

DETERMINACIÓN DE LA ACCESIBILIDAD ENZIMÁTICA EN BIOMASA
LIGNOCELULÓSICA PRETRATADA TÉRMICA Y MECÁNICAMENTE CON
ÁCIDO SULFÚRICO DILUIDO POR MEDIO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

MARIO JIMENEZ CARREÑO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2017

DETERMINACIÓN DE LA ACCESIBILIDAD ENZIMÁTICA EN BIOMASA
LIGNOCELULÓSICA PRETRATADA TÉRMICA Y MECÁNICAMENTE CON
ÁCIDO SULFÚRICO DILUIDO POR MEDIO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

MARIO JIMENEZ CARREÑO

Proyecto de grado para optar al título de Ingeniero Químico

Director:

VIATCHESLAV KAFAROV

Ph. D. en Ingeniería Química

Codirector:

NEILA MANTILLA

Ingeniera Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2017

AGRADECIMIENTOS

“Esfuézate y sé valiente...”

Josué 1:6

“Todo lo puedo en cristo que me fortalece.”

Filipenses 4:13

A Dios por ser mi sustento y darme la fuerza para continuar día a día.

A mis padres María del Rosario Carreño y José Antonio Rincón, por el apoyo incondicional brindado durante esta etapa universitaria.

A mi codirectora Neila Milena Mantilla, por creer y confiar en mí, al final, lo logramos.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Sergio Cáceres, Said Mora, Oscar Contreras, Fabián Acuña, Álvaro López, Yadira Pirateque, Paola Arias e Ingrid Pérez, por ayudarme a conseguir este importante logro.

Finalmente, a Silvia Juliana Márquez por ser la mujer que llenó mi vida durante esta etapa universitaria, apoyarme y ayudarme en las buenas y malas, en la salud y enfermedad, siempre con todo su amor, muchas gracias.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. METODOLOGÍA	19
1.1. FASE 1. CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA PRETRATADA.	19
1.1.1. Procedimiento de caracterización de biomasa lignocelulósica.	20
1.1.2. Construcción curvas de calibración.	21
1.2. FASE 2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASA PRETRATADA.	21
1.2.1. Cuantificación de proteína en la enzima.	21
1.2.1.1. Preparación de estándares de proteína.	22
1.2.1.2. Preparación ensayo de proteínas BCA.	22
1.2.2. Procedimiento para el montaje de hidrólisis enzimática.	22
1.2.2.1. Neutralización de biomasa pretratada.	22
1.2.2.2. Cálculos para hidrólisis enzimática.	23

1.2.2.3. Procedimiento experimental de montaje de hidrólisis enzimática.	23
1.2.2.4. Procedimiento de toma de alícuotas.	24
1.2.3. Efecto del porcentaje de sólidos insolubles en la hidrólisis enzimática.	25
1.2.4. Efecto de la metodología de adición de biomasa.	26
1.2.5. Efecto del porcentaje de ácido sulfúrico diluido.	26
1.2.6. Efecto del flujo másico de alimentación al reactor de pretratamiento.	27
1.2.7. Efecto de las operaciones individuales de pretratamiento.	27
1.3. FASE 3. CARACTERIZACIÓN DEL LICOR DE HIDRÓLISIS Y CÁLCULO DE RENDIMIENTOS.	28
1.3.1. Concentración de monómeros en alícuotas.	28
1.3.2. Concentración de oligómeros al final de hidrólisis enzimática.	28
1.3.3. Cálculo de rendimientos.	28
1.4. FASE 4. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DE BARRIDO SEM/EDS.	28
2. RESULTADOS Y ANÁLISIS.	30
2.1. CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA PRETRATADA.	30
2.2. PROTEINA EN ENZIMA.	31

2.3. EFECTO DEL PORCENTAJE DE SÓLIDOS INSOLUBLES EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.	31
2.4. EFECTO DE LA METODOLOGÍA DE ADICIÓN DE BIOMASA.	32
2.5. EFECTO DEL PORCENTAJE DE ÁCIDO SULFÚRICO DILUIDO.	33
2.6. EFECTO DEL FLUJO MÁSICO DE ALIMENTACIÓN AL REACTOR DE PRETRATAMIENTO SOBRE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.	34
2.7. EFECTO DE LAS OPERACIONES INDIVIDUALES DE PRETRATAMIENTO	35
2.8. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO COMBINADO.	36
2.9. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DE BARRIDO SEM/EDS.	37
3. CONCLUSIONES	40
4. RECOMENDACIONES.....	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS	52

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología	19
Figura 2. Montaje de hidrólisis enzimática	24
Figura 3. Rendimientos de glucosa y xilosa a diferentes porcentajes de sólidos insolubles y métodos de adición de biomasa.....	32
Figura 4. Rendimientos de azúcares en función del tiempo para dos porcentajes de ácido: (a) 1% y (b) 2% al igual que diferentes flujos de alimentación al reactor de pretratamiento: círculo (30g/min), cuadro (50g/min) y triángulo (80 g/min).....	34
Figura 5. Rendimientos de monómeros y oligómeros a las 120 horas de hidrólisis para diferentes flujos de alimentación (30, 50 y 80 g/min) y diferentes porcentajes de ácido en la impregnación (1 y 2%).....	35
Figura 6. Rendimientos de azúcares en la hidrólisis enzimática para los procesos de pretratamiento individuales y combinado	36
Figura 7. Micrografías SEM para diferentes muestras de biomasa pretratada	38
Figura 8. Muestra representativa de Xiaowen Chen et al. Biomasa deacetilada con molienda de discos y Szego. Tamaño de partícula 122 um.....	39

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Condiciones de pretratamiento de las biomosas hidrolizadas	20
Tabla 2. Descripción de ensayos para porcentaje de sólidos y adición de biomasa	26
Tabla 3. Descripción de los ensayos con diferente porcentaje de ácido y diferentes flujos de alimentación	27
Tabla 4. Descripción de los blancos de biomasa	27
Tabla 5. Descripción de las muestras analizadas por SEM/EDS.....	29
Tabla 6. Caracterización de los sólidos insolubles de los blancos de pretratamiento	30

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. DATOS DE CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA PRETRATADA	52
ANEXO B. PROCEDIMIENTO DETALLADO DE CARACTETIZACIÓN DE BIOMASA	53
ANEXO C. CONSTRUCCIÓN CURVAS DE CALIBRACIÓN EN HPLC	61
ANEXO D. PREPARACIÓN CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICACIÓN DE PROTEINA.....	66
ANEXO E. CÁLCULOS PARA PREPARACIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA ..	67
ANEXO F. PROCEDIMIENTO DETALLADO DE CALCULOS DE RENDIMIENTOS	69

RESUMEN

TÍTULO: DETERMINACIÓN DE LA ACCESIBILIDAD ENZIMÁTICA EN BIOMASA LIGNOCELULÓSICA PRETRATADA TÉRMICA Y MECÁNICAMENTE CON ÁCIDO SULFÚRICO DILUIDO POR MEDIO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA*

AUTOR: MARIO JIMENEZ CARREÑO**

PALABRAS CLAVES: Accesibilidad enzimática, hidrólisis enzimática, pretratamiento de biomasa lignocelulósica, estructura superficial, rendimientos, microscopía de barrido SEM/EDS.

DESCRIPCIÓN.

La naturaleza finita de los combustibles fósiles, el impacto ambiental generado por los gases de efecto invernadero (GEI) y las consideraciones de salud consecuencia de la polución promueven la búsqueda de nuevas fuentes de energía y combustibles alternativos para los vehículos de motor, entre estos bioetanol, biodiesel, gas natural, electricidad y combustibles solares, entre otros. El procesamiento de material lignocelulósico a etanol consiste en cuatro operaciones principales: pretratamiento, hidrólisis o sacarificación, fermentación y separación o purificación del producto. El pretratamiento es necesario para alterar el tamaño macroscópico y microscópico de la biomasa, así como su estructura y su composición química, para que la hidrólisis de carbohidratos a monómeros de azúcares se pueda lograr con mayor rapidez y con rendimientos más altos. En este proyecto se evalúa el efecto de un pretratamiento térmico y mecánico sobre bagazo de caña impregnado con ácido sulfúrico diluido por medio de hidrólisis enzimática y análisis por microscopía de barrido SEM/EDS, en el cual se determinaron las condiciones de impregnación y pretratamiento que más efecto tienen sobre la accesibilidad enzimática de la biomasa lignocelulósica, demostrando que el efecto más importante sobre la estructura superficial de la biomasa es la molienda. Menor tamaño de partícula junto a una estructura superficial rugosa y delaminada mejoran la accesibilidad enzimática.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Viatcheslav Kafarov, Ingeniero Químico, PhD.

ABSTRACT

TITLE: DETERMINATION OF ENZYMATIC ACCESSIBILITY IN LIGNOCELLULOSIC BIOMASS PRETREATED THERMALLY AND MECHANICALLY WITH DILUTED SULFURIC ACID BY MEANS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS*

AUTHOR: MARIO JIMENEZ CARREÑO**

KEYWORDS: Enzymatic accessibility, enzymatic hydrolysis, lignocellulosic biomass pretreatment, surface structure, yields, scanning microscopy SEM/EDX.

DESCRIPTION.

The finite nature of fossil fuels, the environmental impact generated by greenhouse gases (GHG) and the health consequences of pollution promote the search for new sources of energy and alternative fuels for motor vehicles, including bioethanol, biodiesel, natural gas, electricity and solar fuels, among others. The processing of lignocellulosic material into ethanol consists in four main steps: pretreatment, hydrolysis or saccharification, fermentation and product separation or purification. Pretreatment is necessary to alter the macroscopic and microscopic size of the biomass, as well as its structure and chemical composition, so that the hydrolysis of carbohydrates into sugar monomers can be achieved more quickly and with higher yields. In this project, the effect of a thermal and mechanical pretreatment on cane bagasse impregnated with diluted sulfuric acid was evaluated by enzymatic hydrolysis and analyzed by scanning microscopy SEM/EDX, in which the impregnation and pretreatment conditions that have the most effect on the enzymatic accessibility of the lignocellulosic biomass were determined, showing that the most important effect on the surface structure of the biomass is the milling. Lower particle size together with a rough and delaminated surface structure improve enzymatic accessibility.

* Bachelor Thesis

**Physicochemical Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Advisor: Viatcheslav Kafarov, Chemical Engineer, PhD.

INTRODUCCIÓN

El sector transporte es uno de los más importantes del mundo y de mayor crecimiento, actualmente depende principalmente de los combustibles derivados del petróleo, de hecho es el responsable del 60 % del consumo mundial de petróleo [1], representando más del 70 % de las emisiones mundiales de monóxido de carbono (CO) y el 19 % de las emisiones mundiales de dióxido de carbono (CO₂) [2].

Se prevé que para el año 2050 habrá más de 2 mil millones de vehículos en el mundo [3], esto implica un incremento en el consumo de petróleo, afectando la estabilidad de los ecosistemas, el clima y las reservas mundiales de combustibles fósiles. La naturaleza finita de los combustibles fósiles, el impacto ambiental generado por los gases de efecto invernadero (GEI) y las consideraciones de salud consecuencia de la contaminación promueven la búsqueda de nuevas fuentes de energía y combustibles alternativos para los vehículos de motor. Según Methner et al [4], un combustible alternativo debe ser técnicamente factible, económicamente competitivo, ambientalmente aceptable y fácilmente disponible. De acuerdo a esa premisa, se han propuesto diferentes alternativas como combustibles, entre ellas bioetanol, biodiesel, metanol, hidrógeno, gas natural, gas licuado de petróleo (GLP), electricidad y combustibles solares, entre otros.

Una alternativa son los combustibles obtenidos a partir de biomasa, o biocombustibles, a estos pertenece el bioetanol, el biocombustible líquido más utilizado como combustible de transporte junto a su mezcla con gasolina. El bioetanol es un derivado de fuentes renovables de materia prima, principalmente plantas como trigo, remolacha azucarera, maíz, paja, madera y caña [5]. Las materias primas se clasifican en tres categorías: materias primas que contienen sacarosa (caña de azúcar, Remolacha azucarera, sorgo dulce y frutas), materias

primas de almidón (maíz, Milo, trigo, arroz, patatas, yuca, batatas y cebada) y materias primas lignocelulósicas (madera, paja y pastos) [6], que sustituyen cultivos alimentarios, tienen mejor rendimiento calórico y eficacia mucho mayor en cuanto al balance energético global [7].

El procesamiento de material lignocelulósico a etanol consiste en cuatro operaciones principales: pretratamiento, hidrólisis o sacarificación, fermentación y separación o purificación del producto. El pretratamiento es necesario para alterar el tamaño macroscópico y microscópico de la biomasa, así como su estructura y su composición química, para que la hidrólisis de carbohidratos a monómeros de azúcares se pueda lograr con mayor rapidez y con rendimientos más altos [8].

Este proyecto se desarrolla bajo el marco de la tesis doctoral en Ingeniería Química: **DESARROLLO DE UN MÉTODO DE PRETRATAMIENTO TERMOMECAÁNICO CONTINUO CON ÁCIDO SULFÚRICO DILUIDO, PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL LIGNOCELULÓSICO A PARTIR DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR**, en el cual se evalúa el efecto de un pretratamiento térmico y mecánico sobre bagazo de caña impregnado con ácido sulfúrico diluido por medio de hidrólisis enzimática. El pretratamiento se lleva a cabo en un reactor piloto con biomasa impregnada a diferentes concentraciones de ácido y diferentes flujos de alimentación al reactor, donde se realizan dos operaciones, inyección de vapor y molienda. Es importante determinar la efectividad del pretratamiento sobre la hidrólisis enzimática, evaluando tanto el efecto combinado del ácido y las dos operaciones, así como el efecto de cada operación.

