio Agua \$/L 2,5
Precio de Acido acético \$/ton 55000	Precio \$/g glucosa industrial 2,65
Precio materia prima pretratada \$/kg 100	Precio enzima US/L 0,5
Valor del Dolar 1820	

Ilustración 7. Datos de entrada por defecto introducidos al programa

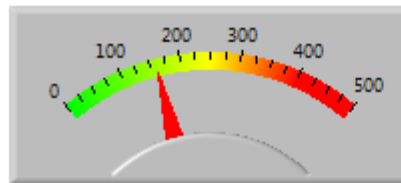
Además, el software ofrece la oportunidad de introducir la relación enzima/sustrato que el usuario desee explorar, a través de los controles de concentración de sustrato y enzima agregada (ver ilustración 8). Igualmente, presenta la Gráfica de la función objetivo “diferencia” con respecto al tiempo, Si esta función objetivo es positiva la relación enzima / sustrato es viable. En la parte inferior de la Gráfica “diferencia” se ubica un control slider que permite controlar el desarrollo de la reacción. Este puede ser ajustado por el usuario para fijar el tiempo de duración de la hidrólisis enzimática

DIFERENCIA POSITIVA ES RENTABLE



Desarrollo de la hidrólisis

Control de concentración sustrato g/L



Enzima Agregada ml

243,012

Ilustración 8. Opción de introducir la cantidad de enzima y sustrato, acompañado del gráfico de función objetivo “diferencia” y el slide para controlar el desarrollo de la reacción de hidrólisis

En este mismo pantallazo, el software muestra el ítem datos de salida, donde se presenta los costos involucrados en el costo de producción de glucosa (ver ilustración 9).

DATOS DE SALIDA

Costo mano obra US	Costo de enzima US
61,897	121,506
Costo del reactor US	Costo vapor US
10343	9,72614
Costo Depreciacion US	Costo materia prima Dolar
3,002963	8,80888
Costo Buffer US	Costo energía agitador US
4,22418	19,772
	Costo Consumo agua US
	1,37363

U\$ /100000 FPU	Relación (E/S) ml/gr
1,8162	1,51578

Costo producción glucosa U\$/kg
1,53173

Ilustración 9. Datos de salida de la simulación, donde se presentan los costos y variables a evaluar

Un segundo pantallazo denominada “reacción de hidrólisis”, muestra los resultados de las curvas de progreso para la producción de glucosa, como también, para el seguimiento de la reacción a través de la conversión. Además, este pantallazo permite introducir datos como: Volumen del reactor, diámetro del agitador y velocidad de agitación (ver ilustración 10)

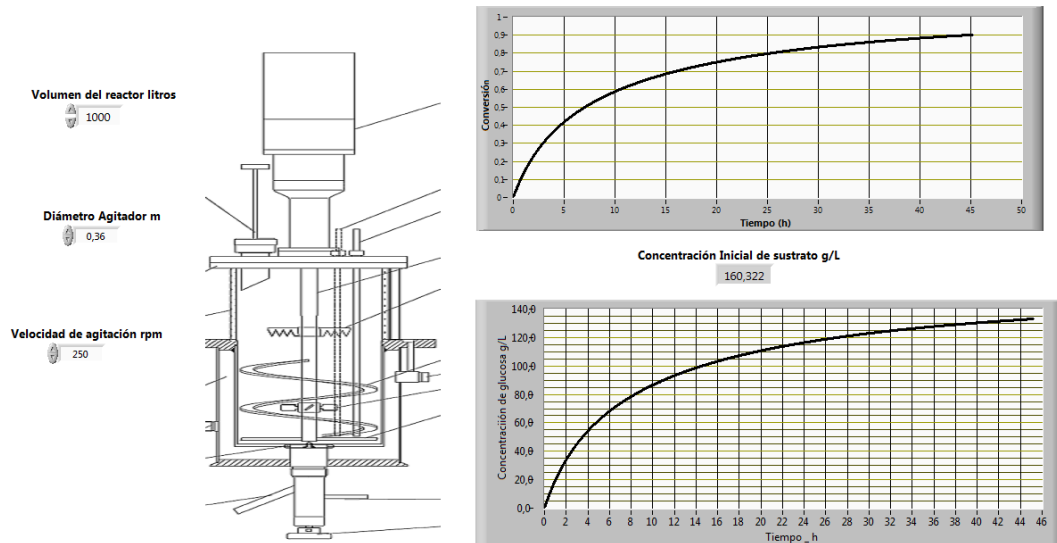


Ilustración 10. Segundo pantallazo “Reacción de hidrólisis”, donde se muestran las curvas de progreso de la conversión y concentración de glucosa g/L

El tercer pantallazo “Análisis difusional y costos”, presenta los resultados de los coeficientes de transferencia de masa obtenidos a partir del equilibrio de reacción de hidrólisis con respecto a la difusión de la enzima al sustrato (material lignocelulósico) y por el modelo de Frossling. También, muestra las representaciones en 3D de la función objetivo “Diferencia” y la conversión en función de la relación E/S y tiempo de hidrólisis (ilustración 11).

