

**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE  
CÁSCARA DE CACAO PRETRATADO, POR MEDIO DE SIMULACIÓN, PARA  
LA PRODUCCIÓN DE JARABES GLUCOSIDADOS**

**DAVID GILDARDO MARTÍNEZ ÁLVAREZ  
YESICA ALEJANDRA SÁNCHEZ PINZÓN**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2021**

**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE  
CÁSCARA DE CACAO PRETRATADO, POR MEDIO DE SIMULACIÓN, PARA  
LA PRODUCCIÓN DE JARABES GLUCOSIDADOS**

**DAVID GILDARDO MARTÍNEZ ÁLVAREZ  
YESICA ALEJANDRA SÁNCHEZ PINZÓN**

**Trabajo de grado para optar el título de Ingeniero Químico**

**Director:**

**LUIS GUILLERMO RUEDA SERRANO  
Magíster Ingeniería Química**

**Codirector**

**LUIS JAVIER LÓPEZ GIRALDO  
Doctor en Química Bioquímica y Ciencia de Alimentos**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2021**

## DEDICATORIA

*Este sueño fue logrado gracias a la diligencia y esfuerzo de mi mamá Ana Rosa.*

*A mi hermano Danilo que siempre estaba presente.*

*A la Doctora Irina y el Doctor Castillo por su apoyo incondicional.*

*Al ánimo y felicidad que me brindaban mis amigos Ivo, Andrés, Daniel y William.*

*A ti Andrea por estar en este proceso.*

*A la labor pedagógica de mis profesores UIS y profesionales.*

*Gracias.*

*David Gildardo Martínez Álvarez*

## DEDICATORIA

*Este trabajo es el resultado de varios años de dedicación y mucho esfuerzo, quiero expresar mi gratitud principalmente a Dios, quien con su bendición nos permite salir adelante y guiarnos a lo largo de nuestra existencia.*

*A mis padres, Sandra y Ricardo, quienes han sido un apoyo incondicional y que con su esfuerzo me han brindado la oportunidad de crecer personal y profesionalmente, a mi hermana Dayana, quien siempre me motivo a seguir luchando, aconsejándome y siendo mi ejemplo a seguir y a mi hermanita Sara, por ser la razón por la cual vale la pena seguir luchando.*

*En memoria a mi abuelita Rosalba, quien anhelaba verme graduada. A mis amigos José, Angie, Johana y Yang-ly, con quienes compartimos momentos muy felices durante toda la carrera y a Cristian por estar presente en mi vida. A Hanctel, quien es una persona muy especial en mi vida, con quien me llegue a identificar mucho.*

*A mis profesores, por la oportunidad, guía y enseñanzas brindadas.*

*Gracias a todos ustedes.*

*Yesica Alejandra Sánchez Pinzón*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la Universidad Industrial de Santander y a la escuela de Ingeniería Química por su labor y seguimiento a nuestra formación como profesionales.*

*A nuestro Director, Msc. Luis Guillermo Rueda Serrano por su asesoría, tiempo y dedicación hacia el desarrollo del proyecto.*

*A nuestro Codirector, el profesor Luis Javier López Giraldo quien con su experiencia y conocimiento nos brindó orientación en la construcción de nuestro proyecto y formación como ingenieros.*

*Al proyecto, desarrollo de nuevos procesos y productos para la valorización de mucilago y granos de cacao en el departamento de Santander, inscrito al sistema general de regalías, por la colaboración en la ejecución de nuestro proyecto.*

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN .....	12
1. ESTADO DEL ARTE .....	17
1.1 ESTRUCTURA DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA (BL) .....	17
1.2 PRETRATAMIENTOS FISICOQUÍMICOS: ÁCIDO, ALCALINO E HIDROTÉRMICO .....	19
1.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA .....	20
1.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA .....	21
1.4.1 Modelo cinético de Michaelis- Menten. ....	22
1.4.2 Modelo de referencia. ....	25
2. OBJETIVOS .....	30
2.1. OBJETIVO GENERAL .....	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
3. DESCRIPCIÓN METODOLOGÍA .....	31
3.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	31
3.1.1 Pretratamientos .....	31
3.1.1.1 Artículos consultados. ....	32
3.1.2 Modelo cinético. ....	33
3.2 SIMULACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL .....	33
3.3 EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE PRODUCCIÓN DE GLUCOSA .....	34
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	36
4.1 PRETRATAMIENTOS .....	36
4.1.1 Pretratamiento alcalino. ....	36
4.1.2 Pretratamiento ácido .....	37
4.1.3 Pretratamiento hidrotérmico .....	38

4.2 MODELO CINÉTICO .....	42
4.2.1 Cálculo de la velocidad inicial. ....	44
4.2.2 Modelo trabajado con alfas inferiores a uno. ....	48
5. CONCLUSIONES .....	50
6. RECOMENDACIONES .....	51
BIBLIOGRAFÍA .....	52
ANEXOS .....	58

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Esquema de reacción para modelar la hidrolisis de celulosa para formar glucosa. ....	26
Figura 2. Metodología del proceso.....	31
Figura 3. Porcentaje de celulosa inicial (%Ci) y después del pretratamiento (%CF) en los diferentes materiales lignocelulósicos .....	41
Figura 4. Variación de la concentración .....	43
Figura 5. Superficie de respuesta estimada en el punto medio .....	45
Figura 6. Diagrama de Pareto estandarizado para velocidad inicial .....	46
Figura 7. Efectos principales para la velocidad inicial.....	48
Figura 8. Efecto de la lignina sobre la velocidad inicial.....	49

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Modelos cinéticos que describe la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos en la literatura. ....	24
Tabla 2. Diferencia porcentual de la celulosa .....	39
Tabla 3. Efectos estimados para la velocidad inicial.....	47

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
ANEXO A. Artículos consultados en el pretratamiento alcalino .....	58
ANEXO B. Artículos consultados en el pretratamiento ácido.....	59
ANEXO C. Artículos consultados en el pretratamiento hidrotérmico .....	60
ANEXO D. Parámetros estimados del modelo de Kadam .....	61
ANEXO E. Diseño experimental .....	62
ANEXO F. Ajuste (curva roja) del modelo racional a los datos de concentración de glucosa (curva azul).....	63
ANEXO G. Velocidades iniciales obtenidas a diferentes condiciones de Concentración enzimática, de celulosa y temperatura.....	64

## RESUMEN

**TÍTULO:** DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CÁSCARA DE CACAO PRETRATADO, POR MEDIO DE SIMULACIÓN, PARA LA PRODUCCIÓN DE JARABES GLUCOSIDADOS\*

**AUTOR:** DAVID GILDARDO MARTINEZ ÁLVAREZ, YESICA ALEJANDRA SÁNCHEZ PINZÓN\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Hidrólisis enzimática, pretratamientos, cáscara de cacao, cinética enzimática, glucosa.

### DESCRIPCIÓN

Durante la transformación de la biomasa lignocelulósica (BL) de cáscara de cacao hasta azúcares reductores y luego a etanol u otros productos de fermentación, se requiere la liberación de azúcares, entre los cuales se destaca la hidrólisis enzimática, la cual se lleva a cabo después de un pretratamiento, alcalino, ácido o hidrotérmico del material. Este proceso es catalizado por enzimas celulasas, las cuales realizan la degradación de la celulosa por medio de una reacción catalítica, su comportamiento puede ser descrito por medio de modelos matemáticos.

Entre los modelos que mejor describen el comportamiento de la hidrólisis enzimática en diferentes BL, se encuentra el modelo de Kadam *et al.* (2004); por lo tanto, se usó éste para simular la hidrólisis enzimática de la cáscara de cacao en el software Matlab, mientras que el análisis del diseño experimental fue realizado en Statgraphics. Durante las corridas de simulación se evaluó el efecto de la temperatura, concentración de celulosa (carga adicionada al reactor) y concentración de enzima, sobre la velocidad de liberación de glucosa. La concentración de enzima óptima fue de 60 g/kg, concentración de celulosa de 60 g/kg, temperatura de 328.15 K y velocidad de producción de glucosa de 11.866 g/kg\*h.

Además, se encontró que las características de la matriz polimérica afectan el aprovechamiento de la cáscara de cacao, debido a que se evita el acceso microbiano y/o enzimático. De esta forma, entre los diferentes pretratamientos, alcalino, ácido e hidrotérmico, el pretratamiento alcalino altera la estructura fisicoquímica del material con mayor eficiencia, facilitando el acceso a las cadenas de celulosa y hemicelulosa, mejorando el proceso de hidrólisis enzimática.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Luis Guillermo Rueda Serrano, Magíster Ingeniería Química. Codirector: Luis Javier López Giraldo, Doctor en Química Bioquímica y Ciencia de Alimentos.