En el año de 1996 Christos Hatzis et al [9] en colaboración con el *NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL)*, realiza un estudio sobre el balance de masa del proceso global de producción de bioetanol lignocelulósico, en

él se desarrollan plantillas de balance de masa para seguir con precisión la distribución del carbono a través del pretratamiento, y los procesos de sacarificación y fermentación simultáneos; además proporciona información de la recuperación de carbono en general, recuperación de azúcares individuales, la solubilización de componentes de la biomasa y los rendimientos de conversión del etanol. En 2008 David Hodge et al [10], junto al *NREL*, realizan un estudio sobre el efecto de los sólidos solubles e insolubles en la inhibición de las enzimas lignocelulósicas. En el año 2009 se publican varios estudios, Jan kristensen et al [11] deja claro que se debe tener en cuenta el cambio en el volumen, densidad y proporción de sólidos insolubles iniciales y finales durante la hidrólisis enzimática, de lo contrario se obtienen sobreestimaciones en el cálculo de rendimientos; también realiza un estudio paralelo en el cual muestra que existe una relación lineal entre la carga de sólidos insolubles y la disminución en los rendimientos [12]; Christine Roche et al [13] del *NREL*, identificaron reactores de botella de rodillos como recipientes de reacción escala laboratorio que proporcionan una mezcla adecuada para la sacarificación enzimática en cargas de biomasa con alto contenido de sólidos sin ninguna mezcla adicional. Yongming Zhu et al [14] del *NREL*, en 2011, desarrollan un método matemático para la estimación del cambio de volumen de líquido después de hidrólisis y posteriormente, el cálculo de rendimientos. En 2013, Alicia Modenbach et al [15], realizan una discusión sobre diferentes estudios, describiendo las limitaciones, como la falta de agua disponible, la dificultad de mezclar y manipular la biomasa, transferencia insuficiente de masa y calor, y concentración aumentada de inhibidores. Finalmente en 2015, Wenhui Geng et al [16], presentaron tres estrategias para maximizar la conversión de carbohidratos, alimentación tipo batch, división / espesamiento y clarificación, obteniendo estas dos últimas los mejores rendimientos.

El objetivo de este proyecto de investigación es determinar la efectividad del pretratamiento térmico y mecánico, para esto se realiza hidrólisis enzimática a las biomásas pretratadas y análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM/EDS).

La biomasa lignocelulósica está formada principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, siendo la celulosa el componente principal de la biomasa vegetal, la cual es un polímero lineal de glucosa (azúcar de seis carbonos o hexosa) [17]. La hemicelulosa es una sustancia corta altamente ramificada con pentosas (azúcar de cinco carbonos) como xilosa y arabinosa y hexosas como glucosa [18]. La lignina es una sustancia aromática, compuesta básicamente por unidades de fenilpropano que forman una matriz muy compleja que comprende grupos funcionales como hidroxilo, metoxilo y carbonilo [19]. El pretratamiento rompe las fibras de lignina que recubren la celulosa y hemicelulosa para que se puedan hidrolizar a azúcares monoméricos, proceso en el cual se desarrolla el desglosado del polisacárido (polímero de azúcares) a moléculas de azúcar libres por la adición de agua [20].

Los métodos de hidrólisis más comúnmente aplicados se pueden clasificar en dos grupos: hidrólisis química (hidrólisis ácida diluida y concentrada) e hidrólisis enzimática. Se denomina hidrólisis enzimática cuando el proceso de sacarificación es catalizado por enzimas [21]. La hidrólisis enzimática es una alternativa que implica el uso de enzimas degradantes de carbohidratos (celulasas y hemicelulasas) para hidrolizar lignocelulosas en azúcares fermentables. Las celulasas son un grupo de enzimas que sinérgicamente hidrolizan la celulosa, esto implica acciones sinérgicas por endoglucanasas que hidrolizan enlaces β -1,4-glucosídicos intramoleculares accesibles de cadenas de celulosa al azar para producir nuevos extremos de cadena, exoglucanasas que dividen las cadenas de celulosa en los extremos para liberar celobiosa (dímero de glucosa) soluble o glucosa y finalmente β -glucosidasas que hidrolizan la celobiosa a glucosa [22]. Existen diferentes

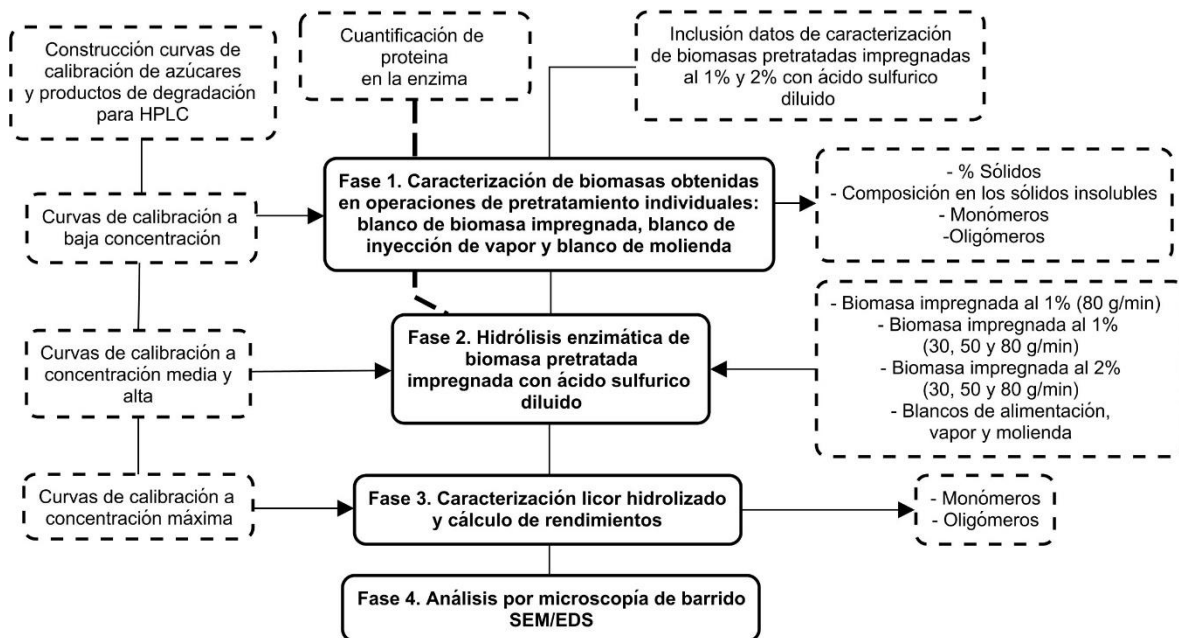
factores que afectan la hidrólisis enzimática de celulosa, sustratos, actividad de celulasa, condiciones de reacción (Temperatura, pH) y una fuerte inhibición por producto [23]. Las hemicelulasas implican un sistema multienzimático, la endoxilanasas ataca las principales cadenas de xilanos y la β -xilosidasa hidroliza xiloligosacáridos a xilosa [24]. Cuando se realiza la hidrólisis enzimática se obtienen altas concentraciones de azúcares monoméricos, en especial glucosa y xilosa que posteriormente pueden pasar a un proceso de fermentación para la producción de etanol lignocelulósico.

Adicional a la hidrólisis enzimática, se realiza el análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM/EDS) la cual es una técnica donde el barrido de una muestra con un haz de electrones permite obtener imágenes en blanco y negro de alta resolución, que posibilitan estudiar detalles de su morfología y también análisis elemental de la superficie [25]. Con esta técnica es posible verificar microscópicamente el efecto del pretratamiento sobre la estructura de las fibras de biomasa y la accesibilidad de las enzimas en esta.

1. METODOLOGÍA

La figura 1 muestra el esquema metodológico del proyecto dividido en 4 fases.

Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología



1.1. FASE 1. CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA PRETRATADA.

Del reactor de pretratamiento térmico y mecánico diseñado en tesis doctoral, se obtuvo la biomasa para hidrólisis enzimática, las condiciones de pretratamiento de cada biomasa se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de pretratamiento de las biomásas hidrolizadas

Prueba de pretratamiento	Porcentaje de ácido sulfúrico diluido en la impregnación	Flujo másico alimentado al reactor [g/min]
2ka	1 %	80
3w	1 %	30
3f	1 %	50
3za	1 %	80
3zb	2 %	30
3x	2 %	50
3y	2 %	80

Los datos de caracterización de sólidos totales, composición química de los sólidos insolubles y concentración de monómeros y oligómeros en el licor se encuentran en el Anexo A, estos fueron determinados previamente por Álvaro López y Yadira Pirateque [26] junto a Paola Arias e Ingrid Perez [27] en sus tesis de pregrado que también se desarrollaron dentro del marco de la tesis doctoral. Para verificar el efecto de las dos operaciones de pretratamiento combinado sobre la hidrólisis, se realizó la caracterización de blancos de pretratamiento, biomasa impregnada con ácido al 2%, biomasa impregnada con ácido al 2% sometida a pretratamiento con vapor a 130° durante 20 min y biomasa impregnada con ácido al 2% sometida a pretratamiento mecánico. A continuación se describe el procedimiento de caracterización llevado a cabo.

1.1.1. Procedimiento de caracterización de biomasa lignocelulósica. Se describe de forma resumida el procedimiento de caracterización, el cual se encuentra detallado en el Anexo B y sigue los procedimientos analíticos de laboratorio (LAP en inglés) del NREL, NREL/TP-5100-42621 para sólidos totales, NREL/TP-510-42627 para sólidos insolubles, NREL/TP-510-42618 para determinación de carbohidratos y lignina estructurales y la NREL/TP-510-42623 para determinación de carbohidratos en licor.

- Se pesó biomasa para determinación de sólidos totales.
- Se extrajo el licor de la biomasa después de diluirla y centrifugarla.

- Se tomó alícuota para cuantificación de monómeros y oligómeros en el licor.
- Se lavó la biomasa residual para determinación de sólidos insolubles.
- Se secaron los sólidos insolubles para determinación de carbohidratos y lignina.

1.1.2. Construcción curvas de calibración. Para cuantificación de azúcares y productos de degradación en licores se usó el equipo *SHIMADZU HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPH HPLC*, columna Aminex® HPX-87H con un flujo de 0.6 ml/min a 65°C y fase móvil 0.05 M de H_2SO_4 , bajo el inventario del centro de investigación para el desarrollo sostenible en industria y energía CIDES. Se construyeron curvas de calibración para azúcares (celobiosa, glucosa, xilosa y arabinosa) y productos de degradación (ácido succínico, ácido láctico, glicerol, ácido acético, etanol y furfural) a diferentes rangos de concentración, baja concentración (0-2 g/l) para licores de biomasa pretratada, concentración media (0-13 g/l) para estándares de verificación y recuperación, y alta (0-35 g/l) y máxima (0-60 g/l) concentración para licores de biomasa hidrolizada. El procedimiento detallado de construcción de curvas de calibración se encuentra en el Anexo C y está basado en el *LAP NREL/TP-510-42623* [28].

1.2. FASE 2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASA PRETRATADA.

La enzima que se usó en el proyecto es la Novozymes Cellic® CTec3, esta enzima permite la conversión rentable de la biomasa en etanol con rendimientos 1.5 veces mayores que el anterior producto de Novozymes, Cellic® CTec2 [29].

1.2.1. Cuantificación de proteína en la enzima. Para la cuantificación de proteína en la enzima se usó el kit de ensayo de proteínas BCA de *Thermo scientific®*.

1.2.1.1. Preparación de estándares de proteína. Se diluyó con agua el contenido de una ampolla de estándar de albúmina de suero bobino *BSA* en inglés, para construir una curva de calibración de la concentración de proteína en función de la absorbancia. Para esto se usó el espectrofotómetro UV-VIS Spectroquant® pharo 300 de Merck propiedad del CIDES. El protocolo de preparación de las diluciones se encuentra en el Anexo D, se hizo la preparación siguiendo las instrucciones del manual técnico de ensayo de proteínas [30].

1.2.1.2. Preparación ensayo de proteínas BCA. Se preparó el ensayo de proteínas BCA siguiendo el protocolo de ensayo de proteínas de la siguiente manera:

- Se diluyó la enzima Cellic® CTec3 500 veces en balones aforados de 250 ml por duplicado.
- Se mezcló el reactivo de trabajo diluyendo el reactivo B en el reactivo A con una relación de 1:50 v/v. (A y B reactivos del kit de proteínas).
- Se mezclaron 50 μ l de enzima diluida con 1 ml de reactivo de trabajo.
- Se incubó la solución a 37°C por 30 minutos.
- Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 562 nm.

1.2.2. Procedimiento para el montaje de hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en el Shaker IKA® KS 4000 i control propiedad del ICP-ECOPETROL, en el cual se controla temperatura, agitación y tiempo.

1.2.2.1. Neutralización de biomasa pretratada. El pH de trabajo óptimo para la hidrólisis enzimática está entre 4.8 y 5.0 según estudios anteriores y de acuerdo al *LAP NREL/TP-5100-63351* [31], a continuación el procedimiento de neutralización de la biomasa:

- Se preparó *buffer* de citrato de sodio 1.0 M y se diluyó a 50 mM.

- Se preparó una solución de hidróxido de amonio diluido en *buffer* de citrato de sodio 50 mM en una relación 1:4 v/v.
- Se pesó la biomasa a neutralizar para tener en cuenta en posterior dilución.
- Se adicionó la solución de hidróxido de amonio diluido con un atomizador hasta alcanzar un pH de 5.0, el cual es medido con tiras de papel medidor de pH y se registró el peso de solución adicionado.
- Se realizó el cálculo de sólidos totales según *LAP NREL/TP-510-42621* [32].

1.2.2.2. Cálculos para hidrólisis enzimática. Se realizaron cálculos basados en los resultados de caracterización de biomasa para determinar las cantidades de biomasa pretratada, *buffer* de citrato de sodio 50 mM y enzima a adicionar, siguiendo el procedimiento analítico de laboratorio NREL/TP-5100-63351. El procedimiento de cálculos se encuentra en el Anexo E.