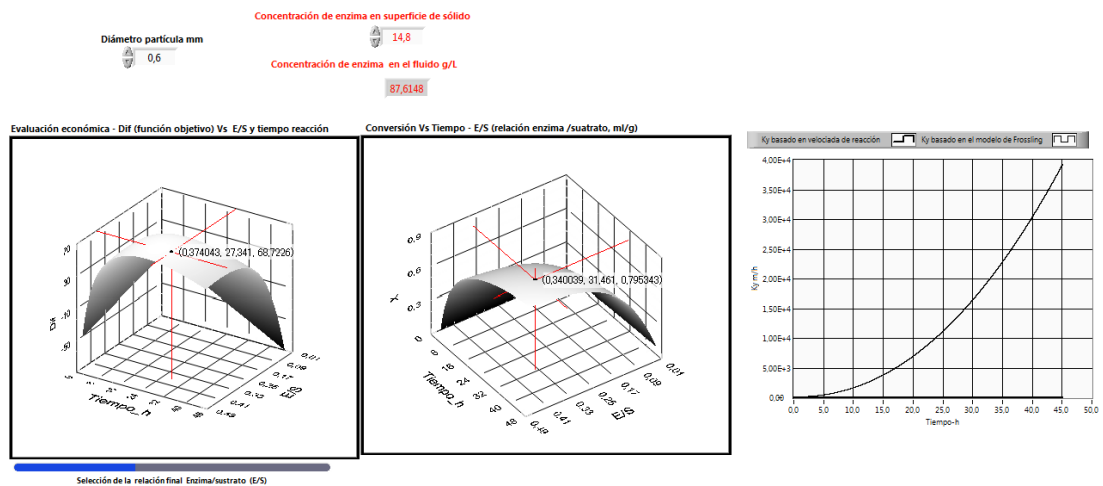


Ilustración 11. Tercer pantallazo “análisis difusional y costos”, donde se muestra en 3D la función objetivo y la conversión en función del tiempo y la relacion E/S. además, se presenta la evaluación de los coeficientes de transferencia de masa

Para hacer uso de la información obtenida a través de la simulación del software, se plantearon algunas situaciones basadas en los datos de entrada por defecto. En este caso, se planteo una relación enzima /sustrato de 0.0716 y un costo de enzima de 4 U\$/litro, El resultado mostró un costo de unidades de papel filtro de 14.52 U\$/10000FPU. En la ilustración 12, se presentan los resultados obtenidos para la función objetivo “diferencia” son negativos para todo el tiempo de hidrolisis, mostrando que no es viable económicamente producir jarabes glucosados a partir de residuos de la caña de azúcar para esta condiciones.

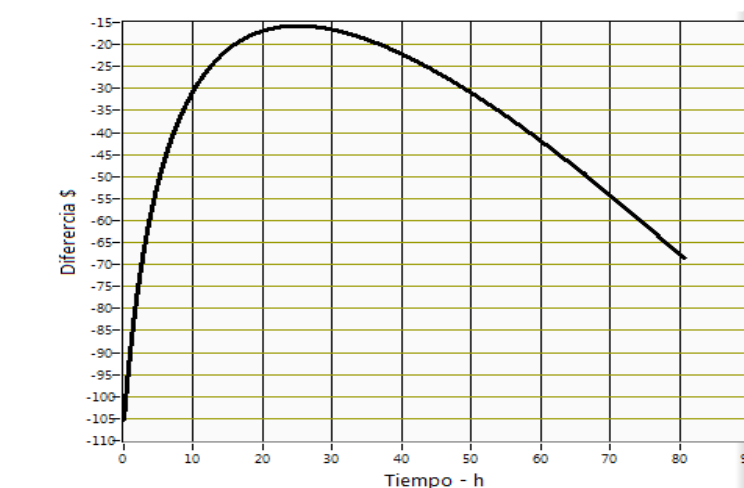


Ilustración 12. Funcion objetivo”diferencia” para una relacion E/S de 0.0716 y un valor de enzima de 4 U\$/L

La ilustración 13, muestra que la conversión alcanza un máximo valor de 0.5. Esta conversión es baja para este tipo de procesos, debido a las perdidas de material sin hidrolizar.