## ABSTRACT

**TITLE:** DETERMINATION OF THE CONDITIONS ON ENZYMATIC HYDROLYSIS OF PRE-TREATED COCOA'S SHELL, BY THE METHOD OF SIMULATION, FOR THE PRODUCTION OF THE GLYCOSIDIZED SYRUP.\*

**AUTHOR:** DAVID GILDARDO MARTINEZ ÁLVAREZ, YESICA ALEJANDRA SÁNCHEZ PINZÓN.\*\*

**KEYWORDS:** Enzyme hydrolysis, pretreatments, cocoa's shell, enzymatic kinetics, glucose.

### DESCRIPTION

During the transformation of the lignocellulosic biomass (LB) of cocoa's shell till reducer sugars, and later on, to ethanol or other fermentation products, is required the sugars' release, in which stands out the enzymatic hydrolysis which is carried out after a pre-treatment, alkaline, acid, or hydro-thermal of the material. This process is catalyzed by cellulases enzymes, which perform cellulase's degradation by the medium of a catalytic reaction, its behavior can be described by means of mathematical models.

Among the models that best describe the behavior of the enzymatic hydrolysis on different LB, it is found the model of Kadam et al.(2004); therefore, this was used to stimulate the cocoa's shell enzymatic hydrolysis on the Matlab software, whilst that the analysis of the experimental design was performed on Statgraphics, during simulation's runs the temperature's effect was evaluated, cellulose's concentration (additional charge to the reactor) and concentration of enzyme, about the glucose's release speed. the enzyme's optimum concentration was 60 g/kg, the concentration of the cellulose was 60 g/kg, the temperature 328.15 K and, glucose's speed production of 11.886 g/kg\*h.

Furthermore, it was found that the polymeric's matrix characteristics affects the take of advantage of the cocoa's shell because microbial a/or enzymatic access is avoided. This way, among the different pre-treatments such as the alkaline, acid, and hydro-thermal, the alkaline pre-treatment alters the physicochemical's structure of the material with a higher degree of efficiency, facilitating access to chains of cellulose and hemicellulose, improving the enzymatic hydrolysis process.

---

\* Degree work

\*\* Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Luis Guillermo Rueda Serrano, Master Chemical Engineering. Co-director: Luis Javier López Giraldo, Doctor in Biochemical Chemistry and Food Science.

## INTRODUCCIÓN

La problemática mundial generada por el cambio climático, el agotamiento de los combustibles fósiles, la contaminación del aire y la contaminación de las principales fuentes hídricas, han impulsado el desarrollo de una nueva era tecnológica, más consiente y sostenible. El sector energético por su parte ha impulsado el desarrollo de un modelo alternativo basado en la generación de energía más limpia, eficiente y accesible. De preferencia se busca el desarrollo de tecnologías que usen como fuentes primarias recursos renovables y que sean amigables con el medio ambiente; siendo los biocombustibles una opción con un alto potencial de desarrollo.<sup>1</sup>

Los biocombustibles son una fuente de energía alternativa que ayuda a reducir el impacto ambiental generado por los combustibles fósiles, gracias a su carácter renovable. En algunos casos, los biocombustibles son obtenidos a partir de biomasa vegetal o lignocelulósica (BL), la cual se ha convertido en el sustrato más importante en la producción de biogás y/o bioetanol, gracias a su alto contenido de carbono (entre el 60-80%)<sup>2,3</sup>. A nivel molecular la BL está compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina formando una matriz polimérica estable<sup>4</sup>.

---

<sup>1</sup> GÓMEZ, E. A.; RÍOS, L. A. and PEÑA, J. D. Efecto del Pretratamiento de Biomasa Maderera en el Rendimiento a Etanol,” *Inf. Tecnol.*, vol. 24, no. 5, pp. 113–122, 2013, doi: 10.4067/S0718-07642013000500013

<sup>2</sup> A. I. N. Press, “Progress in bioethanol processing,” vol. 34, pp. 551–573, 2008, doi: 10.1016/j.peccs.2007.11.001

<sup>3</sup> NOGUÉS, F. S. *Energía de la Biomasa (volumen I)*. Prensas Universitarias de Zaragoza, 2010

<sup>4</sup> SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S. and AIKAT, K. “Bioethanol production from agricultural wastes: An overview,” *Renew. Energy*, vol. 37, no. 1, pp. 19–27, 2012, doi: 10.1016/j.renene.2011.06.045

Dentro de la BL, se encuentra la cáscara de cacao con una composición de 30.02 % de celulosa, 23.93 % de hemicelulosa y 28.73 % de lignina<sup>5</sup>, la cual es un residuo agroindustrial que representa hasta el 90% del peso del fruto del cacao, que en la mayoría de las veces no es aprovechado ni tratado adecuadamente, generando proliferación de plagas, aparición de olores y de focos infecciosos<sup>6</sup>. Además, es importante destacar que la manufactura del cacao es una industria que está creciendo y que hoy en día ha mostrado un aumento importante en su producción. Según estadísticas de la Federación Nacional de Cacaoteros (Fedecacao) se registró una producción nacional de cacao de 59.665 toneladas para el año 2019, presentando un incremento del 4.9 % respecto al año 2018 y siendo el departamento de Santander el principal productor a nivel nacional.

Para la transformación de la BL hasta azúcares reductores y posteriormente a etanol u otros productos de fermentación, se requieren procesos de liberación de azúcares, entre los cuales se observa principalmente la hidrólisis enzimática<sup>7</sup>. Este proceso es catalizado por enzimas celulasas, las cuales realizan la degradación de la celulosa por medio de una reacción catalítica<sup>8</sup>. La velocidad de dicha reacción depende de la estructura de la celulosa en la BL y por el modo de acción que las enzimas presenten; además, su comportamiento puede ser descrito por medio de modelos matemáticos.<sup>9</sup>

Actualmente existen diferentes modelos cinéticos para la reacción de la hidrólisis enzimática, los cuales dependen de las características o factores incluidos en éstos,

---

<sup>5</sup> NAZIR, N. - NOVELINA, Juita E.; AMELIA, C. and FATLI, R. "Optimization of Pre-treatment Process of Cocoa Pod Husk Using Various Chemical Solvents," *Int. J. Adv. Sci. Eng. Inf. Technol.*, vol. 6, no. 3, p. 403, 2016, doi: 10.18517/ijaseit.6.3.848

<sup>6</sup> IBÁÑEZ, A.I.B.L.D. "Caracterización de biomasa lignocelulósica (THEOBROMA CACAO L) para su uso en la obtención de etanol por vía fermentativa," vol. 26, no. 2, pp. 78–79, 1993

<sup>7</sup> BENALCAZAR, J. "Evaluación de diferentes pretratamientos químicos a la biomasa de la cáscara de cacao para procesos de fermentación alcohólica.," pp. 1–62, 2018

<sup>8</sup> TORRES JARAMILLO, D.; MORALES VÉLEZ, S.P. and QUINTERO DÍAZ, J.C. "Evaluación de pretratamientos químicos sobre materiales lignocelulósicos," *Ingeniare*, vol. 25, no. 4, pp. 733–743, 2017, doi: 10.4067/S0718-33052017000400733

<sup>9</sup> TORRES JARAMILLO, MORALES VÉLEZ, and QUINTERO DÍAZ, *Óp. Cit.*

tales como la inhibición de sustrato, inhibición de producto final de celobiosa y glucosa y desactivación de enzima<sup>10</sup>. Estos modelos consideran múltiples reacciones debido a los diferentes tipos de sustratos (cristalino y amorfo)<sup>11</sup>. Por otro lado, la utilidad de estos modelos cinéticos es predecir el comportamiento de la hidrólisis enzimática, evaluando los diferentes factores que afectan el proceso y optimizar la obtención de glucosa.