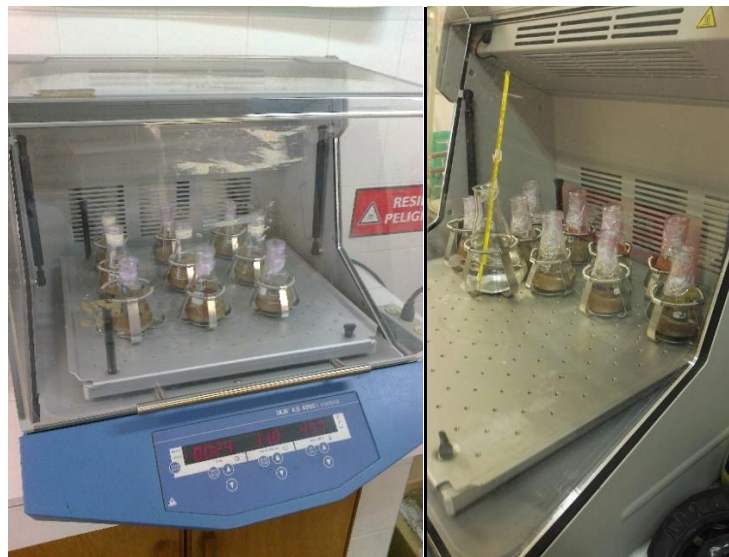
1.2.2.3. Procedimiento experimental de montaje de hidrólisis enzimática. Para el montaje de cada uno de los ensayos y su tratamiento se realizó el siguiente procedimiento:

- Se autoclavaron todos los materiales que estuvieron involucrados en la hidrólisis enzimática: Erlenmeyers, esferas de cerámica y *buffer*.
- Se pesó Erlenmeyer de 125 ml, se adicionó y pesó biomasa pretratada neutralizada y se adicionó y pesó *buffer* de citrato de sodio 50 mM.
- Se adicionó 1.5 ml de *buffer* adicional para tomar alícuota de control a las cero horas.
- Se adicionaron y pesaron 2 esferas de cerámica por ensayo, con diámetro promedio 1.59 cm con el objetivo de favorecer la agitación.
- Se homogenizó el *slurry* dentro del Erlenmeyer con agitación manual y se dejó precipitar para tomar alícuota de 1.5 ml, con la cual se determinó la concentración inicial de azúcares presentes.

- Se diluyó la enzima en *buffer* de citrato de sodio 50 mM en una relación 1:5 v/v para reducir viscosidad y permitir el pipeteo preciso de la solución de enzima.
- Se adicionó la cantidad requerida de solución de enzima completando un total de 50 g de *slurry* por ensayo.
- Se selló el Erlenmeyer con papel Darnel Wrap® y cinta adhesiva.
- Se introdujo el Erlenmeyer sellado en el *shaker* a 50°C y 110 rpm, condiciones óptimas de temperatura y agitación que permiten suspensión completa de sólidos.

Para cada ensayo se prepararon 3 réplicas y cada lote de hidrólisis duró entre 48 y 120 horas dependiendo del análisis a realizar. En la figura 2 se muestra el montaje de hidrólisis enzimática en el *shaker*.

Figura 2. Montaje de hidrólisis enzimática



1.2.2.4. Procedimiento de toma de alícuotas. Para las hidrólisis en las que se debía cuantificar el progreso de la concentración de azúcar se tomaron alícuotas cada 24 horas, a continuación el procedimiento de toma de alícuotas:

- Se retiró el Erlenmeyer del *shaker* y se retiró el sello.
- Se registró el peso inicial para determinar la masa evaporada.

- Se tomó alícuota de 1.5 ml con micropipeta Transferpette® y se vertió en tubo Falcon de 15 ml.
- Se registró el peso extraído de alícuota.
- Se reestableció el sello del Erlenmeyer y se introdujo nuevamente en el *shaker* para continuar con la hidrólisis.
- La alícuota tomada se centrifugó 3 veces en centrífuga Hettich Zentrifugen Universal 320 R a 4°C y 9000 rpm durante 20 min, según el *LAP NREL/TP-510-42627* [33]. El licor extraído en cada centrifugación se vertió en otro tubo Falcon de 15 ml las primeras dos veces, la tercera vez se vertió en vial de 1.5 ml para análisis en *HPLC*.
- Los sólidos residuales presentes en el primer tubo Falcon centrifugado se vertieron en un tubo Falcon de 50 ml en el cual se acumularon los sólidos residuales de todas las alícuotas para poder cuantificar la biomasa extraída que no reacciona y el cambio en la masa del *slurry* a lo largo de la hidrólisis.
- Se determinó sólidos insolubles según *LAP NREL/TP-510-42627* para el total de sólidos extraídos.
- Se registró el peso final en la última hora de hidrólisis y se vertió el *slurry* en tubo Falcon de 50 ml. Se extrajo licor según *LAP NREL/TP-510-42627* y se determinó sólidos insolubles para el total de biomasa hidrolizada.

1.2.3. Efecto del porcentaje de sólidos insolubles en la hidrólisis enzimática.

Para el ensayo inicial se prepararon dos porcentajes diferentes de sólidos insolubles 10% y 15%. La información de los ensayos se muestra en la tabla 2.

1.2.4. Efecto de la metodología de adición de biomasa. Se probaron dos metodologías de adición de biomasa; el total de biomasa alimentado a la hidrólisis desde el tiempo cero, y adiciones controladas de biomasa, 60% del total de los sólidos insolubles en el tiempo cero, 20% a las 12 horas y el 20% restante a las 24 horas como Wenhui Geng et al [34]. Estas dos metodologías se prepararon para un solo porcentaje de sólidos insolubles de 15%. La información de los ensayos se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Descripción de ensayos para porcentaje de sólidos y adición de biomasa

Ensayo	Descripción	Tiempo de hidrólisis [h]	Réplicas
15-i	Biomasa hidrolizada BH, <i>slurry</i> con 15% de sólidos insolubles, con adición de biomasa completa desde el tiempo cero.	48	a, b, c
15-A	Biomasa hidrolizada BH, <i>slurry</i> con 15% de sólidos insolubles y adición de biomasa en el tiempo, 60% en el tiempo cero, 20% a las 12h y 20% a las 24h.	48	a, b, c
10-i	Biomasa hidrolizada BH, <i>slurry</i> con 10% de sólidos insolubles y adición de biomasa completa desde el tiempo cero.	48	a, b, c

1.2.5. Efecto del porcentaje de ácido sulfúrico diluido. Se realizó el montaje de hidrólisis enzimática para biomosas pretratadas impregnadas con ácido sulfúrico al 1% y 2% usando el porcentaje de sólidos y adición de biomasa con mejores rendimientos resultantes del procedimiento anterior. La información de los ensayos se muestra en la tabla 3.

1.2.6. Efecto del flujo másico de alimentación al reactor de pretratamiento. Se realizó el montaje de hidrólisis enzimática para biomasa pretratada impregnada con ácido sulfúrico diluido a diferentes flujos másicos de alimentación al reactor de pretratamiento. Se usó el porcentaje de sólidos y adición de biomasa con mejores rendimientos resultantes de procedimientos anteriores. La información de los ensayos se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Descripción de los ensayos con diferente porcentaje de ácido y diferentes flujos de alimentación

Ensayo	Porcentaje de ácido	Flujo másico pretratamiento[g/min]	Tiempo de hidrólisis [h]	Réplicas
3w	1%	30	120	a, b, c
3f	1%	50	120	a, b, c
3za	1%	80	120	a, b, c
3zb	2%	30	120	a, b, c
3x	2%	50	120	a, b, c
3y	2%	80	120	a, b, c

1.2.7. Efecto de las operaciones individuales de pretratamiento. Se realizó el montaje de hidrólisis enzimática para blancos de biomasa impregnada al 2% con ácido sulfúrico. La información de los ensayos se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Descripción de los blancos de biomasa

Ensayo	Procesamiento	Tiempo de hidrólisis [h]	Réplicas
BA	Biomasa impregnada con ácido sulfúrico diluido al 2%	96	a, b, c
BV	Biomasa impregnada con ácido sulfúrico diluido al 2% + Pretratamiento con vapor 130°C, 20 min	96	a, b, c
BM	Biomasa impregnada con ácido sulfúrico diluido al 2% + Pretratamiento mecánico	96	a, b, c

1.3. FASE 3. CARACTERIZACIÓN DEL LICOR DE HIDRÓLISIS Y CÁLCULO DE RENDIMIENTOS.

1.3.1. Concentración de monómeros en alícuotas. Cada alícuota extraída durante la hidrólisis enzimática se analizó por *HPLC* como se describió anteriormente siguiendo el *LAP* NREL/TP-510-42623, obteniendo la concentración de glucosa y xilosa cada 24 horas.

1.3.2. Concentración de oligómeros al final de hidrólisis enzimática. Este procedimiento se realizó únicamente para los efectos del porcentaje de ácido en la impregnación y el efecto del flujo másico de alimentación al reactor de pretratamiento siguiendo el *LAP* NREL/TP-510-42623, obteniendo la concentración de glucosa y xilosa en el tiempo final de hidrólisis.

1.3.3. Cálculo de rendimientos. Se determinaron los rendimientos de azúcares (glucosa y xilosa) en monómeros para todos los ensayos y en oligómeros para los efectos del porcentaje de ácido en la impregnación y el efecto del flujo másico de alimentación al reactor de pretratamiento. Para el cálculo de los rendimientos se tuvo en cuenta las concentraciones iniciales y finales de azúcares en monómeros y oligómeros en el licor, los porcentajes de glucano y xilano de los sólidos insolubles previa hidrólisis y los volúmenes evaporados y extraídos durante la hidrólisis. El procedimiento detallado del cálculo de rendimientos se encuentra en el Anexo F.

1.4. FASE 4. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DE BARRIDO SEM/EDS.

Se realizó análisis por microscopía de barrido SEM/EDS a cuatro muestras de biomasa pretratada, la información de las muestras se presenta en la tabla 5.

Tabla 5. Descripción de las muestras analizadas por SEM/EDS

ID Muestra	Descripción
G5	1% de ácido, pretratamiento discontinuo
3f	1% de ácido, 50 g/min
3za	1% de ácido, 80 g/min
3y	2% de ácido, 80 g/min

La biomasa G5 fue pretratada de manera discontinua con el mismo tipo de molino utilizado en el reactor de pretratamiento termomécánico en pasantía de tesis doctoral, esta es utiliza para compararse con el pretratamiento actual. A continuación se describe el procedimiento metodológico de análisis SEM/EDS:

- Se homogenizaron y pesaron 5 g de biomasa pretratada según *LAP NREL/TP-510-42627*.
- Se analizaron las muestras de biomasa por SEM/EDS en el laboratorio de microscopía del centro de investigación UIS-Guatiguará. Para esto se aplicó un recubrimiento de carbono a las muestras para disminuir la interferencia causada por la humedad.
- Se realizaron aumentos a las imágenes de 200, 1000 y 15000x que permitieron observar las muestras a 400, 50 y 5 um respectivamente.
- Se midieron los diámetros de las partículas y las fibras observadas.
- Se tomaron capturas de las imágenes.

2. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

2.1. CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA PRETRATADA.

En la tabla 6 se muestra la caracterización realizada a los sólidos insolubles de los blancos de biomasa pretratada.

Tabla 6. Caracterización de los sólidos insolubles de los blancos de pretratamiento

	Pretratamiento	Unidades	BA	BV	BM
ST y SI	% Sólidos Totales en slurry pretratado	%	41.58±0.28	21.73±0.26	54.29±0.42
	% Sólidos Insolubles en slurry pretratado	%	37.4±0.66	19.6±0.54	48.9±0.90
Sólidos Insolubles	% de Cenizas Totales	%	5.33±0.06	5.33±0.06	5.33±0.06
	% de Lignina	%	22.79±0.03	24.24±0.07	27±0.18
	% de Glucano	%	44.24±0.28	54.45±0.32	48.45±0.61
	% de Xilano	%	23.99±0.24	11.82±1.44	13.81±0.88
	% de Arabinano	%	0.37±0.02	0.63±0.07	0.72±0.03
	% de grupos acetilos	%	3.65±1.53	0.00±1.13	2.47±0.13
	Total	%	100.37	96.47	97.77
Monómeros en licor pretratamiento	Glucosa	g/l	0.23±0.02	1.08±0.07	1.83±0.06
	Xilosa	g/l	1.13±0.01	15.53±0.92	27.96±1.23
	Arabinosa	g/l	1.38±0.02	0.33±0.02	2.56±0.04
	Ácido acético	g/l	4.37±0.04	1.15±0.06	7.03±0.09
Oligómeros en licor pretratamiento	Glucosa	g/l	1.20±0.12	0.66±0.17	6.4±0.92
	Xilosa	g/l	6.98±0.10	3.99±0.53	65.99±2.51
	Arabinosa	g/l	0.56±0.06	0.65±0.07	0.66±0.04

Los datos más significativos de la caracterización de sólidos insolubles son los porcentajes de glucano y xilano. La reducción de xilano en los dos procesos de pretratamiento BV y BM muestra que se ha producido ruptura de hemicelulosa, esto concuerda con Xiaowen Chen et al [35], quien muestra que el pretratamiento termoquímico realizado a la biomasa mejora significativamente la conversión de oligómeros de xilosa a xilosa monomérica. Esto se ve reflejado en la caracterización del licor, presente en la tabla 6, donde se evidencia que se ha solubilizado xilano a

monómeros, con concentraciones de 1.13 g/l de xilosa en el licor de biomasa impregnada, 15.53 g/l en el licor de biomasa impregnada pretratada con vapor y 27.96 g/l en el licor de la biomasa impregnada y molida. Este gran aumento en la solubilización de xilano se debe a que la molienda también realiza un pretratamiento térmico debido al incremento de la temperatura por la fricción.