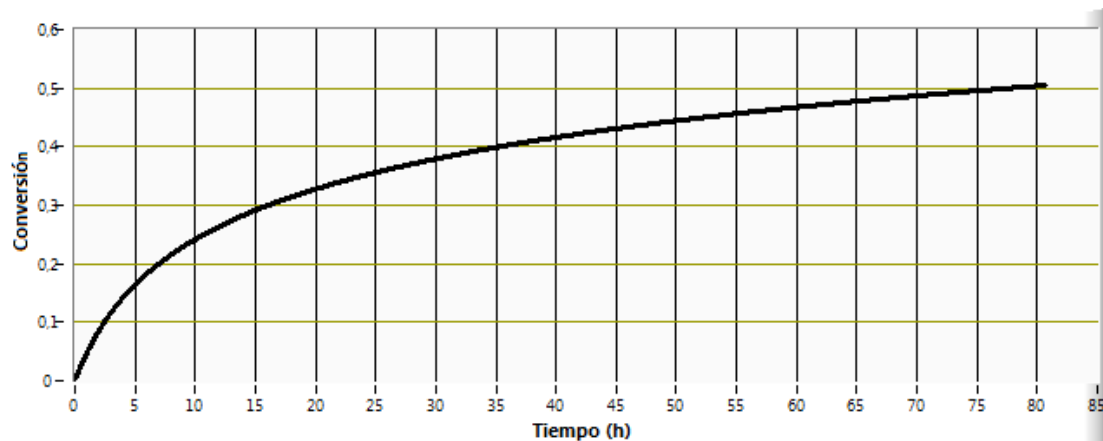


Ilustración 13. Curva de progreso de conversión $E/S=0.0716$ y 4 U\$/L

La representación de los resultados en tres dimensiones, muestra una superficie de respuesta de la función objetivo "diferencia" siempre negativa para todos los tiempos y relaciones E/S. Así como, una conversión baja para relaciones E/S cerca de 0.07 (ver ilustraciones 14 y 15)

Evaluación económica - Dif (función objetivo) Vs E/S y tiempo reacción

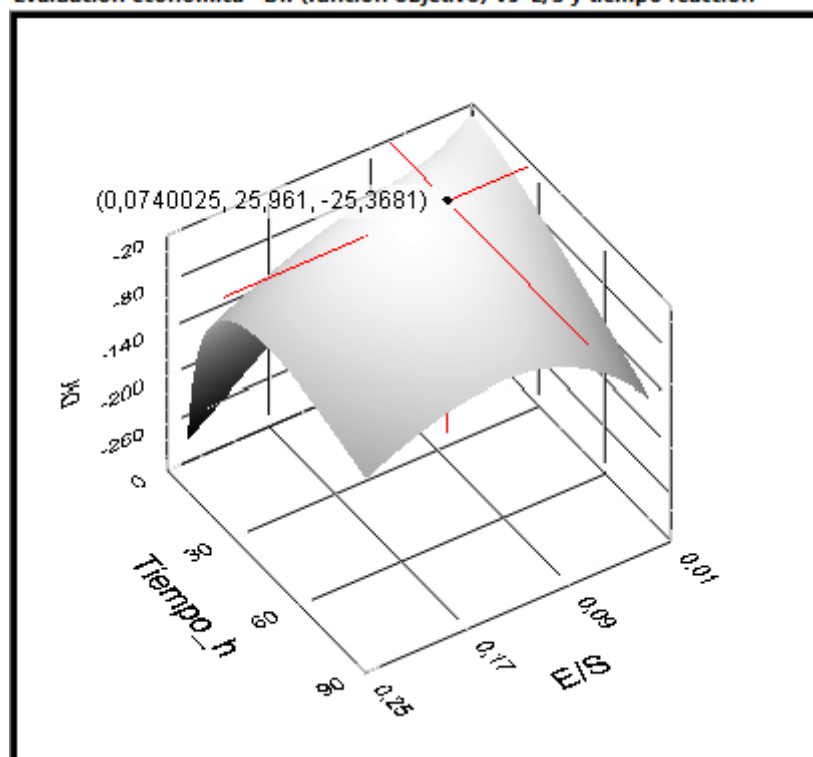


Ilustración 14. Función objetivo “diferencia” en función de E/S y tiempo para un valor de enzima de 4 U\$ /L