Uno de los principales factores que afectan el aprovechamiento eficiente de la cáscara de cacao es la matriz polimérica, debido a la barrera formada por la lignina, la cristalinidad de la celulosa y su baja área superficial; los cuales evitan el acceso microbiano y/o enzimático<sup>12</sup>. Para eliminar este tipo de limitante se han usado diferentes tipos de pretratamientos que alteran la estructura fisicoquímica del material y facilitan el acceso a las cadenas de celulosa y hemicelulosa, mejorando el proceso de hidrólisis enzimática. Actualmente existen tres tipos de pretratamientos utilizados sobre la BL: a) Pretratamiento biológico, donde se utilizan microorganismos y enzimas que realizan la degradación de la BL; b) Pretratamiento químico, en el cual la biomasa es mezclada con un compuesto químico diluido en agua (tales como: ácido, alcalino, oxidación húmeda y Organosolv) y c) Pretratamiento físico, en donde el sustrato es sometido a una operación física, la cual genera deformación de la BL (tales como: reducción de tamaño mecánico, pirólisis, horno microondas e irradiación con haz de electrones).<sup>13</sup>

Entre los pretratamientos físico-químicos más aplicados y eficientes se encuentran: el pretratamiento ácido, alcalino e hidrotérmico. Cada pretratamiento cumple una

---

<sup>10</sup> ALBERNAS CARVAJAL, Y.; CORSANO, G.; MESA GARRIGA, L.; SANTOS HERRERO, R. and GONZALES SUÁREZ, E. "Estudio de la cinética de la hidrólisis enzimática del bagazo petratado," *Afinidad* Lxxii, no. 570, pp. 127–132, 2015

<sup>11</sup> *Ibid.*

<sup>12</sup> SARKAR, GHOSH, BANNERJEE, and AIKAT, Óp. Cit.

<sup>13</sup> SERRANO, N.E.G.Q.L.G.R. "Evaluación del proceso de autohidrólisis del bagazo de fique sobre la producción de metano," *Evaluación del proceso autohidrólisis del bagazo fique sobre la Prod. metano*, vol. 7, no. 6, pp. 1–25, 2012

función específica (bondad) dentro de la matriz polimérica de la BL, como: i) la remoción de la hemicelulosa (por pretratamiento ácido), ii) la remoción de lignina (por pretratamiento alcalino) y iii) la deformación de la matriz lignocelulósica (por pretratamiento hidrotérmico)<sup>14</sup>. Estas bondades pueden ser obtenidas en un proceso de pretratamiento, en donde se permita el fácil acceso a los polímeros de azúcar, modificando la estructura fisicoquímica de la BL<sup>15</sup>.

En consecuencia, este trabajo evalúa por medio de herramientas de simulación el proceso de aprovechamiento de la BL de cáscara de cacao pretratada y sin pretratar, a fin de mejorar la accesibilidad de las enzimas en la celulosa y hemicelulosa para incrementar la producción de azúcares fermentables en la etapa de hidrólisis enzimática empleando modelos cinéticos actuales.

---

<sup>14</sup> SARKAR, GHOSH, BANNERJEE, and AIKAT, Óp. Cit.

<sup>15</sup> Ibid.

## 1. ESTADO DEL ARTE

### 1.1 ESTRUCTURA DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA (BL)

La BL es un material orgánico que, al poseer una estructura vegetal, se encuentra constituido principalmente por polímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina<sup>16</sup>. Su principal fuente de obtención se encuentra en los desechos orgánicos (como: bagazo de caña, cáscara de cacao, de arroz etc.), provenientes en su mayoría de actividades agrícolas<sup>17</sup>. Su composición está dada por contenidos de celulosa de 25-45 %, de hemicelulosa de 10-30 % y de lignina de 20-35%, respectivamente.

La celulosa es el componente estructural más abundante en la naturaleza, es el principal polímero estructural que se encuentra en la pared celular vegetal y con mayor interés como fuente de energía para reemplazar algunos derivados del petróleo<sup>18</sup>. Esta red polimérica, se encuentra constituida por cadenas lineales de D-glucosa unida a su vez por enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1-4). Al ser un homopolímero lineal, forma una estructura cristalina debido a estas cadenas (fibrillas), las cuales son resistentes a la hidrólisis y degradación enzimática.<sup>19</sup>

---

<sup>16</sup> ANWAR, Z.; GULFRAZ, M. and IRSHAD, M. "Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review," *J. Radiat. Res. Appl. Sci.*, vol. 7, no. 2, pp. 163–173, 2014, doi: 10.1016/j.jrras.2014.02.003

<sup>17</sup> CERDÁ, E. "Energía obtenida a partir de biomasa," *Cuad. Económicos ICE*, no. 83, 2012, doi: 10.32796/cice.2012.83.6036

<sup>18</sup> OCAÑA, B.; DECKER, R. and CARDENAS, G.V. "Cinética de sacarificación y fermentación para producción de bioetanol a partir de cáscara de banano maduro mediante pretratamiento de secado.," 2019, [Online]. Available: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/14088>

<sup>19</sup> CHANG, V.S. and HOLTZAPPLE, M.T. "Fundamental Factors Affecting Biomass Enzymatic Reactivity," *Twenty-First Symp. Biotechnol. Fuels Chem.*, vol. 84, pp. 5–37, 2000, doi: 10.1007/978-1-4612-1392-5\_1

Por otro lado, la hemicelulosa es el segundo componente más abundante, abarcando proporciones del 10-30% dentro de la BL<sup>20</sup>. Este carbohidrato es más complejo que la celulosa, puesto que su arreglo estructural se encuentra constituido por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa), formando cadenas ramificadas. Su principal función es servir como conexión entre las fibras de lignina y celulosa con el fin de brindar mayor rigidez a la estructura<sup>21</sup>. La hidrólisis de este polímero es más fácil debido a que contiene polímeros cortos unidos en un arreglo desigual, en virtud de la unión con azúcares ácidos (ácido galacturónico y glucurónico) y que no presenta una estructura cristalina como la celulosa.<sup>22, 23, 24, 25</sup>.

La lignina, es un heteropolímero amorfo encontrado en las paredes celulares, ocupa el tercer lugar (después de la celulosa y hemicelulosa) de los polímeros más abundantes en la biosfera. Su función es proporcionar rigidez, impermeabilidad y resistencia al ataque microbiano en los materiales lignocelulósicos. Sus principales componentes son: el ácido p-hidroxicinámico (curamílico) y los alcoholes 4-hidroxi-3-metoxicinámico (coniferílico) y 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (sinapílico), los cuales se encuentran unidos por diferentes enlaces carbono carbono (C-C) y éter (C-O-C).<sup>26</sup>

---

<sup>20</sup> MOHAMMED NABAVI, S. *Obtención de etanol de segunda generación a partir de biomasa lignocelulósica (cascarilla de arroz) en Tarapoto*, no. 2. 2019

<sup>21</sup> CERDÁ, Óp. Cit.

<sup>22</sup> MENA ESPINOSA, X. "Obtención de etanol a partir de residuos agroindustriales de plátano," p. 166, 2011

<sup>23</sup> DELGADO CRUZ, M.J. and CAMARGO MORA, M.G. "Optimización de los residuos de cascarilla de arroz mediante pretratamiento por hidrólisis ácida para la obtención de azúcares reductores," *Artic. Ecuador*, vol. 1, no. 5, pp. 1-127, 2013

<sup>24</sup> MENA ESPINOSA, Óp. Cit.

<sup>25</sup> DELGADO CRUZ and CAMARGO MORA, Óp. Cit.

<sup>26</sup> NAVARRO, E. and ABRIL, A. *Etanol a partir de biomasa lignocelulósica*, no. October. 2015

## 1.2 PRETRATAMIENTOS FISICOQUÍMICOS: ÁCIDO, ALCALINO E HIDROTÉRMICO

Para la transformación de la BL, primero se debe realizar un pretratamiento del material con el fin de remover las fracciones de hemicelulosa y lignina, que, estando presentes en la BL, dificultan la accesibilidad del material y la acción enzimática y/o microbiana responsable del proceso de hidrólisis y transformación de la BL<sup>27</sup>. Además, se ha observado que, durante el pretratamiento, la BL se modifica incrementando el área superficial y reduciendo la cristalinidad de los polímeros de celulosa, mejorando su aprovechamiento<sup>28</sup>.

Entre los pretratamientos observados, se destacan los pretratamientos: ácido, alcalino e hidrotérmico; los cuales han mostrado buenos resultados en la transformación de la BL y la liberación de los polímeros de celulosa<sup>29</sup>. En el caso del pretratamiento alcalino, se observa principalmente la remoción de la lignina y parte de la hemicelulosa, así como el incremento del área superficial del material y la disminución de la cristalinidad de la celulosa<sup>30</sup>. Por otro lado, el pretratamiento ácido permite la remoción de la hemicelulosa en la BL rompiendo los enlaces glicosídicos<sup>31</sup> y el pretratamiento hidrotérmico genera el fraccionamiento de la celulosa amorfa y hemicelulosa, además de la deformación de las cadenas cristalinas de la celulosa y lignina.<sup>32</sup>

---

<sup>27</sup> TORRES JARAMILLO, MORALES VÉLEZ, and QUINTERO DÍAZ, Óp. Cit.