2.2. PROTEINA EN ENZIMA.

Se determinó que la proteína en la enzima de trabajo es:

$$300.66 \frac{\text{mg de proteína}}{\text{ml de enzima}}$$

Esta se diluyó 5 veces para reducir viscosidad y permitir el pipeteo preciso, finalmente, la concentración de proteína de la enzima usada en la hidrólisis enzimática es:

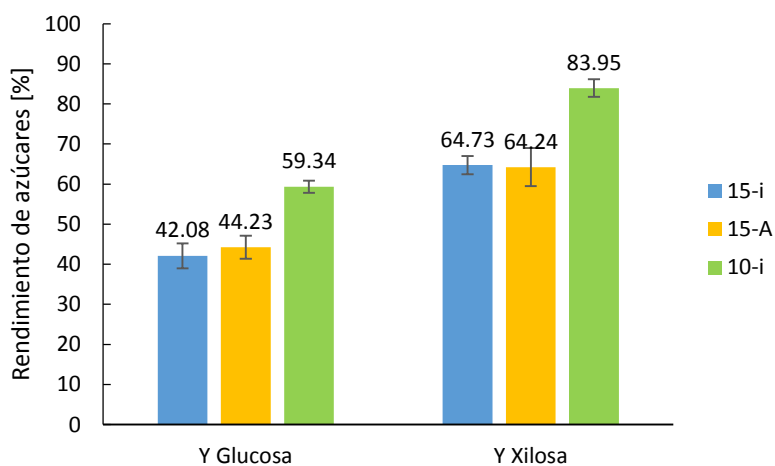
$$60.13 \frac{\text{mg de proteína}}{\text{ml de enzima diluida}}$$

2.3. EFECTO DEL PORCENTAJE DE SÓLIDOS INSOLUBLES EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.

Se probaron dos porcentajes de sólidos insolubles en la hidrólisis enzimática, 10% y 15% con la misma carga de enzima, 20 mg de proteína por gramo de glucano; misma carga de enzima para todos los ensayos de este estudio. Se realiza el análisis hasta las 48 horas de hidrólisis porque el aumento de la concentración de azúcares solo es apreciable en ese momento y a partir de ahí el cambio en la concentración es cada vez menor, Jan Kristensen et al [36]. En la figura 3 se puede apreciar que a las 48 h el rendimiento del ensayo de 10% de sólidos insolubles es

cerca de 17% y 19% mayor al rendimiento alcanzado por la hidrólisis de 15% de sólidos insolubles para glucosa y xilosa respectivamente. Esta mejoría en los rendimientos al usar menor cantidad de biomasa como la obtenida por Jan Kristensen et al [37] y Alicia Modenbach et al [38] confirman este porcentaje como el mejor y se utilizó para las hidrólisis posteriores.

Figura 3. Rendimientos de glucosa y xilosa a diferentes porcentajes de sólidos insolubles y métodos de adición de biomasa



2.4. EFECTO DE LA METODOLOGÍA DE ADICIÓN DE BIOMASA.

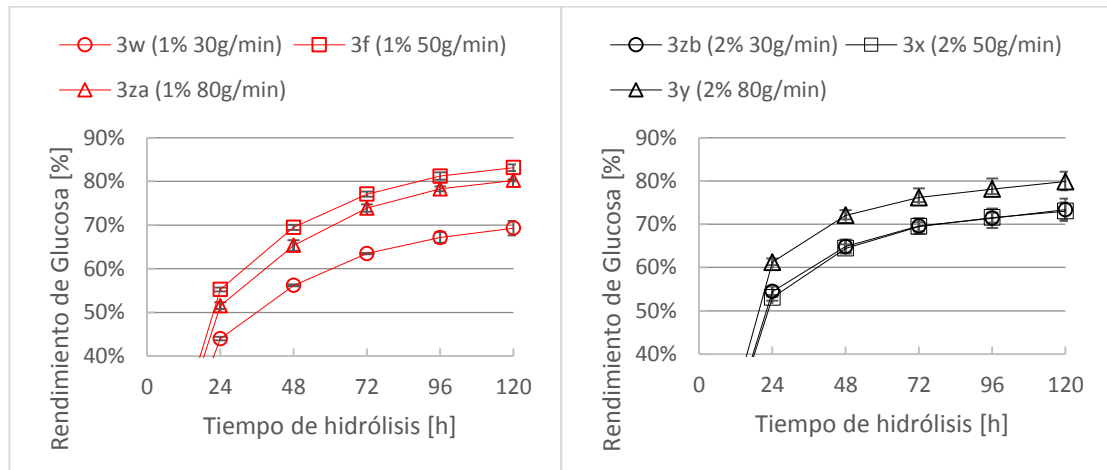
Se probaron dos metodologías de adición de biomasa con el mismo porcentaje de sólidos insolubles y la misma carga de enzima, la primera consiste en la adición del 100% de biomasa en el tiempo cero y la otra consiste en adiciones controladas de 60% en el tiempo cero, 20% a las 12 horas y 20% a las 24 horas. En la figura 3 se muestra que es indiferente el uso de cualquiera de los dos métodos pues la diferencia entre rendimientos de azúcares es mínima, este resultado contrasta con Wenhui Geng et al [39], quien obtiene rendimientos mayores para el método de adición a 15% de sólidos insolubles pero con tiempos de sacarificación de 72 y 96

horas usando *corn stover* pretratado como sustrato. Se decide usar el método de adición completa en el tiempo cero al 10% de sólidos insolubles.

2.5. EFECTO DEL PORCENTAJE DE ÁCIDO SULFÚRICO DILUIDO.

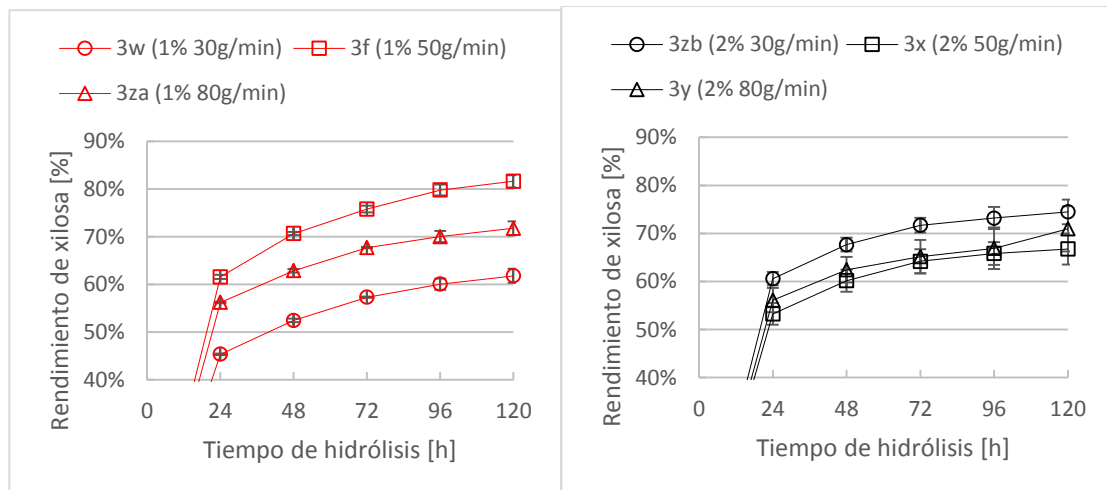
Se determinaron los rendimientos de conversión de azúcares para ensayos con el mismo porcentaje de sólidos insolubles y la misma carga de enzima a las 120 horas de hidrólisis para evaluar el efecto que tiene el porcentaje de ácido en la impregnación sobre la hidrólisis enzimática y se determinó qué ensayo liberó más azúcares durante la hidrólisis enzimática. El ensayo con menor porcentaje de ácido en la impregnación (1%) presenta los mejores rendimientos (figura 4), siempre por encima de los rendimientos de la biomasa impregnada al 2% para tiempos de hidrólisis superiores a las 48 h. Los rendimientos de la biomasa impregnada al 1% superan a la biomasa impregnada al 2% cerca de 10% para la mayoría de los flujos de alimentación al reactor como se ve en la figura 5. En otros estudios se demuestra que pretratamientos ácidos mejoran los rendimientos de conversión en la sacarificación, pero el porcentaje de ácido debe ser medido pues puede reducir los rendimientos, como lo muestra Xiaowen Chen et al [40] quien usa 0.5% p/p de H_2SO_4 y Wenhui Geng et al [41], que usa 0.8% p/p de H_2SO_4 para mejorar los rendimientos de la hidrólisis enzimática.

Figura 4. Rendimientos de azúcares en función del tiempo para dos porcentajes de ácido: (a) 1% y (b) 2% al igual que diferentes flujos de alimentación al reactor de pretratamiento: círculo (30g/min), cuadro (50g/min) y triángulo (80 g/min)



(a)

(b)

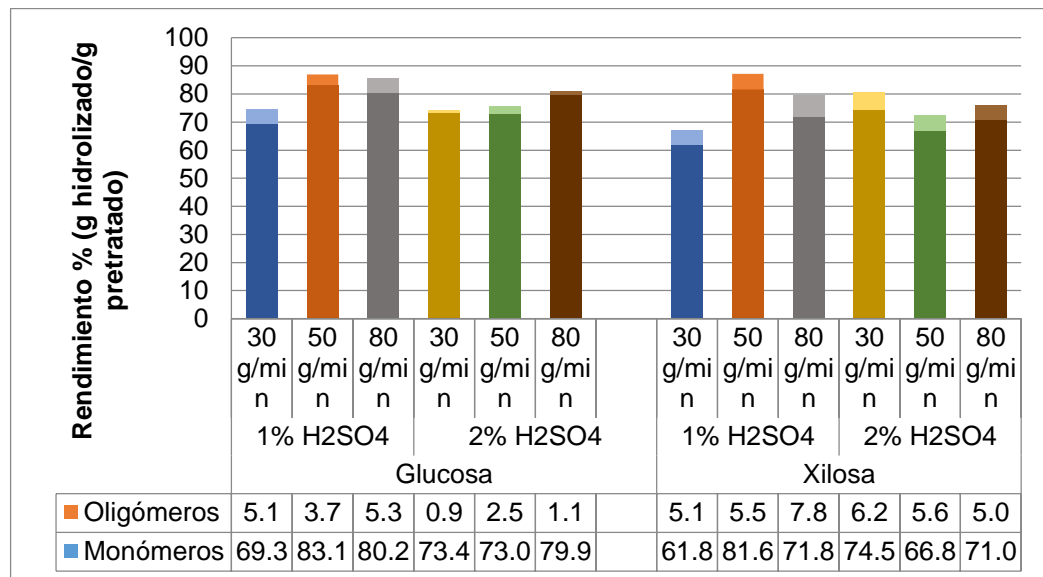


2.6. EFECTO DEL FLUJO MÁSCICO DE ALIMENTACIÓN AL REACTOR DE PRETRATAMIENTO SOBRE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.

En la figura 4 y 5 se encuentra la comparación entre rendimientos de sacarificación con el mismo porcentaje de sólidos insolubles, la misma carga de enzima y el mismo tiempo de sacarificación para diferentes tiempos de hidrólisis (figura 4) y diferentes

flujos de alimentación al reactor de pretratamiento. Se puede ver que no necesariamente a mayor flujo se presentarán mejores rendimientos principalmente en el caso de xilosa. El efecto que causa un mayor flujo de alimentación es un prensado extra en la molienda al trabajar con altos flujos de alimentación modificando la morfología de la biomasa, efecto que se analiza posteriormente. La figura 5 tampoco muestra resultados concluyentes de mejoría en los rendimientos finales (120 h) al aumentar el flujo de alimentación, especialmente para xilosa.

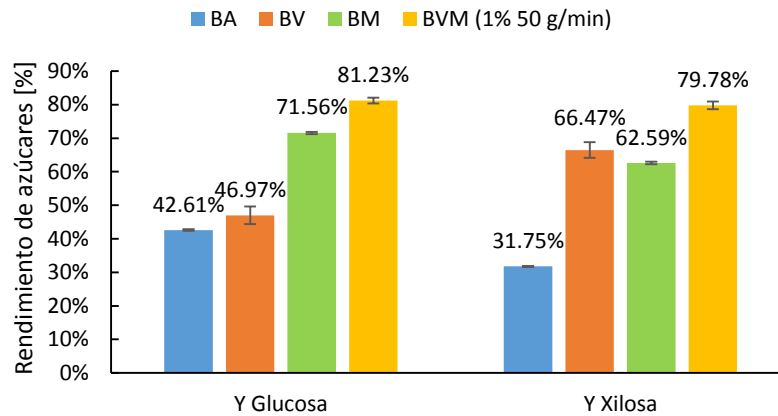
Figura 5. Rendimientos de monómeros y oligómeros a las 120 horas de hidrólisis para diferentes flujos de alimentación (30, 50 y 80 g/min) y diferentes porcentajes de ácido en la impregnación (1 y 2%)



2.7. EFECTO DE LAS OPERACIONES INDIVIDUALES DE PRETRATAMIENTO

Se determinaron los rendimientos de sacarificación individuales de cada operación (inyección de vapor y molienda) con el mismo porcentaje de sólidos insolubles y la misma carga de enzima para hidrólisis de 96 horas, ver figura 6.

Figura 6. Rendimientos de azúcares en la hidrólisis enzimática para los procesos de pretratamiento individuales y combinado



Se puede ver que los rendimientos de azúcares en la sacarificación son bajos para la biomasa únicamente impregnada, la inyección de vapor aumenta los rendimientos ~4% y ~30% para glucosa y xilosa respectivamente y la molienda ~30% y ~30% para glucosa y xilosa respectivamente. Según Xiaowen Chen et al [42] que obtiene una mejora en los rendimientos de glucosa entre 10% y 15% y rendimientos de xilosa entre 15% y 20%, esta es una muy buena evidencia de que la accesibilidad del sustrato es un factor clave en el alcance de la conversión enzimática. La reducción de tamaño resultante del proceso de molienda aumenta la superficie reactiva de la biomasa, exponiendo el sustrato a las enzimas lo que implica una mejora en los rendimientos.

2.8. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO COMBINADO.