Conversión Vs Tiempo - E/S (relación enzima /sustrato, ml/g)

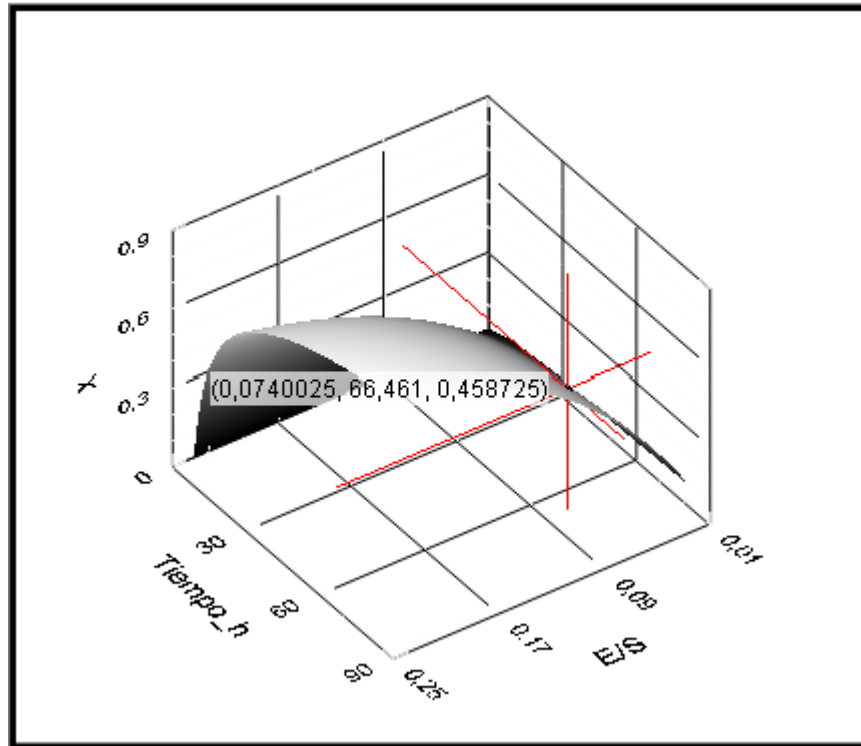


Ilustración 15. Conversion en función de E/S y tiempo para un valor de enzima de 4 U\$ /L

En el análisis de otro caso, se tomó una relación E/S de 0.239, una concentración inicial de sustrato 176 g/L y precio de enzima de 1.57 U\$/L. Los resultados obtenidos muestran un costo de unidades de papel filtro de 5.7 U\$/100000 FPU. En las ilustraciones 16, 17 y 18, se observa como se amplía el intervalo de tiempo para que la función objetivo “diferencia” sea positiva. Para este tiempo corresponde una conversión de 0.85 y una producción de azúcares de 140 g/L.