<sup>28</sup> Ibid

<sup>29</sup> TAHERZADEH, M. J. and KARIMI, K. *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review*, vol. 9, no. 9. 2008

<sup>30</sup> TORRES JARAMILLO, MORALES VÉLEZ, and QUINTERO DÍAZ, Óp. Cit.

<sup>31</sup> RAUD, M.; TUTT, M.; OLT, J. and KIKAS, T. "Effect of Lignin Content on Enzymatic Hydrolysis," *Agron. Res.*, vol. 13, no. 2, pp. 405–412, 2015

<sup>32</sup> SERRANO, Óp. Cit.

Esto se ha observado en diferentes investigaciones en donde se emplean cada uno de los pretratamientos. Por ejemplo, Torres Jaramillo. *et al.*,<sup>33</sup> y Cardona. *et al.*,<sup>34</sup>, evaluaron diferentes condiciones (tiempo, temperatura y concentración) del pretratamiento alcalino con hidróxido de sodio (NaOH) en la recuperación de la fracción celulósica y remoción de lignina con pastos de elefante y King Grass, obteniendo altas concentraciones de etanol y remociones de lignina del 88.4% y 94% para pasto de elefante y King Grass respectivamente, bajo las condiciones de pretratamiento de 120 °C, 60 minutos, NaOH al 2% (p/p) y una relación líquido a sólido de 20 (p/p). Otros autores como Satari B. *et al.*, determinaron la influencia de diferentes condiciones (tiempo, temperatura y concentración) de pretratamiento con ácido sulfúrico diluido para maximizar la recuperación de azúcar en la hidrólisis enzimática de la paja de trigo, obteniendo los mejores resultados con las condiciones de 30 minutos, 147 °C y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1.6 (v/v) y señalando que la temperatura es más significativa que la concentración de ácido y el tiempo de tratamiento para mejorar la liberación de xilosa y la digestión de celulosa.

### 1.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El proceso de hidrólisis enzimática consiste en la fragmentación de las cadenas de celulosa y hemicelulosa a monómeros y azúcares simples, por la acción de un grupo de enzimas llamadas hidrolasas<sup>35</sup>. Las hidrolasas se encargan de romper moléculas de alto peso molecular, haciéndolas reaccionar con moléculas de agua produciendo a su vez polímeros de cadena más corta, como los oligosacáridos. Con este método

---

<sup>33</sup> TORRES JARAMILLO, MORALES VÉLEZ, And QUINTERO DÍAZ, Óp. Cit.

<sup>34</sup> CARDONA, RIOS, PEÑA, and RIOS, Óp. Cit.

<sup>35</sup> IBÁÑEZ, Óp. Cit

se pueden romper las uniones de éteres (-C-O-C-), ésteres (-CO-O-) y aminoácidos (-CONH-) de los materiales lignocelulósicos.<sup>36</sup>

Dentro de las enzimas hidrolasas hay una en particular que es la celulasa, la cual se encarga de atacar las redes poliméricas de la celulosa y producir azúcares reductores<sup>37</sup>. El modo de acción de la enzima celulasa, generalmente es reconocido por la existencia de tres tipos de celulasas: i) endoglucanasas, las cuales hidrolizan los enlaces internos en el polímero de la celulosa, ii) exoglucanasas o celobiohidrolasas, inician la hidrólisis en las extremidades de la cadena y iii)  $\beta$ -glucosidasa o celobiosa, las cuales completan la hidrólisis catalizándolas de la celobiosa a glucosa<sup>38</sup>. Por ello, el efecto del complejo enzimático celulasa se expresa por la acción sinérgica de las tres enzimas.<sup>39</sup>

#### 1.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA

La acción enzimática sobre materiales lignocelulósicos puede ser descrita en cuanto a qué tanto sustrato degrada la enzima, en un determinado tiempo. Para desarrollar un seguimiento a esta velocidad de consumo, varios autores centraron su atención a encontrar un modelo que lo describa.<sup>40,41</sup>

---

<sup>36</sup> CARDONA, E.M.; RIOS, J.A.; PEÑA, J.D. and RIOS, L.A. “Pretratamiento Alcalino de Pasto Elefante (*Pennisetum* sp) y King Grass (*Pennisetum hybridum*) Cultivados en Colombia para la Producción de Bioetanol,” *Inf. Tecnol.*, vol. 24, no. 5, pp. 69–80, 2013, doi: 10.4067/S0718-07642013000500009

<sup>37</sup> OYOLA GILER, P.D. *Identificación de compuestos inhibidores que se forman en el hidrolizado enzimático de celulosa y hemicelulosa presentes en cáscara de arroz.*, vol. 27, no. 3. 2017

<sup>38</sup> ESKANDRANI, R. M. “Optimización del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino del bagazo de caña de azúcar para la producción de glucosa,” pp. 2007–2009, 2007

<sup>39</sup> *Ibid.*

<sup>40</sup> FERRERAS, E. “Expresión y estudio de enzimas termoestables de interés biotecnológico,” p. 217, 2011

<sup>41</sup> ESKANDRANI, Óp. Cit.

**1.4.1 Modelo cinético de Michaelis- Menten.** En el año de 1913 los científicos Leonor Michaelis y Maud Menten propusieron un modelo que permitía describir la cinética de la mayoría de las reacciones enzimáticas. Su planteamiento consistió en proponer la ruta de acción enzimática de acuerdo con la ecuación 1.



En la primera parte, la enzima (E) se une al sustrato (S) para formar el complejo (ES) en una combinación reversible y, en la segunda, este complejo se disocia irreversiblemente con el fin de formar el producto [P], liberando así a la enzima. Este modelo es válido cuando se cumplen dos condiciones: la primera es que la concentración de sustrato sea considerablemente mayor que la de enzima y la segunda, que el proceso se encuentre en estado estacionario, es decir, cuando el complejo (ES) sea constante.<sup>42</sup>

Una de las condiciones para describir la cinética de Michaelis es que el material sea homogéneo, lo cual da lugar al contacto efectivo de la enzima y el sustrato. Para ello, el sistema de reacción (Ecuación 2 y 3) de la hidrólisis enzimática es trabajado en varias etapas.<sup>43</sup>



De esta manera, varios autores se dedicaron a trabajar con esta ruta de reacción y el modelo cinético que obtenían para describir la hidrólisis enzimática presentaba la siguiente tendencia general:

---

<sup>42</sup> WOJTUSIK, M. "Hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos," 2019

<sup>43</sup> WOJTUSIK, Op. Cit.

$$r_n = \frac{K_{nr} * E_{ib} * R_S * S}{1 + \frac{S_1}{K_{1IS1}} + \frac{S_2}{K_{1IS2}} + \dots + \frac{S_n}{K_{1ISn}}} \quad (\text{Ec. 4})$$

La ecuación 4 fue utilizada por Zheng Y. *et al.*,<sup>44</sup> para plantear la velocidad de reacción de modelo cinético que permitiera describir la hidrólisis enzimática del pasto Ryegrass, dentro de ella se podría encontrar la reactividad del sustrato ( $R_S$ ), la adsorción enzimática ( $E_{ib}$ ) sobre la superficie de la celulosa, la inhibición competitiva por celobiosa ( $K_{1IS1}$ ) y glucosa ( $K_{1IS2}$ ), al igual que la constante cinética ( $K_{nr}$ ). Con lo anterior, los autores demostraron que el modelo podía simular correctamente la cinética de la hidrólisis enzimática siempre y cuando el tratamiento tuviera en cuenta las siguientes condiciones: rango de carga solida entre el 4-12% p/p en base seca, concentración de enzima alrededor de 15-150 FPU/g- celulosa.

Otros autores contemplaron diferentes rutas y componentes nuevos de reacción que les permitiera ajustar de mejor manera su modelo al proceso real, algunos de ellos son mostrados en la tabla 1.