Como se demostró anteriormente, el vapor y la molienda tienen efectos positivos sobre los rendimientos de conversión de azúcares en la hidrólisis enzimática, en la figura 6 se muestra la comparación entre el proceso global de pretratamiento y los

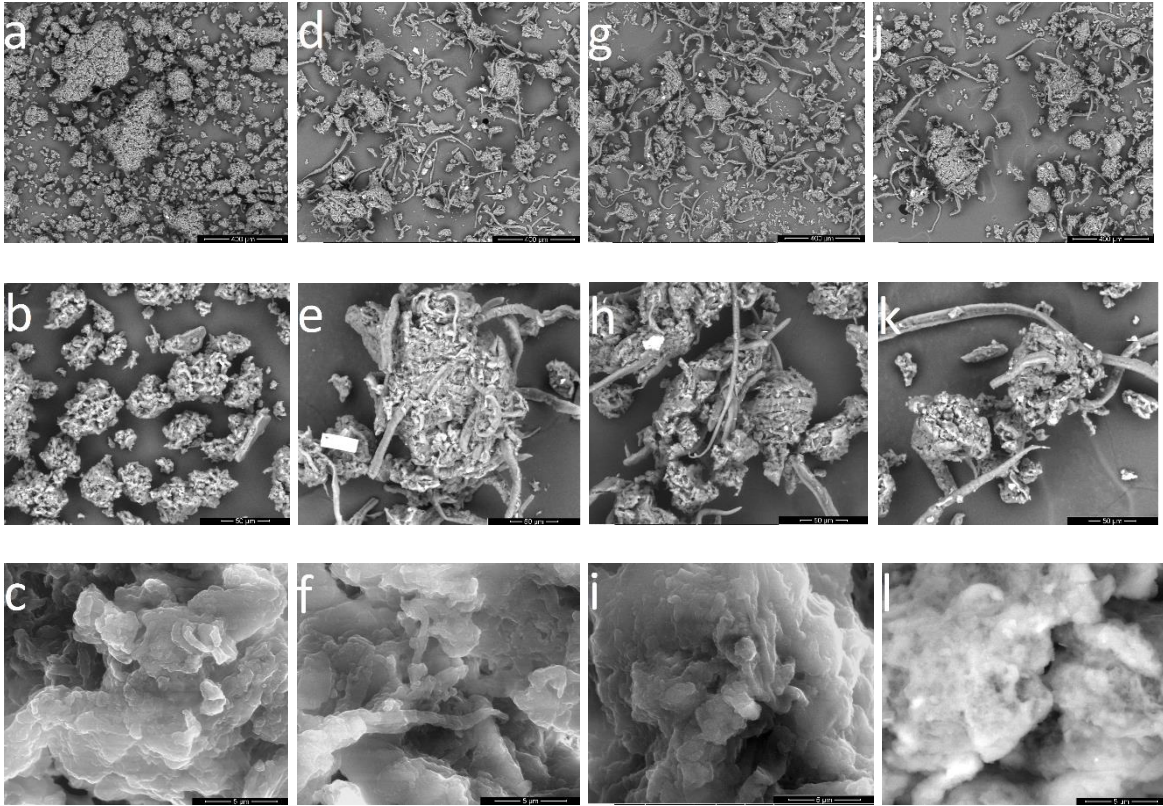
procesos individuales de impregnación, inyección de vapor y molienda al mismo tiempo de hidrólisis (96 h).

Se comparó el rendimiento de los procesos individuales con el mejor rendimiento obtenido en el proceso de pretratamiento combinado (1% H_2SO_4 y 50 g/min), obteniendo un aumento de ~40% y ~50% en los rendimientos de glucosa y xilosa respectivamente con respecto a la biomasa impregnada demostrando que el proceso combinado de pretratamiento mejora ~10% y ~17% los rendimientos para glucosa y xilosa respectivamente comparado con el proceso de molienda de biomasa impregnada. El proceso combinado presenta altos rendimientos en la hidrólisis enzimática y altas concentraciones de azúcares sacarificados trabajando a 1% de H_2SO_4 en la impregnación y 50 g/min de alimentación al reactor de pretratamiento (prueba 3f), comparables con estudios anteriores en los que se trabajó con la misma carga de sólidos insolubles (10%), la misma dosis de enzima (20 mg de proteína/ g glucano), el mismo tiempo de hidrólisis (120 h) y pretratamientos similares. David Hodge et al [43] obtiene rendimientos de 50% de glucosa con biomasa impregnada, 42.61% en este estudio (figura 6) y Xiaowen Chen et al [44] obtiene rendimientos superiores al 90% para glucosa y xilosa monomérica claramente superiores a los de este estudio (81.23% y 79.78%). Se cree que se han obtenido menores rendimientos que en otros estudios debido a la mayor concentración de H_2SO_4 utilizada en la impregnación y al tipo de molienda menos especializado.

2.9. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DE BARRIDO SEM/EDS.

Cuatro muestras de biomasa se analizaron por microscopía de barrido SEM/EDS. Los resultados más representativos se muestran en la figura 7.

Figura 7. Micrografías SEM para diferentes muestras de biomasa pretratada

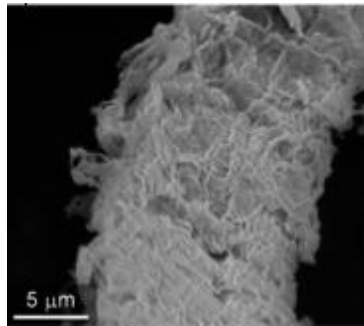


Sean las imágenes (a, b, c) micrografías de la muestra G5 a 200 (400um), 1000 (50um) y 15000 (5um) aumentos respectivamente, (d, e, f) de la muestra 3f, (g, h, i) de la muestra 3z y (j, k, l) de la muestra 3y.

La muestra G5 (a, b, c) no evidencia presencia de fibras (a, b), el tamaño de partícula es menor, evidencia maceramiento (b) y posee estructura superficial rugosa (c). La muestra 3f (d, e, f) evidencia presencia de fibras (d, e), tamaño de partícula medio (e) y estructura superficial rugosa. La muestra 3za evidencia presencia de fibras (g), partículas maceradas de tamaño medio (h) y estructura superficial rugosa (i). La muestra 3y evidencia fibras y tamaño de partícula medio (j, k) con estructura superficial rugosa (l). Como se analizó anteriormente el flujo másico de alimentación al pretratamiento no es determinante en la conversión de azúcares, mayor flujo representa prensado adicional de la biomasa lo que

morfológicamente evidencia un macerado mayor y tamaño de partícula menor, como se observa en las muestras 3f (50 g/min) y 3za (80 g/min) pero al presentar la misma estructura superficial rugosa el área superficial accesible a las enzimas es la misma, obteniendo rendimientos de glucosa similares, 83.1 y 80.2% respectivamente (figura 5), al igual que Xiaowen Chen et al [45], quien concluye que el efecto más importante sobre la estructura superficial es el tipo de molienda. Morfológicamente no se evidencia diferencia entre las muestras con diferente porcentaje de ácido y mismo flujo de alimentación 3za (1%) y 3y (2%), es decir presentan la misma accesibilidad enzimática, lo que se evidencia en los rendimientos anteriormente mostrados, que son similares para las dos muestras (figura 5) 80.2 y 79.9% para glucosa respectivamente. La muestra G5 se toma como el blanco ideal por sus características de molienda evidenciando completo macerado, corte y delaminación así como la mejor muestra de Xiaowen Chen et al [46].

Figura 8. Muestra representativa de Xiaowen Chen et al. Biomasa deacetilada con molienda de discos y Szego. Tamaño de partícula 122 μm



Morfológicamente la mejor biomasa pretratada de este estudio fue la biomasa 3f (figura 7 (f)), en comparación a la muestra de Xiaowen Chen et al [47] no presenta delaminación pero sí corte, macerado y tamaño de partícula similar (109 μm), al ser la biomasa con los mejores rendimientos en la hidrólisis enzimática se demuestra que la estructura superficial rugosa de la biomasa y tamaño de partícula reducido mejoran la accesibilidad enzimática.

3. CONCLUSIONES

- El pretratamiento térmico y mecánico es eficiente en la ruptura de hemicelulosa, mejorando significativamente la conversión de oligómeros de xilosa a xilosa monomérica.
- Se logra mejores conversiones de azúcares en la hidrólisis enzimática trabajando con 10% de sólidos insolubles y metodología de adición completa de biomasa en el tiempo cero a las mismas condiciones de sacarificación (carga de enzima y tiempo de hidrólisis). Así mismo, las mejores condiciones de pretratamiento evaluadas para favorecer la conversión de azúcares en la hidrólisis enzimática son: impregnación con ácido sulfúrico al 1% y flujo de alimentación al reactor de pretratamiento de 50 g/min. En estas condiciones, el pretratamiento combinado presenta un aumento de ~40% y ~50% en los rendimientos de glucosa y xilosa respectivamente en comparación al proceso de impregnación demostrando que el proceso combinado de pretratamiento es mucho más eficaz que el proceso de molienda y el de inyección de vapor.
- El efecto más importante sobre la estructura superficial de la biomasa es la molienda. Menor tamaño de partícula junto a una estructura superficial rugosa y delaminada mejoran la accesibilidad enzimática.

4. RECOMENDACIONES

- Se recomienda usar otros tipos de recipiente para el montaje de las sacarificaciones como reactores tubulares en los cuales la toma de alícuotas es más sencilla.
- Se recomienda esterilizar muy bien todos los materiales involucrados en la sacarificación al igual que la biomasa para hidrólisis para que los azúcares no se fermenten.
- Se recomienda realizar hidrólisis enzimática a biomasa impregnada con porcentajes de ácido sulfúrico menores al 1%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA). Key world energy statistics 2008. Paris: OECD/IEA; 2008.
- [2] GOLDEMBERG J. Environmental and ecological dimensions of biofuels. En: Proceedings of the conference on the ecological dimensions of biofuels. Washington DC: March 10; 2008.
- [3] WORLD BUSINESS COUNCIL FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT (WBCSD). Mobility 2030: meeting the challenges to sustainability. The sustainable mobility project, Geneva, Switzerland; 2004.
- [4] METHER LC, SAGAR DV, NAIK SN. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renew Sustain Energy Rev* 2006;10:248–68.
- [5] BALAT, Mustafa. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy conversion and management*. 15, agosto, 2010, vol 52. pp 858-875.
- [6] Ibid., p 860.
- [7] VIVERO, José y PORRAS, Carmen. *Los biocombustibles y su impacto en la crisis alimentaria*. En: CASCANTE, K y SANCHEZ, A. La crisis mundial de alimentos: alternativas para la toma de decisiones. Madrid: Fundación alternativas, exilibris ediciones, 2008, p 29-51.
- [8] MOZIER, Nathan, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*. 30, junio, 2004. pp 673-686.
- [9] HATZIS, Christos, RILEY, Chyntia & PHILIPPIDIS, George. Detailed materia balance and etanol yield calculations for the biomass-to-ethanol conversion process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1996, vol. 57/58. pp 443-459.
- [10] HODGE, David, et al. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresource technology*. 1, mayo, 2008. pp 8940-8948.

- [11] KRISTENSEN, Jan, FELBY Claus & JORGENSEN, Hening. Determining yields in high solids enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, vol. 156. pp 557-562.
- [12] KRISTENSEN, Jan, FELBY, Claus & JORGENSEN, Hening. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology for biofuels*. 8, junio, 2009.
- [13] ROCHE, Christine, DIBBLE, Clare & STICKEL, Jonathan. Laboratory-scale method for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass at high-solids loadings. *Biotechnology for biofuels*. 4, noviembre, 2009.
- [14] ZHU, Yongming, et al. Calculating sugar yields in high solids hydrolysis of biomass. *Bioresource Technology*. 2011, vol 102. pp 2897-2903.
- [15] MODENBACH, Alicia & NOKES, Sue. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings-a review. *Biomass and bioenergy*. 2013, vol 56. pp 526-544.
- [16] GENG, Wenhui, et al. Strategies to achieve high-solids enzymatic hydrolysis of dilute-acid pretreated corn stover. *Bioresource Technology*. 2015, vol 187. pp 43-48.
- [17] HAMELINCK, CN & VAN HOOIJDONK, G. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenergy*. 2005, vol 28. pp 384–410.
- [18] LEE, D et al. Composition of herbaceous biomass feedstocks. South Dakota State University Publication, SGINC1-07, Brookings, SD; Junio 2007.
- [19] DEMIRBAS, A. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *J Hazard Mater*. 2008, vol 157. pp 220–229.
- [20] HAMELINCK, CN & VAN HOOIJDONK, G. Op. cit., pp 384-410.
- [21] PIKE PW, SENGUPTA D & HERTWIG TA. Integrating biomass feedstocks into chemical production complexes using new and existing processes. Minerals Processing Research Institute, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, Noviembre 3; 2008.

- [22] ZHANG, YHP, HIMMEI ME & MIELENZ JR. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv.* 2006, vol 24. pp 452–481.
- [23] SUN, Y & CHENG J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol.* 2002, vol 83. pp 1–11.
- [24] SAHA BC. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2003, vol 30. pp 279–291.
- [25] MUSEO DE ARTE NACIONAL DE CATALUÑA. microscopía electrónica de rastreo SEM-EDX. [sitio web]. Cataluña. [Consulta: 23 abril 2014]. Disponible en: www.museonacional.cat/es.
- [26] LOPEZ, Álvaro y PIRATEQUE, Yadira. Bucaramanga. Universidad industrial de Santander. Facultad de Ingenierías fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Estudio del proceso de pretratamiento termomecánico continuo utilizando bazo de caña de azúcar impregnado con ácido sulfúrico diluido al 1% p/p en el reactor desarrollado por UIS-ECOPETROL. s.p.
- [27] ARIAS, Paola y PEREZ, Ingrid. Bucaramanga. Universidad industrial de Santander. Facultad de Ingenierías fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Estudio del efecto de la concentración de ácido sulfúrico diluido en las etapas de impregnación y pretratamiento termomecánico del proceso de producción de bioetanol a partir del bagazo de caña de azúcar. s.p.
- [28] NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. NREL/TP-510-42623. Colorado: 2006. 14 p.
- [29] NOVOZYMES. Advanced biofuels becoming reality with Novozymes' new enzyme technology. [sitio web]. [Consulta: 24 abril 2017]. Disponible en: <http://www.novozymes.com/en/news>.
- [30] THERMO SCIENTIFIC. Thermo Scientific Pierce protein assay technical handbook. Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards for BCA Assay, BCA Reducing Agent-Compatible Assay and Pierce 660 nm Assay.

- [31] NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Low Solids Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. NREL/TP-5100-63351. Colorado: 2015. 13 p.
- [32] NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. NREL/TP-510-42621. Colorado: 2008. 9 p.
- [33] NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of insoluble solids in pretreated biomass material. NREL/TP-510-42627. Colorado: 2008. 9 p.
- [34] GENG, Wenhui, et al. Op. Cit., pp 43-48.
- [35] CHEN, Xiaowen, et al. Improved ethanol yield and reduced minimum ethanol selling Price (MESP) by modifying low severity dilute acid pretreatment with deacetylation and mechanical refining: 1) Experimental. *Biotechnology for biofuels*. 2012, 5:60.
- [36] KRISTENSEN, Jan, FELBY, Claus & JORGENSEN, Hening. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology for biofuels*. 8, junio, 2009.
- [37] KRISTENSEN, Jan, FELBY, Claus & JORGENSEN, Hening. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology for biofuels*. 8, junio, 2009.
- [38] MODENBACH, Alicia & NOKES, Sue. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings-a review. *Biomass and bioenergy*. 2013, vol 56. pp 526-544.
- [39] GENG, Wenhui, et al. Op. Cit., pp 43-48.
- [40] CHEN, Xiaowen, et al. Improved ethanol yield and reduced minimum ethanol selling Price (MESP) by modifying low severity dilute acid pretreatment with deacetylation and mechanical refining: 1) Experimental. *Biotechnology for biofuels*. 2012, 5:60.
- [41] GENG, Wenhui, et al. Op. Cit., pp 43-48.