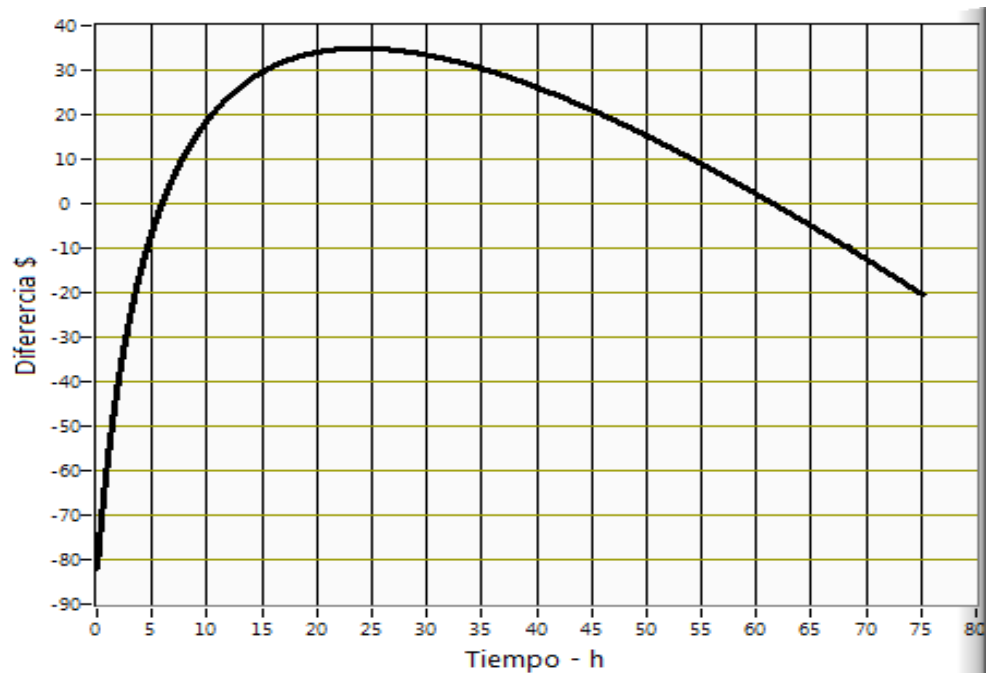


Ilustración 16. Función objetivo "diferencia" para una relacion E/S de 0.239, concentración inicial de sustrato de 176 g/L y un valor de enzima de 1.57 U\$/L

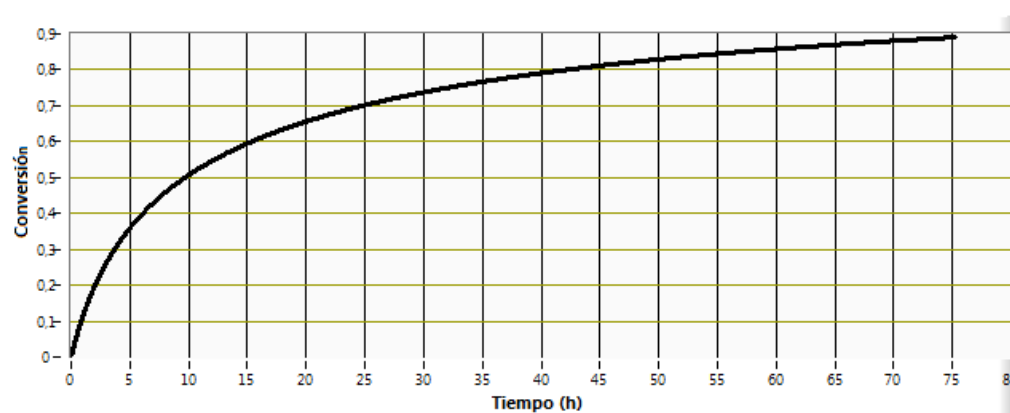


Ilustración 17. Curva de progreso de conversión para una relacion E/S=0.239, Concentraciön inicial de susytrato 176 g/L y valor de enzima de 1.57 U\$/L

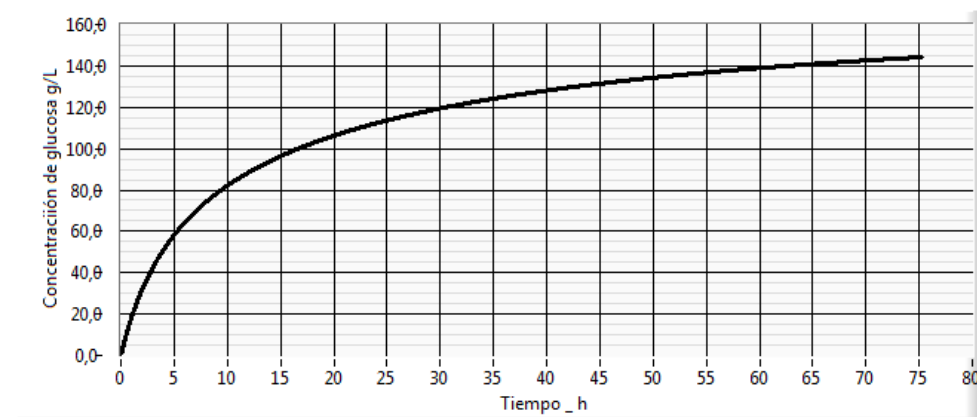


Ilustración 18. Curva de progreso de concentración de glucosa para una relación $E/S=0.239$, Concentración inicial de sustrato 176 g/L y valor de enzima de 1.57 U\$/L

Cuando se representan los datos en una superficie de respuesta (3D), se observa un valor máximo positivo de la función objetivo “diferencia”, cerca de una relación E/S de 0.23, para valores mayores de E/S disminuye hasta un mínimo y vuelve a subir, sin alcanzar valores positivos de la función objetivo (ver ilustración 19). Con el software se puede seguir explorando para obtener mayor información.