---

<sup>44</sup> ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. and JENKINS, B.M. "Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated Creeping Wild Ryegrass," *Am. Soc. Agric. Biol. Eng. Annu. Int. Meet. 2009, ASABE 2009*, vol. 1, no. 09, pp. 547–570, 2009, doi: 10.13031/2013.26928

**Tabla 1. Modelos cinéticos que describe la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos en la literatura.**

Autor	Furlong B. <i>et al.</i> (2019)	Acevedo J. <i>et al.</i> (2008)	Zheng Y. <i>et al.</i> (2009)
<b>Biomasa</b>	Bagazo de caña	Bagazo de caña	<i>Leymus triticoides</i> pretratado
<b>Esquema de reacción</b>	$\begin{aligned} & \text{Celulosa} \xrightarrow{r_1} \text{Celobios} \xrightarrow{r_2} \text{Glucosa} \\ & \text{Celulosa} \xrightarrow{r_3} \text{Glucosa} \\ & \text{Hemicelulosa} \xrightarrow{r_4} \text{Xylosa} \end{aligned}$	$\begin{aligned} & \text{Celulosa} \xrightarrow{r_1} \text{Celobios} \xrightarrow{r_2} \text{Glucosa} \\ & \text{Celulosa} \xrightarrow{r_3} \text{Glucosa} \end{aligned}$	$\begin{aligned} & \text{Celulosa} \xrightarrow{r_1} \text{Celobios} \xrightarrow{r_2} \text{Glucosa} \\ & \text{Celulosa} \xrightarrow{r_3} \text{Glucosa} \end{aligned}$
<b>Ecuaciones cinéticas</b>	$r_1 = \frac{K_1 * E_{b1} * R_s * C_L}{1 + \frac{C_L}{K_{i1cb}} + \frac{G_L}{K_{i1GL}} + \frac{X_y}{K_{i1xL}}}$ $r_2 = \frac{K_2 * (E_{b1} + E_{b2}) * R_s * C_L}{1 + \frac{C_L}{K_{i2Cb}} + \frac{G_L}{K_{i2GL}} + \frac{X_y}{K_{i2xL}}}$ $r_3 = \frac{K_2 * (E_i) * S_i}{K_{3M} \left(1 + \frac{P_i}{K_{Pi}}\right) + S_i}$ $r_4 = \frac{K_4 * (E_{b4}) * R_s * H_e}{1 + \frac{C_b}{K_{i4Cb}} + \frac{G_L}{K_{i4GL}} + \frac{X_y}{K_{i4xL}}}$ $C_{E1B} = \frac{C_{E1max} * K_{1ad} * C_{E1f}}{1 + K_{1ad} * C_{E1f}}$	$r_1 = \frac{K_{1r} * C_{dp} * C * e^{-it}}{1 + \frac{B}{K_{1B}} + \frac{G}{K_{1G}}}$ $r_2 = \frac{K_{2r} * B}{1 + \frac{G_2}{K_{2IG2}} + \frac{G}{K_{2IG}} + \frac{X}{K_{2IX}}}$ $r_3 = \frac{K_{3r} * C_{dp} * C * e^{-it}}{1 + \frac{B}{K_{1B}} + \frac{G}{K_{1G}}}$	$r_1 = \frac{K_{1r} * C_{E1BC} * R_s * S}{1 + \frac{C_{G2}}{K_{1IG2}} + \frac{C_G}{K_{1IG}}}$ $r_2 = \frac{K_{2r} * C_{E1BC} * R_s * S}{1 + \frac{C_{G2}}{K_{2IG2}} + \frac{C_G}{K_{2IG}}}$ $r_3 = \frac{K_{3r} * C_{E2B} * G_2}{K_{3M} \left(1 + \frac{C_G}{K_{3IG}}\right) + C_{G2}}$ $C_{E1B} = \frac{C_{E1max} * K_{1ad} * C_{E1f}}{1 + K_{1ad} * C_{E1f}}$

Otro caso fue el de Acevedo J. *et al.*<sup>45</sup>, el cual desarrolló un conjunto de ecuaciones y relaciones matemáticas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática en el bagazo de caña de azúcar. Los autores optimizaron el modelo cinético propuesto por Ljunggren, considerando la inhibición del producto final de celobiosa y glucosa y la desactivación de la enzima. Según los autores, el modelo matemático se ajusta a las condiciones experimentales, prediciendo el comportamiento aproximado para la producción de glucosa a partir de la celulosa procedente de diferentes materiales lignocelulósicos; sin embargo, es claro que el modelo no considera el efecto de la temperatura, por lo que puede ser una desventaja cuando se quiere estudiar la hidrólisis en un rango amplio de la misma. Por ello, fue necesario encontrar un modelo cinético que contemplara múltiples condiciones, uno de ellos fue el de Kadam. *et al.*<sup>46</sup>

**1.4.2 Modelo de referencia.** El modelo que mejor describe el comportamiento de la hidrólisis enzimática en diferentes materiales lignocelulosicos, fue el modelo de Kadam *et al.*<sup>47</sup> Los autores consideraron varios factores, tales como la adsorción enzimática (usando el modelo de Langmuir), la inhibición del azúcar, efectos de la temperatura y reactividad del sustrato. El modelo cinético propuesto es capaz de predecir, el rendimiento del proceso en un amplio rango de condiciones de operación que abarcan varias concentraciones, temperaturas y regímenes de mezcla.

Según los autores, se modelaron tres reacciones de hidrólisis (figura 1), dos reacciones heterogéneas para la descomposición de la celulosa en celobiosa y glucosa y una reacción homogénea para hidrolizar la celobiosa en glucosa. Cada reacción enzimática es potencialmente inhibida por, la glucosa, celobiosa,

---

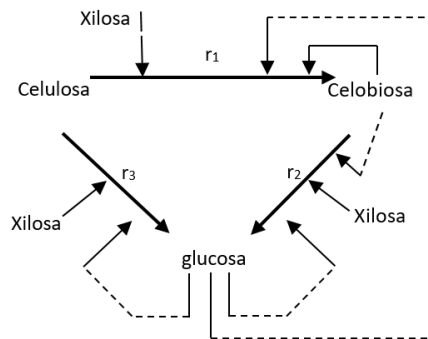
<sup>45</sup> ACEVEDO J., G.O. et al, “Simulación y diseño básico de un reactor de hidrólisis enzimática de bagazo de caña,” pp. 1–58, 2008

<sup>46</sup> KADAM, K. L.; RYDHOLM, E. C. and MCMILLAN, J. D. “Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 20, no. 3, pp. 698–705, 2004, doi: 10.1021/bp034316x

<sup>47</sup> Ibid.

galactosa, manosa, xilosa y/o arabinosa. Con el fin de simplificar el modelo matemático, se consideraron tres azúcares: celobiosa, glucosa y xilosa, siendo la xilosa sustituta de pentosas (xilosa y arabinosa) y la glucosa de todas las hexosas (galactosa y manosa). Cabe resaltar, que los autores usaron un modelo de inhibición competitiva, el cual asume que los azúcares inhibidores son sustratos que se unen competitivamente al sitio activo, retardando la formación del sustrato enzimático.

**Figura 1. Esquema de reacción para modelar la hidrólisis de celulosa para formar glucosa.**



Teniendo en cuenta el esquema de reacciones de la figura 1, la Ec.8 describe la conversión de la celulosa en celobiosa, mientras que, la Ec.9 describe la conversión de la celulosa en glucosa. Finalmente, la Ec.10 muestra la conversión de la celobiosa a glucosa. Las ecuaciones de velocidad suponen que la adsorción de la enzima sigue una isoterma de tipo Langmuir (descrita en la Ec.6 y Ec.7) con las primeras reacciones de orden ( $r_1$  y  $r_2$ ), además que la adsorción ocurre en la superficie de la celulosa y por medio de la resolución de estas dos ecuaciones se hallan los parámetros  $E_{1f}$ ,  $E_{2f}$ ,  $E_{1b}$  y  $E_{2b}$ . La matriz de la celulosa es uniforme en términos de susceptibilidad al ataque enzimático, por tanto, la actividad enzimática permanece constante y la conversión de la celobiosa a glucosa se produce en solución siguiendo la cinética clásica de Michaelis- Menten.

Los balances de masa de celulosa, celobiosa, glucosa y la enzima celulasa se expresan en las ecuaciones de la 11-14 respectivamente. El efecto de la temperatura en la hidrólisis enzimática se relaciona a través de la ecuación de Arrhenius indicada en la Ec.15. Esta ecuación es válida para temperaturas por debajo de la temperatura máxima de la enzima, siendo la temperatura óptima 50°C. Los autores estimaron los parámetros del modelo a partir de datos experimentales utilizando como sustrato el rastrojo de maíz pretratado con ácido diluido. Los parámetros usados se encuentran en la tabla 8 en el Anexo D.