- [42] CHEN, Xiaowen, et al. Op cit. 5:60.
- [43] HODGE, David, et al. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresource technology*. 1, mayo, 2008. pp 8940-8948.
- [44] CHEN, Xiaowen, et al. Improved ethanol yield and reduced minimum ethanol selling Price (MESP) by modifying low severity dilute acid pretreatment with deacetylation and mechanical refining: 1) Experimental. *Biotechnology for biofuels*. 2012, 5:60.
- [45] CHEN, Xiaowen, et al. Op cit. 5:60.
- [46] CHEN, Xiaowen, et al. Op cit. 5:60.
- [47] CHEN, Xiaowen, et al. Op cit. 5:60. p 6.

BIBLIOGRAFÍA

ARIAS, Paola y PEREZ, Ingrid. Bucaramanga. Universidad industrial de Santander. Facultad de Ingenierías fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Estudio del efecto de la concentración de ácido sulfúrico diluido en las etapas de impregnación y pretratamiento termomecánico del proceso de producción de bioetanol a partir del bagazo de caña de azúcar. 2017. s.p.

BALAT, Mustafa. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy conversion and management*. 15, agosto, 2010, vol 52. pp 858-875.

CHEN, Xiaowen, et al. Improved ethanol yield and reduced minimum ethanol selling Price (MESP) by modifying low severity dilute acid pretreatment with deacetylation and mechanical refining: 1) Experimental. *Biotechnology for biofuels*. 2012, 5:60.

DEMIRBAS, A. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *J Hazard Mater*. 2008, vol 157. pp 220–229.

GENG, Wenhui, et al. Strategies to achieve high-solids enzymatic hydrolysis of dilute-acid pretreated corn stover. *Bioresource Technology*. 2015, vol 187. pp 43-48.

GOLDEMBERG J. Environmental and ecological dimensions of biofuels. En: Proceedings of the conference on the ecological dimensions of biofuels. Washington DC: March 10; 2008.

HAMELINCK, CN & VAN HOOIJDONK, G. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenergy*. 2005, vol 28. pp 384–410.

HATZIS, Christos, RILEY, Chyntia & PHILIPPIDIS, George. Detailed materia balance and etanol yield calculations for the biomass-to-ethanol conversion process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1996, vol. 57/58. pp 443-459.

HODGE, David, et al. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresource technology*. 1, mayo, 2008. pp 8940-8948.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA). Key world energy statistics 2008. Paris: OECD/IEA; 2008.

KRISTENSEN, Jan, FELBY Claus & JORGENSEN, Hening. Determining yields in high solids enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, vol. 156. pp 557-562.

KRISTENSEN, Jan, FELBY, Claus & JORGENSEN, Hening. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology for biofuels*. 8, junio, 2009.

LEE, D et al. Composition of herbaceous biomass feedstocks. South Dakota State University Publication, SGINC1-07, Brookings, SD; Junio 2007.

LOPEZ, Álvaro y PIRATEQUE, Yadira. Bucaramanga. Universidad industrial de Santander. Facultad de Ingenierías fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química.

Estudio del proceso de pretratamiento termomecánico continuo utilizando bazo de caña de azúcar impregnado con ácido sulfúrico diluido al 1% p/p en el reactor desarrollado por UIS-ECOPETROL. 2017. s.p.

METHER LC, SAGAR DV, NAIK SN. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renew Sustain Energy Rev* 2006;10:248–68.

MODENBACH, Alicia & NOKES, Sue. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings-a review. *Biomass and bioenergy*. 2013, vol 56. pp 526-544.

MOZIER, Nathan, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*. 30, junio, 2004. pp 673-686.

MUSEO DE ARTE NACIONAL DE CATALUÑA. Microscopía electrónica de rastreo SEM-EDX. [sitio web]. Cataluña. [Consulta: 23 abril 2014]. Disponible en: www.museonacional.cat/es.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of insoluble solids in pretreated biomass material. NREL/TP-510-42627. Colorado: 2008. 9 p.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. NREL/TP-510-42623. Colorado: 2006. 14 p.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. NREL/TP-510-42621. Colorado: 2008. 9 p.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Low Solids Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. NREL/TP-5100-63351. Colorado: 2015. 13 p.

NOVOZYMES. Advanced biofuels becoming reality with Novozymes' new enzyme technology. [sitio web]. [Consulta: 24 abril 2017]. Disponible en: <http://www.novozymes.com/en/news>.

PIKE PW, SENGUPTA D & HERTWIG TA. Integrating biomass feedstocks into chemical production complexes using new and existing processes. Minerals Processing Research Institute, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, Noviembre 3; 2008.

ROCHE, Christine, DIBBLE, Clare & STICKEL, Jonathan. Laboratory-scale method for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass at high-solids loadings. *Biotechnology for biofuels*. 4, noviembre, 2009.

SAHA BC. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2003, vol 30. pp 279–291.

SUN, Y & CHENG J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*. 2002, vol 83. pp 1–11.

THERMO SCIENTIFIC. Thermo Scientific Pierce protein assay technical handbook. Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards for BCA Assay, BCA Reducing Agent-Compatible Assay and Pierce 660 nm Assay.

VIVERO, José y PORRAS, Carmen. *Los biocombustibles y su impacto en la crisis alimentaria*. En: CASCANTE, K y SANCHEZ, A. *La crisis mundial de alimentos: alternativas para la toma de decisiones*. Madrid: Fundación alternativas, exilibris ediciones, 2008, p 29-51.

WORLD BUSINESS COUNCIL FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT (WBCSD). *Mobility 2030: meeting the challenges to sustainability. The sustainable mobility project*, Geneva, Switzerland; 2004.

ZHANG, YHP, HIMMEI ME & MIELENZ JR. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv.* 2006, vol 24. pp 452–481.

ZHU, Yongming, et al. Calculating sugar yields in high solids hydrolysis of biomass. *Bioresource Technology*. 2011, vol 102. pp 2897-2903.

ANEXOS

ANEXO A. DATOS DE CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA PRETRATADA

Tabla A1. Caracterización de biomasa pretratada

Biomasa pretratada	% Sólidos totales	% Sólidos insolubles	% de Glucan	% de Xilan	Concentraciones del licor [g/l]			
					Glucosa monomérica	Xilosa monomérica	Glucosa en oligómeros	Xilosa en oligómeros
2ka	47.23	41.15	50.12	15.00	1.05	16.85	0.80	11.24
3w	48.26	44.18	44.79	16.96	0.12	3.36	2.06	12.93
3f	57.05	50.47	47.31	11.75	0.56	20.82	4.20	24.28
3za	61.65	52.86	46.00	12.39	1.71	28.92	10.28	59.94
3zb	48.26	43.58	50.00	11.52	0.81	8.16	5.16	37.21
3x	52.43	48.27	51.59	12.01	0.98	18.08	5.76	42.68
3y	70.32	60.79	51.39	11.09	2.38	20.72	13.94	86.05

ANEXO B. PROCEDIMIENTO DETALLADO DE CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA

Determinación de sólidos totales.

- Se pesan tres cajas de Petri.
- Se pesan 0.5 g de biomasa en cada caja de Petri por triplicado.
- Se introduce las muestras en un horno a 105°C mínimo 4 horas.
- Se saca muestras y se dejan enfriar a temperatura ambiente.
- Se pesan las muestras secas.

Cálculos:

$$\% \text{ Sólidos totales} = \frac{(\text{Peso}_{\text{caja petri+biomasa seca}} - \text{Peso}_{\text{caja petri}})}{\text{Peso}_{\text{biomasa húmeda}}} * 100 \quad (1)$$

Determinación de sólidos insolubles.

- Se pesan tubos Falcon de 50 ml por triplicado.
- Se pesan 6 g se *slurry* en cada tubo Falcon y 30 ml de agua.
- Se agita vigorosamente.
- Se centrifuga a 4°C y 9000 rpm durante 20 min.
- Se extrae el licor de la biomasa con una pipeta de 10 ml y se recoge en un falcon de 50 ml.
- Se adiciona agua destilada a los sólidos residuales hasta completar $\frac{3}{4}$ de la botella. Se centrifuga a 4°C y 9000 rpm durante 20 min. Se toma alícuota del licor lavado y se analiza por HPLC.
- Se repite el paso anterior hasta que la concentración de glucosa sea menor a 0.05 g/l.
- Se introduce el tubo Falcon en horno a 105°C mínimo 4 horas.
- Se saca tubo Falcon y se deja enfriar a temperatura ambiente.
- Se pesa el tubo Falcon con la biomasa seca.

Cálculos:

% Sólidos insolubles en el slurry

$$= \frac{\text{Peso seco}_{\text{tubo Falcon}+\text{biomasa seca}}}{(\text{Peso húmedo}_{\text{tubo falcon}+\text{biomasa húmeda}} - \text{Peso}_{\text{tubo Falcon}})} * 100 \quad (2)$$

$$\% \text{ Sólidos insolubles totales} = \frac{\% \text{ Sólidos totales}}{\% \text{ Sólidos insolubles en el slurry}} * 100 \quad (3)$$

Caracterización del licor de pretratamiento.

Monómeros.

- Se toma alícuota del licor extraído en el procedimiento anterior, se vierte en vial de 1.5 ml para HPLC, se rotula y se analiza por HPLC para determinar la concentración de monómeros en el licor.

Oligómeros y estándares de verificación y recuperación de azúcares.

- Se preparan estándares de verificación de azúcares SVS y estándares de recuperación de azúcares SRS, para esto se calculan las cantidades de glucosa xilosa y arabinosa de siguiente forma:

$$\text{Azúcar } i = \frac{0.5g}{l} * V_b \quad (4)$$

Donde V_b es el volumen del balón aforado en litros, se recomienda balones de 0.025 l.

- Se pesan las cantidades calculadas.
- Se agrega agua destilada hasta completar el aforo del balón aforado.
- Se homogeniza la solución en ultrasonido por 15 minutos.
- Se vierte 1.5 ml en vial para HPLC y se analiza para SVS.

- Se realiza hidrólisis ácida, para esto es necesario que el licor tenga una concentración del 4% p/p de ácido, para ello se agrega una cantidad específica de ácido sulfúrico al 72% dependiendo del volumen de la alícuota que se tome.
- Se determina el pH de los licores extraídos y de los estándares de recuperación previamente preparados.
- Se toma alícuota de 20 ml de los licores y de los SRS y se calcula la cantidad de ácido a adicionar de acuerdo a la tabla B1.

Tabla B1. Relación de ácido al 72% a adicionar de acuerdo al pH y volumen de alícuota.