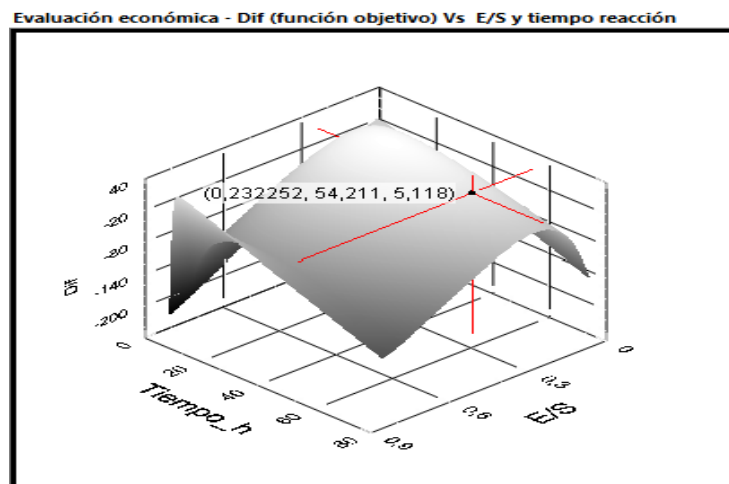


Ilustración 19. Función objetivo “diferencia” en función de E/S y tiempo, para una concentración inicial de sustrato 176 g/L y valor de enzima de 1.57 U\$/L

La Gráfica de conversión en 3D (ver ilustración 20), muestra que para las condiciones estudiadas la conversión alcanza 0.82, para conversiones más altas la función objetivo es negativa.

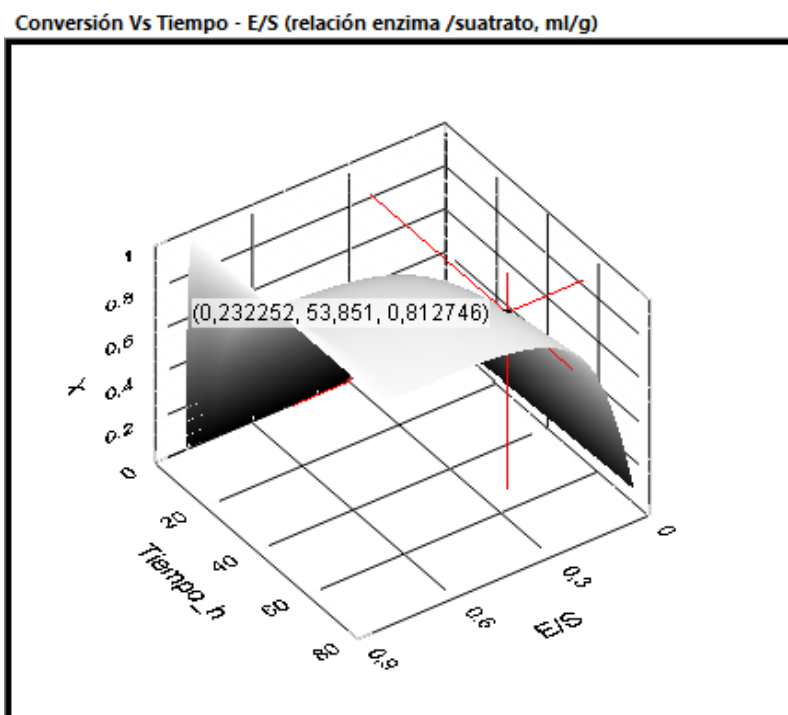
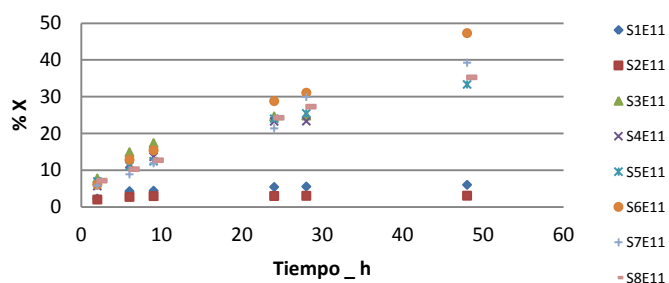


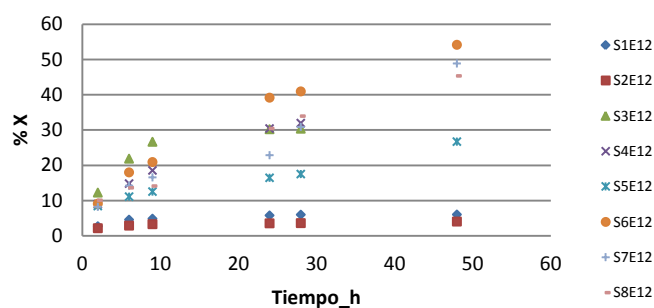
Ilustración 20. Conversión en función de E/S y tiempo, para una concentración inicial de sustrato 176 g/L y valor de enzima de 1.57 U\$/L

Apéndice 5. Gráficas para evaluación de efecto de lignina.