✓ **Reactividad del sustrato**

$$R_S = \alpha * \frac{S}{S_0} \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde:

$R_S$ : Reactividad del sustrato (adimensional),  $\alpha$ : Constante (adimensional),

$S$ : Concentración de sustrato en un momento dado [g/kg],  $S_0$ : Concentración de sustrato inicial [g/kg]

✓ **Adsorción de enzimas**

Isoterma de Langmuir

$$E_{1B} = \frac{E_{1max} * K_{1ad} * E_{1f} * S}{1 + K_{1ad} * E_{1f}} \quad (\text{Ec. 6})$$

$$E_{2B} = \frac{E_{2max} * K_{2ad} * E_{2f} * S}{1 + K_{2ad} * E_{2f}} \quad (\text{Ec. 7})$$

- ✓ **Reacción de celulosa a celobiosa con inhibición competitiva de glucosa, celobiosa y xilosa**

$$r_1 = \frac{K_{1r} * E_{1B} * R_S * S}{1 + \frac{G_2}{K_{1G2}} + \frac{G}{K_{1IG}} + \frac{X}{K_{1IX}}} \quad (\text{Ec. 8})$$

- ✓ **Reacción de celulosa a glucosa con inhibición competitiva de glucosa, celobiosa y xilosa**

$$r_2 = \frac{K_{2r} * (E_{1B} + E_{2B}) * R_S * S}{1 + \frac{G_2}{K_{2IG2}} + \frac{G}{K_{2IG}} + \frac{X}{K_{2IX}}} \quad (\text{Ec. 9})$$

- ✓ **Reacción de celobiosa a glucosa con inhibición competitiva de glucosa y xilosa**

$$r_3 = \frac{K_{3r} * E_{2F} * G_2}{K_{3M} \left(1 + \frac{G}{K_{3IG}} + \frac{X}{K_{3IX}}\right) + G_2} \quad (\text{Ec. 10})$$

- ✓ **Balance de masa**

$$\text{Celulosa} : \frac{dC}{dt} = -r_1 - r_2 \quad (\text{Ec. 11})$$

$$\text{Celobiosa} : \frac{dC_2}{dt} = 1.056 * r_1 - r_3 \quad (\text{Ec. 12})$$

$$\text{Glucosa} : \frac{dG}{dt} = 1.111 * r_2 + 1.053 * r_3 \quad (\text{Ec. 13})$$

$$\text{Enzima} : E_{Ti} = E_{fi} + E_{bi} \quad (\text{Ec. 14})$$

✓ **Dependencia de la temperatura**

Ecuación de Arrhenius

$$K_{ir(T_2)} = K_{ir(T_1)} * e^{-\frac{E_{ai}}{R * \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}} \quad (\text{Ec. 15})$$

$30\text{ }^\circ\text{C} \leq T \leq 55\text{ }^\circ\text{C}$

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar, mediante simulación, las mejores condiciones de temperatura, concentración de celulosa y concentración de enzima para la obtención de altos contenidos de azúcares en jarabes glucosidados provenientes de la hidrólisis de cáscara de cacao, modificada por medio de pretratamiento.

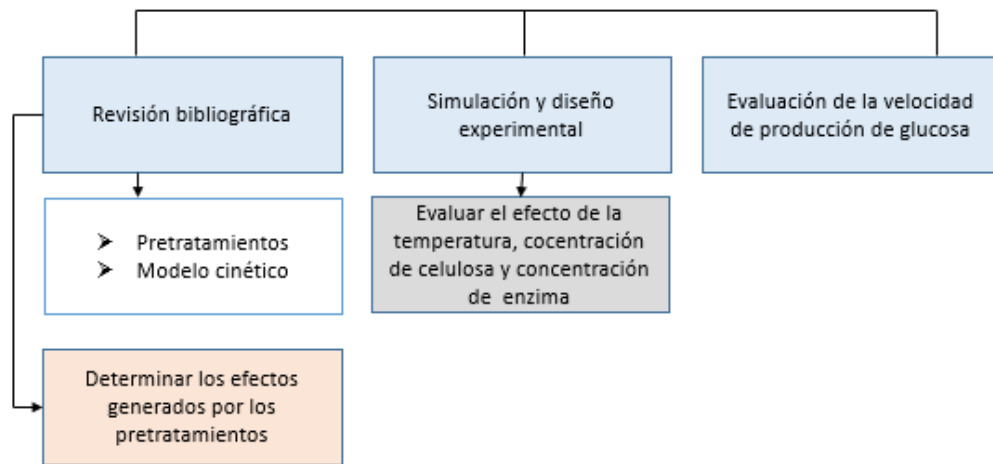
### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.** Determinar por medio de revisión bibliográfica los efectos generados por los pretratamientos (ácido, alcalino e hidrotérmico) sobre la cáscara de cacao para la liberación de la celulosa.
- 2.** Evaluar el efecto de la temperatura, concentración de celulosa y concentración de enzima, sobre la velocidad de liberación de glucosa en el proceso de hidrólisis enzimática de celulosa proveniente de la cáscara de cacao usando modelos cinéticos previamente reportados.
- 3.** Evaluar la velocidad de producción de glucosa en el proceso de hidrólisis enzimática de celulosa, a partir de un modelo cinético en el que se incluye la disponibilidad de celulosa (alfa) usando el factor  $R_s$ .

### 3. DESCRIPCIÓN METODOLOGÍA

El estudio del comportamiento de la hidrólisis enzimática de la cáscara de cacao se dividió en dos etapas; optimización del pretratamiento de la cáscara de cacao y simulación del proceso de hidrólisis enzimática. El procedimiento se detalla a continuación en la figura 2.

Figura 2. Metodología del proceso



#### 3.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

**3.1.1 Pretratamientos.** Con el objetivo de evaluar el efecto de las condiciones empleadas en los diferentes pretratamientos (alcalino, ácido e hidrotérmico) sobre materiales lignocelulósicos similares a la cáscara de cacao se realizó una revisión bibliográfica con el fin de determinar el pretratamiento adecuado donde, la recuperación de celulosa sea más eficiente.

Para esto se buscó la BL que sea semejante a la composición de cáscara de cacao, se realizó por medio del cálculo de la diferencia porcentual de la composición de celulosa de los materiales revisados, con respecto a la cáscara de cacao (30.2% de celulosa) y se seleccionó los materiales que presentaron una diferencia  $\leq 20\%$  (Tabla 2). Finalmente, se seleccionó el material con la mayor liberación de celulosa posterior al pretratamiento. De esta forma, se evaluaron las siguientes condiciones: temperatura, concentración, tiempo y R-S/L.

**3.1.1.1 Artículos consultados.** El porcentaje de recuperación de celulosa de la cáscara de cacao fue evaluado y analizado con base en los trabajos reportados por los siguientes autores:

**a. Pretratamiento alcalino:** Cardona et al.,<sup>48</sup>, Torres Jaramillo et al.,<sup>49</sup>, Santos M. et al.,<sup>50</sup> Kang et al.,<sup>51</sup> y Wang et al.,<sup>52</sup> (Anexo A).

**b. Pretratamiento ácido:** Torres Jaramillo et al.,<sup>53</sup>, Castillo Saldarriaga & Velásquez Lozano,<sup>54</sup> Sindhu et al.,<sup>55</sup>, Cara et al.,<sup>56</sup> y Kuglarz et al.,<sup>57</sup> (Anexo B).

**c. Pretratamiento hidrotérmico:** Brandon et al.,<sup>58</sup>, Yu et al.,<sup>59</sup>, Lee et al.,<sup>60</sup>, Cebreiros et al.,<sup>61</sup> y Ríos et al.,<sup>62</sup> (Anexo C).

---

<sup>48</sup> CARDONA, RIOS, PEÑA, and RIOS, Óp. Cit.

<sup>49</sup> TORRES JARAMILLO, MORALES VÉLEZ, and QUINTERO DÍAZ, Óp. Cit.

<sup>50</sup> ALBERNAS CARVAJAL, CORSANO, MESA GARRIGA, SANTOS HERRERO, and GONZALES SUÁREZ, Óp. Cit

<sup>51</sup> KANG, JEONG, and PARK, Óp. Cit.

<sup>52</sup> WANG, KESHWANI, REDDING, and CHENG, Óp. Cit.

<sup>53</sup> TORRES JARAMILLO, MORALES VÉLEZ, and QUINTERO DÍAZ, Óp. Cit

<sup>54</sup> CASTILLO SALDARRIAGA and VELÁSQUEZ LOZANO, Óp. Cit

<sup>55</sup> SINDHU, KUTTIRAJA, BINOD, SUKUMARAN, and PANDEY, Óp. Cit

<sup>56</sup> CARA, RUIZ, OLIVA, SÁEZ, and CASTRO, Óp. Cit.

<sup>57</sup> KUGLARZ, ALVARADO-MORALES, DĄBKOWSKA, and ANGELIDAKI, Óp. Cit.

<sup>58</sup> BRANDON, SHARMA, HAWKINS, ANDERSON, CHAMBLISS, and DORAN-PETERSON, Óp. Cit.