Appendix 1

pH		Vol. of liquor (mL)		Vol. of liquor (mL)		Vol. of liquor (mL)		Vol. of liquor (mL)		Vol. of liquor (mL)		Vol. of liquor (mL)		Vol. of liquor (mL)		Vol. of liquor (mL)																							
		5.00	10.00	10.00	20.00	5.00	10.00	10.00	20.00	5.00	10.00	10.00	20.00	5.00	10.00	10.00	20.00	5.00	10.00	10.00	20.00																		
0.01	*	*	*	0.50	108	217	433	1.0	153	307	614	1.50	168	335	671	2.0	172	344	689	2.50	174	347	694	3.00	174	348	696	3.50	174	348	697	4.00	174	349	697	4.50	174	349	697
0.02	*	*	*	0.52	111	223	445	1.02	154	308	616	1.51	168	336	671	2.01	172	344	689	2.51	174	347	695	3.01	174	348	696	3.51	174	348	697	4.01	174	348	697	4.51	174	349	697
0.03	*	*	*	0.53	112	226	451	1.03	155	310	619	1.53	169	339	674	2.03	173	345	690	2.53	174	347	695	3.03	174	348	696	3.53	174	348	697	4.03	174	349	697	4.53	174	349	697
0.04	*	*	*	0.54	114	228	457	1.04	155	311	621	1.54	169	337	673	2.04	173	345	690	2.54	174	347	695	3.04	174	348	696	3.54	174	348	697	4.04	174	349	697	4.54	174	349	697
0.05	*	*	*	0.55	116	231	462	1.05	156	311	623	1.55	169	337	674	2.05	173	345	690	2.55	174	347	695	3.05	174	348	696	3.55	174	348	697	4.05	174	349	697	4.55	174	349	697
0.06	*	*	*	0.56	117	234	467	1.06	156	312	624	1.56	169	337	674	2.06	173	345	690	2.56	174	347	695	3.06	174	348	696	3.56	174	348	697	4.06	174	349	697	4.56	174	349	697
0.07	*	*	*	0.57	118	236	473	1.07	157	313	626	1.57	169	337	675	2.07	173	345	690	2.57	174	347	695	3.07	174	348	696	3.57	174	348	697	4.07	174	349	697	4.57	174	349	697
0.08	1	2	4	0.58	119	239	478	1.08	157	314	628	1.58	169	338	675	2.08	173	345	690	2.58	174	347	695	3.08	174	348	696	3.58	174	348	697	4.08	174	349	697	4.58	174	349	697
0.09	5	10	19	0.59	121	241	483	1.09	157	315	629	1.59	169	338	676	2.09	173	345	690	2.59	174	347	695	3.09	174	348	696	3.59	174	348	697	4.09	174	349	697	4.59	174	349	697
0.10	9	17	35	0.60	122	244	488	1.10	159	315	631	1.60	169	338	676	2.10	173	345	690	2.60	174	347	695	3.10	174	348	696	3.60	174	348	697	4.10	174	349	697	4.60	174	349	697
0.11	12	25	50	0.61	123	246	492	1.11	159	316	632	1.61	169	338	677	2.11	173	345	691	2.61	174	347	695	3.11	174	348	696	3.61	174	348	697	4.11	174	349	697	4.61	174	349	697
0.12	16	32	65	0.62	124	249	497	1.12	159	317	634	1.62	169	339	677	2.12	173	345	691	2.62	174	347	695	3.12	174	348	696	3.62	174	348	697	4.12	174	349	697	4.62	174	349	697
0.13	20	39	79	0.63	125	251	502	1.13	159	318	635	1.63	169	339	678	2.13	173	345	691	2.63	174	347	695	3.13	174	348	696	3.63	174	348	697	4.13	174	349	697	4.63	174	349	697
0.14	23	47	93	0.64	127	253	506	1.14	159	318	637	1.64	169	339	678	2.14	173	345	691	2.64	174	347	695	3.14	174	348	696	3.64	174	348	697	4.14	174	349	697	4.64	174	349	697
0.15	27	53	107	0.65	128	255	510	1.15	160	319	638	1.65	170	339	678	2.15	173	346	691	2.65	174	348	695	3.15	174	348	697	3.65	174	348	697	4.15	174	349	697	4.65	174	349	697
0.16	30	60	120	0.65	128	257	516	1.16	160	320	639	1.66	170	339	679	2.16	173	346	691	2.66	174	348	695	3.16	174	348	697	3.66	174	348	697	4.16	174	349	697	4.66	174	349	697
0.17	33	67	133	0.67	130	259	519	1.17	160	320	641	1.67	170	340	679	2.17	173	346	691	2.67	174	348	695	3.17	174	348	697	3.67	174	348	697	4.17	174	349	697	4.67	174	349	697
0.18	37	73	146	0.68	131	261	523	1.18	161	321	642	1.68	170	340	680	2.18	173	346	692	2.68	174	348	695	3.18	174	348	697	3.68	174	348	697	4.18	174	349	697	4.68	174	349	697
0.19	40	79	159	0.69	132	263	527	1.19	161	322	643	1.69	170	340	680	2.19	173	346	692	2.69	174	348	695	3.19	174	348	697	3.69	174	348	697	4.19	174	349	697	4.69	174	349	697
0.20	43	86	171	0.70	133	265	531	1.20	161	322	644	1.70	170	340	680	2.20	173	346	692	2.70	174	348	695	3.20	174	348	697	3.70	174	348	697	4.20	174	349	697	4.70	174	349	697
0.21	46	91	183	0.71	134	267	535	1.21	161	323	646	1.71	170	340	681	2.21	173	346	692	2.71	174	348	695	3.21	174	348	697	3.71	174	348	697	4.21	174	349	697	4.71	174	349	697
0.22	49	97	195	0.72	135	269	538	1.22	162	323	647	1.72	170	341	681	2.22	173	346	692	2.72	174	348	695	3.22	174	348	697	3.72	174	348	697	4.22	174	349	697	4.72	174	349	697
0.23	52	103	206	0.73	136	271	542	1.23	162	324	648	1.73	170	341	682	2.23	173	346	692	2.73	174	348	695	3.23	174	348	697	3.73	174	348	697	4.23	174	349	697	4.73	174	349	697
0.24	54	109	217	0.74	136	273	545	1.24	162	325	649	1.74	170	341	682	2.24	173	346	692	2.74	174	348	695	3.24	174	348	697	3.74	174	348	697	4.24	174	349	697	4.74	174	349	697
0.25	57	114	228	0.75	137	274	549	1.25	163	325	650	1.75	171	341	682	2.25	173	346	692	2.75	174	348	695	3.25	174	348	697	3.75	174	348	697	4.25	174	349	697	4.75	174	349	697
0.26	60	119	239	0.76	137	276	552	1.26	163	326	651	1.76	171	341	683	2.26	173	346	693	2.76	174	348	695	3.26	174	348	697	3.76	174	348	697	4.26	174	349	697	4.76	174	349	697
0.27	62	125	249	0.77	139	278	556	1.27	163	326	652	1.77	171	341	683	2.27	173	346	693	2.77	174	348	695	3.27	174	348	697	3.77	174	348	697	4.27	174	349	697	4.77	174	349	697
0.28	65	130	260	0.78	140	279	559	1.28	163	327	653	1.78	171	342	683	2.28	173	346	693	2.78	174	348	695	3.28	174	348	697	3.78	174	348	697	4.28	174	349	697	4.78	174	349	697
0.29	67	135	269	0.79	140	281	562	1.29	164	327	654	1.79	171	342	684	2.29	173	346	693	2.79	174	348	695	3.29	174	348	697	3.79	174	348	697	4.29	174	349	697	4.79	174	349	697
0.30	70	140	279	0.80	141	282	565	1.30	164	328	655	1.80	171	342	684	2.30	173	346	693	2.80	174	348	695	3.30	174	348	697	3.80	174	348	697	4.30	174	349	697	4.80	174	349	697
0.31	72	144	289	0.81	142	284	568	1.31	164	328	656	1.81	171	342	684	2.31	173	346	693	2.81	174	348	695	3.31	174	348	697	3.81	174	348	697	4.31	174	349	697	4.81	174	349	697
0.32	75	149	298	0.82	143	285	571	1.32	164	329	657	1.82	171																										

- Se vierte el contenido de las botellas en tubos Falcon de 50 ml.
- Se mide el pH a cada muestra con tiras de papel indicador de pH.
- Se adiciona carbonato de calcio hasta que el pH se encuentre entre 5 y 6. Esto se hace adicionando cantidades pequeñas de carbonato de calcio y agitando con las varillas de vidrio. Al medir el pH, verificar que la espuma se disperse.
- Se centrifuga a 4°C y 9000 rpm por 20 min.
- Se vierte el sobrenadante en tubos Falcon de 15 ml y se centrifuga nuevamente.
- Se toma alícuota de 750 ul con micropipeta, se vierte en vial para HPLC y se analiza.

Calcular la dilución para monómeros y oligómeros para determinar las concentraciones reales de los azúcares.

$$D = (P_l + P_a) / P_l \quad (5)$$

Donde D es la dilución para monómeros y oligómeros, P_l es el peso del licor contenido en la biomasa y se calcula de la siguiente manera:

$$P_l = \text{Peso biomasa húmeda} - \text{Peso biomasa húmeda} \left(\frac{\% \text{solidos insolubles}}{100} \right) \quad (6)$$

P_a es el peso de agua adicionada.

Caracterización de sólidos insolubles.

PREPARACIÓN DE LA BIOMASA PARA CARACTERIZACIÓN.

- Homogeneizar la biomasa previamente secada en la determinación de sólidos insolubles y pesar 0,7 g de cada muestra en diferentes botellas de vidrio.
- Tomar muestras de biomasa en crisoles y dejarlos en el horno por 24 horas para calcular porcentaje de sólidos totales.

$$\% \text{ Sólidos totales} = \frac{\text{Peso biomasa seca}}{\text{Peso biomasa húmeda}} \times 100 \quad (7)$$

- Pasar los crisoles a la mufla para calcular porcentaje de cenizas estructurales.

$$\% \text{ Cenizas estructurales} = \frac{\text{Peso cenizas}}{\text{Peso biomasa seca}} \times 100 \quad (8)$$

- Si utiliza una mufla de rampa programable:
 - Rampa de temperatura ambiente a 105°C
 - Mantener a 105°C durante 12 minutos
 - Rampa hasta 250°C de 10°C/minuto
 - Mantener a 250°C por 30 minutos
 - Rampa hasta 575°C de 20°C/minuto
 - Mantener a 575°C durante 180 minutos
 - Bajar la temperatura hasta 105°C y mantener en esta temperatura hasta que las muestras sean retiradas.
- Si usa mufla no programable: Colocar los crisoles en el horno a $575 \pm 25^\circ\text{C}$ durante 24 ± 6 horas.

Se preparan estándares de verificación y recuperación de azúcares exactamente igual que en el procedimiento de caracterización de licores.

HIDRÓLISIS ÁCIDA PARA LA BIOMASA PRETRATADA:

- Agregar 7 ml de ácido sulfúrico al 72% a cada botella con su respectiva biomasa.
- Introducir cada botella a la que se le ha agregado ácido en el baño maría a 30°C por una hora con agitación cada cinco minutos.
- Agregar 196 ml de agua a cada botella.
- Se realiza la hidrólisis ácida tal como se hizo en la caracterización de oligómeros en el licor, se sellan las botellas de la misma forma y se autoclavan por 1 hora a 121°C.
- Cuando termine este proceso se retiran las botellas y se dejan enfriar a temperatura ambiente.

SEPARACIÓN SÓLIDO LÍQUIDO.

- Realiza el montaje de la figura B1. Conectar la trampa de la bomba de vacío con la salida inferior del condensador y conectar la salida superior del condensador con la salida lateral del Erlenmeyer. Seguido de esto se acondiciona el embudo de porcelana en la parte superior de Erlenmeyer, garantizando que haya un sello entre los dos instrumentos para formar vacío.

Figura B1. Montaje de la separación sólido líquido por filtración



- Humectar el papel filtro con agua destilada para acomodarlo en el embudo de porcelana, para este procedimiento, se debe tener especial cuidado asegurando que el papel quede adherido al embudo evitando que los sólidos pasen por las paredes.
- Homogenizar cuidadosamente por medio de agitación la solución a filtrar y agregar poco a poco (una cantidad suficiente de licor de las botellas que permita purgar el Erlenmeyer) al embudo para que el nivel de solución no sobrepase el papel filtro. Purgar y desechar la solución utilizada.
- Filtrar la solución.
- Adicionar la solución filtrada a un recipiente previamente purgado.
- Si la solución filtrada se utiliza al día siguiente, ésta debe ser refrigerada. Si se utiliza en un lapso superior, debe ser congelada. Nota: Las muestras no deben almacenarse más de 15 días, dado que pierden la confiabilidad de las variables medibles.
- Lavar varias veces el residuo sólido y poner las muestras en el horno a 105°C por 12 horas.
- Pesar el residuo sólido seco para calcular porcentaje de biomasa residual.
$$\%Biomasa\ residual = \frac{(Peso\ biomasa\ residual + peso\ crisol + peso\ filtro) - peso\ crisol - peso\ filtro}{Peso\ biomasa\ seca} \times 100 \quad (9)$$
- Pasar las muestras a mufla y calcular el porcentaje de cenizas insolubles en ácido y la lignina insoluble en ácido.

$$\% \text{Cenizas insolubles en ácido} = \frac{(\text{Peso cenizas} + \text{peso filtro} + \text{peso crisol}) - \text{Peso filtro} - \text{peso crisol}}{\text{Peso biomasa seca}} \times 100 \quad (10)$$

$$\% \text{Lignina insoluble en ácido} = \% \text{ biomasa residual} - \% \text{ cenizas insolubles en ácido} \quad (11)$$

- De acuerdo al tipo de mufla seguir los procedimientos de rampa programable o normal.

Análisis del licor.

- Determinar la absorbancia del licor filtrado con el espectrofotómetro pharo 300 Merck y registrar los valores encontrados para determinar el porcentaje de lignina soluble en ácido.

$$\% \text{Lignina soluble en ácido} = \frac{UV_{abs} \times V_{lf} \times D}{\varepsilon \times P \times L} \times 100 \quad (11)$$

Donde:

UV_{abs} es la medida de la absorbancia UV-Visible para la muestra a la longitud de onda apropiada (ver cuadro B2).

V_{lf} es el volumen del licor filtrado.

D es la dilución, la cual se calcula de la siguiente manera:

$$D = \frac{\text{Volumen de la muestra} + \text{Volumen solvente}}{\text{Volumen de la muestra}} \quad (12)$$

ε es la absortividad de la biomasa a la longitud de onda específica

P es el peso de la muestra

L es la longitud de la trayectoria de UV-visible de la celda

Tabla B2. Constantes de absorbancia para medir lignina soluble en ácido para diferentes tipos de biomasa.

Biomass type	Lambda max (nm)	Absorptivity at lambda max (L/g cm)	Recommended wavelength (nm)	Absorptivity at recommended wavelength (L/g cm)
Pinus Radiata- NIST SRM 8493	198	25	240	12
Bagasse- NIST SRM 8491	198	40	240	25
Corn Stover- NREL supplied feedstock	198	55	320	30
Populus deltoides- NIST SRM 8492	197	60	240	25

NEUTRALIZACIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS.

- Trasvasar las muestras de las botellas a tubos Falcon de 50 mL
- Medir el pH a cada muestra con tiras de pH.
- Agregar Carbonato de Calcio hasta que el pH se encuentre entre 5 y 6. Esto se hace adicionando cantidades pequeñas de Carbonato de Calcio y agitando con las varillas de vidrio. Al medir el pH, verificar que la espuma se disperse.
- Centrifugar las muestras en los tubos Falcon por 20 minutos a 9000 rpm y 4°C.
- Pasar el sobrenadante de las muestras a otros tubos Falcon de 15 mL y medir el pH final.
- Congelar las muestras durante la noche.
- Centrifugar las muestras en cuanto se sacan del congelador.
- Trasvasar el sobrenadante a otro tubo Falcon de 15 mL, dejando aproximadamente de 1 a 2 mL como precipitado de neutralización.
- Congelar la solución obtenida en los tubos Falcon durante 2 horas y centrifugar nuevamente.
- Pasar una cantidad pequeña de cada solución a un vial para HPLC.
- Rotular cada vial.
- Realizar análisis por HPLC.

ANEXO C. CONSTRUCCIÓN CURVAS DE CALIBRACIÓN EN HPLC

Preparación para azúcares:

Cálculo de las cantidades de azúcares (Xilosa, Arabinosa y Glucosa) necesarias para preparar las curvas de calibración.

- Se toma 24.0 mg/mL como valor sugerido del rango de concentraciones de azúcares de la tabla C1 para Xilosa, Arabinosa y Glucosa. Si es necesario preparar curvas para concentraciones menores o mayores, se toma la concentración requerida y se sigue el mismo procedimiento.
- Calcular las cantidades de azúcares necesarias para preparar la curva de calibración de la siguiente manera:

$$\text{Azúcar } i = \frac{24 \text{ mg}}{\text{ml}} * V_b \text{ (13)}$$

Donde V_b es el volumen del balón aforado.