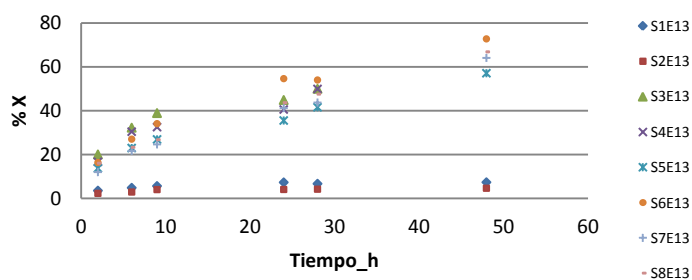
Las Gráficas 67, 68, 69 y 70 presentan el perfil de conversión con respecto al tiempo para la enzima E1 y relaciones E/S de 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3 que corresponden a E11, E12, E13, E14 respectivamente.



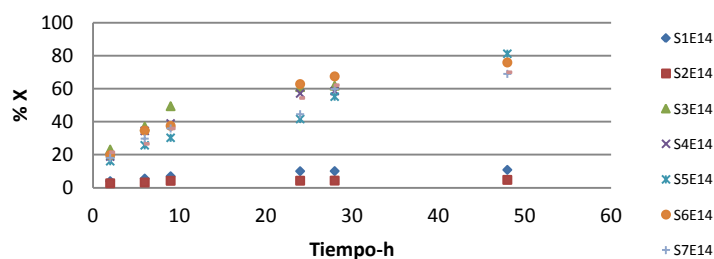
Gráfica 63. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E1 y una relación E/S=0.05



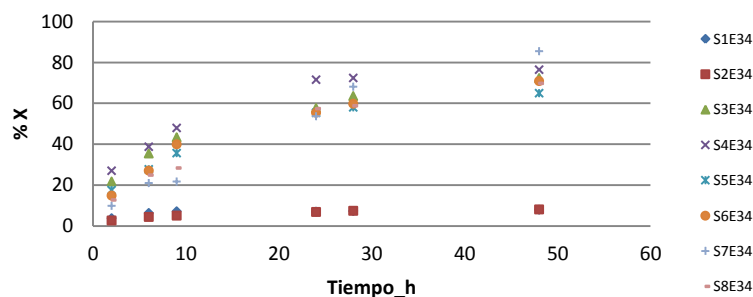
Gráfica 64. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E1 y una relación E/S de 0.1



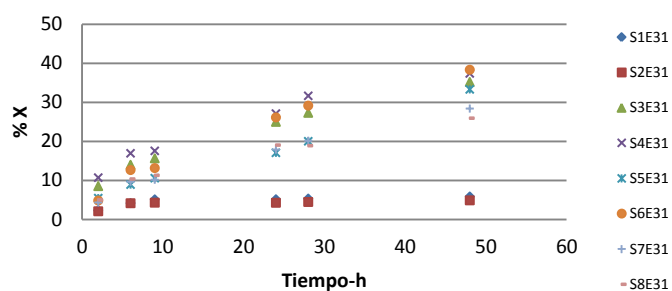
Gráfica 65. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E1 y una relación E/S de 0.2



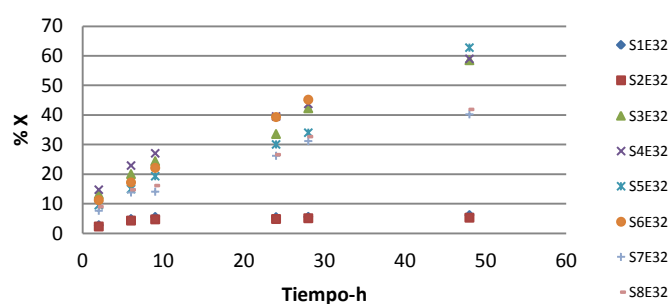
Gráfica 66. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E1 y una relación para E/S de 0.3