<sup>59</sup> YU, *et al.*, Óp. Cit

<sup>60</sup> LEE, SHI, VENDITTI, and JAMEEL, Óp. Cit.

<sup>61</sup> CEBREIROS, CLAVIJO, BOIX, FERRARI, and LAREO

<sup>62</sup> CARA, C.; RUIZ, E.; OLIVA, J. M.; SÁEZ, F. and CASTRO, E. "Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 6, pp. 1869–1876, 2008, doi: 10.1016/j.biortech.2007.03.037

**3.1.2 Modelo cinético.** Se simuló un modelo matemático que describe con precisión el comportamiento que sigue la hidrólisis enzimática de la cáscara de cacao. Este modelo sigue las ecuaciones propuestas por Kadam *et.al.*,<sup>63</sup>, así, la cinética que describe la hidrólisis enzimática incluye un conjunto de variables capaces de describir un amplio rango de condiciones tales como temperatura, concentración de enzima y concentración de celulosa.

Además, de las principales inhibiciones que el modelo tiene en cuenta, este incluyó la variable del efecto de la temperatura, desarrollando un modelo más completo que se ajusta con precisión a las condiciones experimentales reales, por este motivo el proyecto desarrollado en el presente trabajo siguió el modelo desarrollado por este autor.

## 3.2 SIMULACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

La simulación del modelo cinético se realizó por medio de un algoritmo desarrollado en el software MATLAB. Para tal, se definió un sistema de ecuaciones lineales que representa la absorción enzimática (Ec.6 y Ec.7), resolviendo los parámetros  $E_{1F}$ ,  $E_{1B}$ ,  $E_{2F}$  y  $E_{2B}$ . Luego, para la velocidad de reacción en el balance de masa se planteó un sistema de ecuaciones diferenciales. Dichas ecuaciones se resolvieron usando la función ODE 45 de Matlab que utiliza el método Runge-Kutta de cuarto orden. Se monitoreó la concentración de celulosa, celobiosa y glucosa en función del tiempo. La curva que describe la concentración de glucosa fue analizada para calcular la velocidad inicial de reacción en el software Curve Expert. En cada rango de valores se realizó un seguimiento que consistió en el ajuste de una ecuación

---

<sup>63</sup> KADAM, RYDHOLM, and MCMILLAN, Óp. Cit.

polinómica, la cual, fue derivada y evaluada en tiempo cero. A través de este procedimiento se calculó el valor de la velocidad inicial de todas las corridas de simulación que fueron planteadas en el diseño experimental.

En el programa Statgraphics, se realizó el análisis de la velocidad inicial, a fin de identificar la importancia de las variables (concentración de enzima, concentración de celulosa y temperatura). Para esto, se propuso un diseño experimental (Anexo E) factorial  $3^k$ , de factores, A: concentración de enzima [g/L] evaluado en un rango de 15-60, B: temperatura [K] entre 303.15 – 328.15 y C: concentración de celulosa [g/kg] entre 20-60 para un total de 27 experimentos. Así, mediante un análisis de varianza (ANOVA) se determinó cuáles de los factores tienen una significancia estadística sobre la velocidad inicial de producción de glucosa.

### **3.3 EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE PRODUCCIÓN DE GLUCOSA**

La reactividad del sustrato ( $R_s$ ) depende de la concentración de celulosa en el material lignocelulósico y también del parámetro alfa, el cual asume un valor de 1, cuando, de todos los componentes existentes en dicha BL solo la celulosa es quien va a reaccionar. En el caso estudiado, se comenzó la reacción con un alfa de 1, al igual que lo reportado por Kadam, Rydholm, and McMillan<sup>64</sup>. Sin embargo, la cáscara de cacao está compuesta por lignina, hemicelulosa, entre otros. Por lo tanto, es necesario evaluar alfas con valores menores a 1, para así identificar como los componentes secundarios de la cáscara de cacao podrían afectar la concentración de glucosa obtenida. Por ejemplo, Benalcazar J.,<sup>65</sup> mostró, que el contenido inicial de celulosa en la cáscara de cacao era de 25.34% sin pretratar y el máximo disponible en dicho material solo llegaría a un 60.56% con un

---

<sup>64</sup> KADAM, RYDHOLM, and MCMILLAN, Óp. Cit.

<sup>65</sup> BENALCAZAR, Óp. Cit.

pretratamiento alcalino, es por ello que el rango elegido de alfa, se aproximó de acuerdo a los porcentajes anteriormente mencionados entre valores de 0.2 y 0.6. Finalmente se analizaron las velocidades de producción de glucosa obtenidas con este cambio y se comparó con la información reportada en la literatura.

## 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1 PRETRATAMIENTOS

**4.1.1 Pretratamiento alcalino.** Según los autores Cardona et al.,<sup>66</sup>, Torres Jaramillo et al.,<sup>67</sup>, Albernas Carvajal et al.<sup>68</sup>, Kang et al.<sup>69</sup>, Wang et al.,<sup>70</sup> una de las principales ventajas del pretratamiento alcalino es la remoción eficiente de la lignina en la estructura de la BL. Por ejemplo, Jaramillo et al.,<sup>71</sup> y Wang Z. *et al.*,<sup>72</sup> encontraron que el porcentaje de remoción de lignina (resta del % lignina antes y posterior al pretratamiento) para el aserrín y el pasto de bermudas fue de 5 y 14.42% (valor mínimo y máximo encontrados en la revisión bibliográfica), respectivamente; comparado con el 1.3 y 2.77% obtenido por el pretratamiento ácido para el aserrín y el bambú indú, respectivamente<sup>73,74</sup>. Estos resultados demuestran la eficiencia del tratamiento alcalino y según los autores puede utilizarse en diferentes tipos de materiales lignocelulósicos.

---

<sup>66</sup> CARDONA, E.M.; RIOS, J.A.; PEÑA, J.D. and RIOS, L.A. “Pretratamiento Alcalino de Pasto Elefante (*Pennisetum* sp) y King Grass (*Pennisetum hybridum*) Cultivados en Colombia para la Producción de Bioetanol,” *Inf. Tecnol.*, vol. 24, no. 5, pp. 69–80, 2013, doi: 10.4067/S0718-07642013000500009

<sup>67</sup> TORRES JARAMILLO, MORALES VÉLEZ, and QUINTERO DÍAZ, Óp. Cit.

<sup>68</sup> ALBERNAS CARVAJAL, CORSANO, MESA GARRIGA, SANTOS HERRERO, and GONZALES SUÁREZ, Óp. Cit.

<sup>69</sup> KANG, K.E.; JEONG, G.T. and PARK, D.H. “Pretreatment of rapeseed straw by sodium hydroxide,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 35, no. 5, pp. 705–713, 2012, doi: 10.1007/s00449-011-0650-8

<sup>70</sup> WANG, Z.; KESHWANI, D. R.; REDDING, A. P. and CHENG, J. J. “Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass,” *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 10, pp. 3583–3585, 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.097

<sup>71</sup> TORRES JARAMILLO, MORALES Vélez, and QUINTERO DÍAZ, Óp. Cit.

<sup>72</sup> WANG, KESHWANI, REDDING, and CHENG, Óp. Cit.

<sup>73</sup> CARDONA, RIOS, PEÑA, and RIOS, Óp. Cit.

<sup>74</sup> SINDHU, R.; KUTTIRAJA, M.; BINOD, P.; SUKUMARAN, R. K. and PANDEY, A. “Bioethanol production from dilute acid pretreated Indian bamboo variety (*Dendrocalamus* sp.) by separate hydrolysis and fermentation,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 52, pp. 169–176, 2014, doi: 10.1016/j.indcrop.2013.10.021

Benalcazar J.,<sup>75</sup> utilizó el pretratamiento alcalino para tratar la cáscara de cacao (CCN51) que contenía 25.34 % de celulosa y 46.61% de lignina. Los autores observaron que la composición de la cáscara de cacao fue modificada tras el pretratamiento, mostrando un crecimiento significativo en el porcentaje de lignina removida (14.61%), demostrando la eficiencia y versatilidad de este pretratamiento.