Tabla C1. Rangos de concentración sugeridos para los estándares de calibración.

Component	Suggested concentration range (mg/ml)
D-cellobiose	1.2 – 24.0
D(+)-glucose	1.2 – 24.0
D(+)-xylose	1.2 – 24.0
D(+)-galactose	1.2 – 24.0
L(+)-arabinose	1.2 – 24.0
D(+)-mannose	1.2 – 24.0
CVS	Middle of linear range, concentration not equal to a calibration point (12.0 suggested)

Preparación de soluciones para curvas de calibración:

- Pesar cada una de las cantidades calculadas de azúcares en un balón aforado de 25 ml por triplicado.
- Agregar la cantidad suficiente de agua tipo 1 para homogeneizar.

- Aforar con agua tipo 1 la solución una vez esté homogénea.
- Llevar el balón aforado a ultrasonido por 15 min.

Dilución de los azúcares preparados:

- Trasvasar de cada balón aforado la solución a tubos Falcon de 15 ml los cuales
- Rotular 6 viales por cada solución estándar preparada de la siguiente manera: CCA-a, dilución para las curvas de calibración de azúcares. Las letras minúsculas indican las réplicas (a,b,c). Todas las soluciones preparadas se diluyen con agua tipo 1 a 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.7 y 1.0 % v/v.

Preparación de las disoluciones:

- Poner un vial de 1.5 ml (limpio, seco y rotulado) en la balanza y tarar.
- Tomar con una pipeta, las siguientes cantidades de la solución preparada disponible en los tubos Falcon, para cada disolución: para las disoluciones de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.7 y 1.0, tomar 50, 100, 250, 500, 700 y 1000 μL , respectivamente.
- Adicionar la cantidad tomada al vial. Registrar el peso de la muestra y tarar.
- Adicionar agua tipo 1 hasta alcanzar un valor de 1000 μL , dependiendo de la disolución, es decir, para las disoluciones de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.7 y 1.0 agregar 50, 900, 750, 500, 300 y 0 μL de agua tipo 1. Registrar el peso del agua.

Determinación de densidades:

- Tarar el peso de balones aforados de 5 ml en la balanza y tarar.
- Aforar el balón con la solución a la que se le quiere determinar la densidad.
- Registrar el peso de la solución.
- Determinar la densidad de la solución de la siguiente manera:

$$\rho = m_R / V_b \quad (14)$$

Donde m_R es la masa registrada de la solución en gramos (g) y V_b es el volumen del balón en mL.

Preparación para productos de degradación:

Preparación de solución con ácidos:

Cálculo de las cantidades de los patrones necesarios para preparar las curvas de calibración:

- Tomar los valores máximos de concentración sugeridos para Ácido Succínico, Ácido Láctico, Glicerol, Ácido Acético y Etanol. Estas concentraciones se encuentran en la tabla C2. Si es necesario preparar curvas para concentraciones menores o mayores, se toma la concentración requerida y se sigue el mismo procedimiento.
- Calcular las cantidades de los patrones necesarios para preparar la curva de calibración de la siguiente manera:

$$\text{Patrón requerido} = C_s * V_b \text{ (15)}$$

Donde V_b es el volumen del balón aforado en mL y C_s es la concentración sugerida de los patrones en mg/mL.

Tabla C2. Concentración sugerida para productos de degradación

Component	Approximate Retention time (min)	Suggested concentration range (mg/ml)
Xylitol	11.6	0.2 – 6.0
Succinic acid	12.0	0.2 – 10.0
L-Lactic acid	13.2	0.2 – 12.0
Glycerol	14.2	0.2 – 8.0
Acetic acid	15.5	0.2 – 12.0
Ethanol	22.7	1.0 - 15.0
HMF	29.4	0.02 – 5.0
Furfural	42.8	0.02 - 5.0
CVS	-	Middle of linear range

- Agregar agua tipo 1 a un balón de 25 mL hasta llenar el fondo del mismo, por triplicado.
- Poner el balón en una balanza y tarar.

- Agregar cuidadosamente cada uno de los patrones en las cantidades previamente calculadas.
- Aforar con agua tipo 1.
- Poner el balón en el ultrasonido durante 15 minutos.

Dilución de los productos de degradación:

- Trasvasar de cada balón aforado la solución a tubos Falcon, los cuales deben ser marcados de la siguiente manera:
- Rotular 6 viales por cada solución estándar preparada de la siguiente manera: CCD-a dilución: para las Curvas de Calibración de productos de Degradación. Las letras minúsculas indican las réplicas (a,b,c). Todas las soluciones preparadas se diluyen a 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.7 y 1.0.

La preparación de las disoluciones y cálculo de densidades se hace de la misma forma que los azúcares.

Preparación de solución con Furfural:

Cálculo de la cantidad de Furfural necesario para preparar las curvas de calibración:

- Tomar el valor máximo de concentración sugeridos para Furfural. Estas concentraciones se encuentran en la tabla C2. Si es necesario preparar curvas para concentraciones menores o mayores, se toma la concentración requerida y se sigue el mismo procedimiento.
- Calcular la cantidad de Furfural necesario para preparar la curva de calibración de la siguiente manera:

$$\text{Patrón requerido} = C_s * V_b \text{ (16)}$$

Donde V_b es el volumen del balón aforado en mL y C_s es la concentración sugerida de los patrones en mg/mL.

- Se diluye acetonitrilo en agua 65% p/p.
- Poner un balón aforado de 25 ml en una balanza y tarar, por triplicado.

- Agregar cuidadosamente el Furfural en la cantidad previamente calculada.
- Aforar con agua el acetonitrilo diluido.
- Poner el balón en el ultrasonido durante 15 minutos.

La preparación de las disoluciones y cálculo de densidades se hace de la misma forma que los azúcares y los productos de degradación.

ANEXO D. PREPARACIÓN CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICACIÓN DE PROTEINA

Para la construcción de la curva de calibración se sigue el procedimiento:

- Se diluye el contenido de una ampolla de 1 ml de estándar de albúmina de suero bobino *BSA* en inglés en agua como indica la tabla D1.

Tabla D1. Diluciones del contenido de estándar de albúmina de suero de bobino *BSA*.

Vial	Volume of Diluent	Volume and Source of BSA	Final BSA Concentration
A	0	300 μ l of stock	2,000 μ g/ml
B	125 μ l	375 μ l of stock	1,500 μ g/ml
C	325 μ l	325 μ l of stock	1,000 μ g/ml
D	175 μ l	175 μ l of vial B dilution	750 μ g/ml
E	325 μ l	325 μ l of vial C dilution	500 μ g/ml
F	325 μ l	325 μ l of vial E dilution	250 μ g/ml
G	325 μ l	325 μ l of vial F dilution	125 μ g/ml
H	400 μ l	100 μ l of vial G dilution	25 μ g/ml
I	400 μ l	0	0 μ g/ml = Blank

- Se diluye otra ampolla a la mitad de los volúmenes mostrados en la tabla D1 para réplicas de dilución.
- Se mide la absorbancia de cada dilución en un espectrofotómetro UV-VIS con longitud de onda 660 nm.
- Se construye la curva de calibración de concentración de proteína en función de la absorbancia de acuerdo al ensayo de proteínas *BSA*.

ANEXO E. CÁLCULOS PARA PREPARACIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

CÁLCULO DE PORCENTAJE DE SÓLIDOS EN LA BIOMASA.

Se determinan los sólidos totales en la biomasa neutralizada (BN), este paso es importante porque después de neutralizar la biomasa esta se ha diluido. Este proceso se realiza de la misma forma que el mostrado en el anexo B.

$$\% \text{ Sólidos totales BN} = \frac{(\text{Peso}_{\text{Caja petri+biomasa seca}} - \text{Peso}_{\text{Caja petri}})}{\text{Peso}_{\text{biomasa húmeda}}} * 100 \quad (17)$$

La relación entre sólidos totales en insolubles se conserva por lo tanto:

$$\begin{aligned} \% \text{ Sólidos insolubles BN} \\ = \frac{\% \text{ Sólidos totales BN} * \% \text{ Sólidos insolubles totales BN}}{100} \end{aligned} \quad (18)$$

CÁLCULO DE ADICIONES EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA (HE).

$$\% \text{ Sólidos totales HE} = \frac{\% \text{ Sólidos insolubles HE}}{\% \text{ Sólidos insolubles totales BN}} * 100 \quad (19)$$

$$\text{Peso de sólidos totales HE} = \text{Peso total slurry HE} * \frac{\% \text{ Sólidos totales HE}}{100} \quad (20)$$

$$\begin{aligned} \text{Peso de sólidos insolubles HE} \\ = \text{Peso total Slurry HE} * \frac{\% \text{ Sólidos insolubles HE}}{100} \end{aligned} \quad (21)$$

$$\text{Peso de BN a adicionar} = \frac{\text{Peso de sólidos totales HE}}{\frac{\% \text{ Sólidos totales BN}}{100}} \quad (22)$$

$$\begin{aligned} \text{Gramos de glucan en los sólidos insolubles} \\ = \frac{\% \text{ Glucano BN} * \text{Peso de sólidos insolubles HE}}{100} \end{aligned} \quad (23)$$

$$\begin{aligned} \text{Volumen enzima} \\ = \left(\frac{20}{\text{Concentración enzima diluida}} \right) \\ * \text{Gramos de glucan en los sólidos insolubles} \end{aligned} \quad (24)$$

$$\text{Peso enzima} = \text{Volumen enzima} * \text{Densidad enzima} \quad (25)$$

$$\text{Peso de Buffer} = \text{Peso total slurry HE} - \text{Peso de BN a adicionar} - \text{Peso enzima} \quad (26)$$

ANEXO F. PROCEDIMIENTO DETALLADO DE CALCULOS DE RENDIMIENTOS

El rendimiento de azúcares en la hidrólisis enzimática en determinado tiempo está dado por la ecuación:

$$Y_T = \frac{Ci_T * \frac{V_T}{1000} + (\sum_{t=0}^{T-1} giextraidos_t) - gi_{t_0}}{gi_{t_0} + gOi_{t_0} - \sum_{t=0}^{T-1} gOextraidos_t} \quad (27)$$

El rendimiento de determinado azúcar en el tiempo t es igual la masa de azúcar monomérica final sobre la masa de azúcar oligomérica inicial. La toma de alícuotas cada 24 horas desde el tiempo cero y la evaporación de masa crea la necesidad de tener en cuenta la masa de azúcar monomérica y oligomérica que se ha extraído y evaporado en cada tiempo, es por eso que se debe incluir en la ecuación de rendimiento la masa de azúcar monomérica que reaccionó y azúcar oligomérica que no reaccionó. A continuación se describe cada término de la ecuación de rendimiento y cómo determinarlo.

- Sea Ci_T la concentración final de azúcar i monomérica en el tiempo T medida por HPLC.
- Sea V_T el volumen de licor en el slurry al tiempo T, dado por la ecuación:

$$V_T = \frac{W_T - gSI_T}{\rho_T} \quad (28)$$

- Donde W_T es el peso del slurry en el tiempo T, ρ_T la densidad del licor en el tiempo T y gSI_T los gramos de sólidos insolubles totales en el tiempo T, calculados como:

$$gSI_T = \frac{W_T * \%SI}{100} \quad (29)$$

- Donde $\%SI$ es el porcentaje de sólidos insolubles en el tiempo T.

- Sea $gi_{extraidos_t}$ los gramos de azúcar i extraídos en el tiempo t , dado por la ecuación:

$$gi_{extraidos_t} = \frac{Ci_t * Ve_t}{1000} \quad (30)$$

- Donde Ci_t es la concentración de azúcar i en el tiempo t y Ve_t el volumen extraído en el tiempo t dado por la ecuación:

$$Ve_t = \frac{We_t - gSI_{e_t}}{\rho_t} \quad (31)$$

- Donde We_t es el peso extraído en el tiempo t , gSI_{e_t} los gramos de sólidos insolubles extraídos en el tiempo t y ρ_t la densidad del licor extraído en el tiempo t .
- Sea gi_{t_0} los gramos de azúcar i en el tiempo inicial t_0 , dado por la ecuación:

$$gi_{t_0} = (Ci_{t_0} * Vl_{t_0})/1000 \quad (32)$$

- Donde Ci_{t_0} es la concentración de azúcar i en el tiempo inicial t_0 y Vl_{t_0} es el volumen de licor en el tiempo t_0 .
- Sea giI_{t_0} los gramos de azúcar i insoluble en el tiempo t_0 , dado por la ecuación:

$$giI_{t_0} = \varphi_i * gSI_{t_0} * \frac{\%OligómeroSI}{100} \quad (33)$$

- Donde φ_i es la relación de peso molecular monómero/oligómero, gSI_{t_0} los gramos de sólidos insolubles en el tiempo inicial t_0 , y $\%OligómeroSI$ el porcentaje de oligómero en la caracterización de sólidos insolubles.
- Sea gOi_{t_0} los gramos de oligómero de azúcar i en el tiempo inicial t_0 , dado por la ecuación:

$$gOi_{t_0} = (gOi_{t_0-1} * (W_{t_0} - gSI_{t_0})) / (W_{t_0-1} - gSI_{t_0}) \quad (34)$$

- Donde gOi_{t_0-1} son los gramos de oligómero de azúcar i en el momento antes de alícuota inicial t_0-1 , W_{t_0} es el peso de slurry en el tiempo t_0 , W_{t_0-1} el peso de slurry antes de alícuota inicial en el tiempo t_0-1 .

- $gO_{i_{t_0-1}}$ está definido por la ecuación:

$$gO_{i_{t_0-1}} = \frac{CO_{i_{t_0}} * (W_{BN} - gSI_{t_0})}{1000} \quad (35)$$

- Donde $CO_{i_{t_0}}$ es la concentración de oligómeros del azúcar i en el tiempo inicial t_0 y W_{BN} es el peso de biomasa neutralizada adicionada a la hidrólisis.
- Sea $gO_{i_{extraidos}_t}$ son los gramos de oligómeros de azúcar i extraídos en el tiempo t, dado por la ecuación:

$$gO_{i_{extraidos}_t} = \varphi_i * gSI_t * \frac{\%OligómeroSI}{100} \quad (36)$$

- Donde gSI_t son los gramos de sólidos insolubles en el tiempo t.