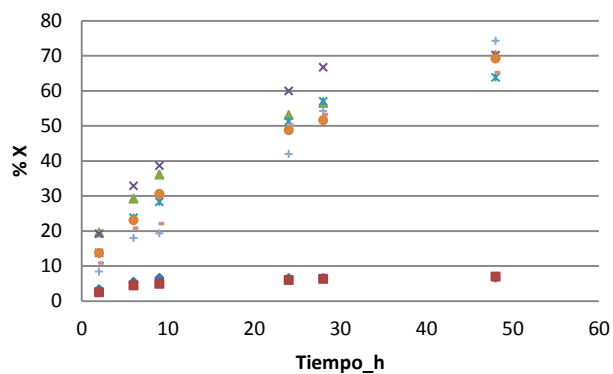
Las Gráficas 71, 72, 73 y 74, presentan el perfil de conversión con respecto al tiempo para la enzima E3 y relaciones E/S de 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3, que corresponden a E31, E32, E33 y E34 respectivamente.



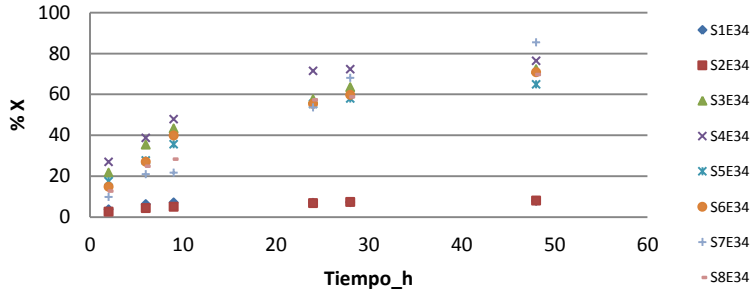
Gráfica 67. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E3 y una relación E/S=0.05



Gráfica 68. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E3 y una relación E/S=0.1



Gráfica 69. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E3 y una relación E/S=0.2



Gráfica 70. Perfil de conversión con respecto al tiempo para E3 y una relación E/S=0.3

Apéndice 6

Enzima	Indice Sacararificación 2h	Indice Sacararificación 6h	Indice Sacararificación 9h	Indice Sacararificación 24 h	Indice Sacararificación 28 h
S1E1	7.08	4.98	10.10	21.49	20.10
S1E2	37.42	40.42	38.10	51.70	51.92
S1E3	5.99	8.49	8.54	7.84	8.24
S1E4	5.52	5.73	4.40	9.25	14.48
S1E5	11.83	17.31	17.39	13.00	15.30
S2E1	11.83	17.31	17.39	13.00	15.30
S2E2	32.01	34.94	35.67	33.81	35.14
S2E3	2.67	1.72	5.26	7.36	5.78
S2E4	1.61	9.70	9.30	10.14	14.18
S2E5	5.20	7.13	6.17	20.24	19.00
S3E1	62.37	88.56	125.65	152.83	160.41
S3E2	38.00	46.00	96.36	94.57	104.31
S3E3	52.60	85.33	141.00	176.00	145.00
S3E4	55.07	82.70	105.00	153.70	160.70
S3E5	69.00	90.00	140.00	150.00	194.00
S4E1	54.88	98.60	105.22	137.14	149.81
S4E2	44.00	44.00	39.00	35.72	39.90
S4E3	62.70	87.46	118.60	185.00	173.00
S4E4	47.06	91.50	108.60	90.13	121.00
S4E5	87.36	137.70	167.00	155.00	125.00
S5E1	45.70	75.60	87.80	124.00	172.00
S5E2	34.97	34.74	46.58	51.49	59.90
S5E3	46.66	75.00	98.10	155.00	155.00
S5E4	45.50	74.12	85.06	134.00	140.00
S5E5	64.40	75.76	116.00	150.00	163.00
S6E1	64.40	75.50	92.16	135.50	142.00
S6E2	56.79	87.03	92.14	135.00	142.00
S6E3	35.00	56.00	102.00	109.00	123.00
S6E4	27.13	28.89	81.28	91.03	101.00
S6E5	77.18	151.00	145.70	177.00	202.00
S7E1	48.00	81.00	94.60	104.00	123.80
S7E2	27.38	49.87	39.06	42.00	44.50

S7E3	19.28	43.95	45.95	143.80	194.70
S7E4	20.93	46.97	41.60	156.00	195.00
S7E5	50.00	57.00	88.50	178.00	207.00
S8E1	57.61	68.50	98.49	121.57	139.00
S8E2	44.79	50.53	44.54	54.76	58.23
S8E3	28.11	57.50	64.30	162.00	160.00
S8E4	49.46	41.66	59.85	153.00	172.00
S8E5	67.87	86.00	92.76	146.00	147.00