**4.1.2 Pretratamiento ácido.** Por otro lado, el pretratamiento ácido remueve la hemicelulosa presente en la estructura de la BL<sup>76,77,78,79</sup>. Según Cardona et al.,<sup>80</sup> y Castillo Saldarriaga & Velásquez Lozano,<sup>81</sup> el porcentaje de hemicelulosa removido (resta del % hemicelulosa antes y posterior al pretratamiento) en el aserrín y pasto de guinea y fue de 0.7 y 12.3% (valor mínimo y máximo encontrados en la revisión bibliográfica), comparado con el porcentaje de hemicelulosa removido para la cascarilla de arroz y bagazo de caña 2.7 y 11.2%, usando un pretratamiento alcalino.<sup>82</sup> De esta forma se demuestra que el pretratamiento ácido genera resultados satisfactorios y podrían ser implementados en la remoción de la hemicelulosa en la cáscara de cacao, se espera que siguiendo la metodología propuesta por Cardona et al.,<sup>83</sup> y Castillo Saldarriaga & Velásquez Lozano<sup>84</sup> se obtengan porcentajes de remoción de hemicelulosa en la cáscara de cacao

---

<sup>75</sup> BENALCAZAR, Óp. Cit.

<sup>76</sup> CARDONA, RIOS, PEÑA, and RIOS, Óp. Cit.

<sup>77</sup> CASTILLO SALDARRIAGA, C. R. and VELÁSQUEZ LOZANO, M. E. “Efecto del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido sobre la hidrólisis enzimática del *Panicum maximum*,” *Biotecnol. en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial*, vol. 16, no. 1, pp. 68–79, 2018, [Online]. Available: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612018000100068&lang=es%0Ahttp://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v16n1/1692-3561-bsaa-16-01-00068.pdf](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612018000100068&lang=es%0Ahttp://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v16n1/1692-3561-bsaa-16-01-00068.pdf)

<sup>78</sup> CARA, RUIZ, OLIVA, SÁEZ, and CASTRO, Óp. Cit

<sup>79</sup> KUGLARZ, M.; ALVARADO-MORALES, M.; DĄBKOWSKA, K. and ANGELIDAKI, I. “Integrated production of cellulosic bioethanol and succinic acid from rapeseed straw after dilute-acid pretreatment,” *Bioresour. Technol.*, vol. 265, no. April, pp. 191–199, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2018.05.099

<sup>80</sup> CARDONA, RIOS, PEÑA, and RIOS, Óp. Cit.

<sup>81</sup> CASTILLO SALDARRIAGA and VELÁSQUEZ LOZANO, Óp. Cit.

<sup>82</sup> Ibid.

<sup>83</sup> CARDONA, RIOS, PEÑA, and RIOS, Óp. Cit.

<sup>84</sup> CASTILLO SALDARRIAGA and VELÁSQUEZ LOZANO, Óp. Cit.

similares a los obtenidos en los diferentes materiales lignocelulósicos y reportados en los trabajos descritos anteriormente.

**4.1.3 Pretratamiento hidrotérmico.** El pretratamiento hidrotérmico es utilizado ampliamente en la recuperación de la celulosa (resta del % celulosa antes y posterior al pretratamiento) y puede ser útil para la remoción de la hemicelulosa presente en la BL<sup>85, 86, 87, 88, 89</sup>. Brandon S. *et al.*,<sup>90</sup> y Cebreiros F. *et al.*,<sup>91</sup> trataron el pasto T85 y el aserrín de eucalipto (respectivamente) mediante un pretratamiento hidrotérmico, encontrando eficiencias de recuperación cercanas a 6.5 y 17.1% (valor mínimo y máximo encontrados en la revisión bibliográfica), respectivamente para la celulosa, mientras tanto, la remoción de la hemicelulosa alcanzó valores de 7.6% para el pasto T85 y 20.7% para el bagazo de caña. Otros autores han reportado valores inferiores demostrando pérdidas en la eficiencia del tratamiento como es el caso de Cardona M. *et al.*,<sup>92</sup> donde el porcentaje de recuperación de celulosa fue de 6.2% (aserrín) y de 0.7% para la remoción de la hemicelulosa en la aplicación del pretratamiento ácido<sup>93</sup>.

---

<sup>85</sup> BRANDON, S. K.; SHARMA, L. N.; HAWKINS, G. M.; ANDERSON, W. F.; CHAMBLISS, C. K. and DORAN-PETERSON, J. "Ethanol and co-product generation from pressurized batch hot water pretreated T85 bermudagrass and Merkeron napiergrass using recombinant *Escherichia coli* as biocatalyst," *Biomass and Bioenergy*, vol. 35, no. 8, pp. 3667–3673, 2011, doi: 10.1016/j.biombioe.2011.05.021

<sup>86</sup> YU, Q. *et al.*, "Liquid hot water pretreatment of sugarcane bagasse and its comparison with chemical pretreatment methods for the sugar recovery and structural changes," *Bioresour. Technol.*, vol. 129, pp. 592–598, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.099

<sup>87</sup> LEE, J. M.; SHI, J.; VENDITTI, R. A. and JAMEEL, H. "Autohydrolysis pretreatment of Coastal Bermuda grass for increased enzyme hydrolysis," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 24, pp. 6434–6441, 2009, doi: 10.1016/j.biortech.2008.12.068

<sup>88</sup> CEBREIROS, F.; CLAVIJO, L.; BOIX, E.; FERRARI, M. D. and LAREO, C. "Integrated valorization of eucalyptus sawdust within a biorefinery approach by autohydrolysis and organosolv pretreatments," *Renew. Energy*, vol. 149, pp. 115–127, 2020, doi: 10.1016/j.renene.2019.12.024

<sup>89</sup> RIOS-GONZÁLEZ, L. J. *et al.*, "Autohydrolysis pretreatment assessment in ethanol production from agave bagasse," *Bioresour. Technol.*, vol. 242, pp. 184–190, 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.03.039

<sup>90</sup> BRANDON, SHARMA, HAWKINS, ANDERSON, CHAMBLISS, and J. DORAN-PETERSON, Óp. Cit.

<sup>91</sup> CEBREIROS, CLAVIJO, BOIX, FERRARI, and LAREO, Óp. Cit.

<sup>92</sup> CARDONA, RIOS, PEÑA, and RIOS, Óp. Cit.

<sup>93</sup> *Ibid.*

Con base en los resultados encontrados por estos autores se determinó la diferencia porcentual para cada uno de los ensayos. De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 2 se seleccionaron los materiales que presentaron una diferencia  $\leq 20\%$ . Los valores que entraron dentro de este margen corresponden a los materiales lignocelulósicos con un porcentaje de celulosa cercano o similar al porcentaje de celulosa reportado para la cáscara de cacao según trabajos desarrollados por otros autores. Los valores resaltados en la Tabla 2 cumplen con el margen de error definido y fueron seleccionados para determinar el material con la mayor liberación de celulosa posterior al pretratamiento.

**Tabla 2. Diferencia porcentual de la celulosa**

DIFERENCIA PORCENTUAL DE CELULOSA					
BL	Pretratamiento Alcalino	BL	Pretratamiento Ácido	BL	Pretratamiento Hidrotérmico
Pasto de elefante (1) <sup>94</sup>	24,72	Aserrín (9) <sup>95</sup>	21,92	Pasto T85 (16) <sup>96</sup>	16,59
King Grass (2) <sup>97</sup>	21,39	Cascarilla de arroz (10) <sup>98</sup>	14,59	Pasto Merkeron (17) <sup>99</sup>	30,58
Aserrín (3) <sup>100</sup>	21,92	Bagazo de caña (11) <sup>101</sup>	8,93	Bagazo de caña (18) <sup>102</sup>	50,57

<sup>94</sup> CARDONA, RIOS, PEÑA, and RIOS, Óp. Cit.

<sup>95</sup> Ibid.

<sup>96</sup> BRANDON, SHARMA, HAWKINS, ANDERSON, CHAMBLISS, and J. DORAN-PETERSON, Óp. Cit.

<sup>97</sup> CARDONA, RIOS, PEÑA, and RIOS, Óp. Cit.

<sup>98</sup> Ibid.

<sup>99</sup> BRANDON, SHARMA, HAWKINS, ANDERSON, CHAMBLISS, and J. DORAN-PETERSON, Óp. Cit.

<sup>100</sup> TORRES JARAMILLO, MORALES VÉLEZ, and QUINTERO DÍAZ, Óp. Cit.

<sup>101</sup> CARDONA, RIOS, PEÑA, and RIOS, Óp. Cit.

<sup>102</sup> ZHANG, Y.; DI, X.; XU, J.; SHAO, J.; QI, W. and YUAN, Z. "Effect of LHW, HCl, and NaOH pretreatment on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse: sugar recovery and fractal-like kinetics," *Chem. Eng. Commun.*, vol. 206, no. 6, pp. 772–780, 2019, doi: 10.1080/00986445.2018.1525365

DIFERENCIA PORCENTUAL DE CELULOSA					
BL	Pretratamiento Alcalino	BL	Pretratamiento Ácido	BL	Pretratamiento Hidrotérmico
Cascarilla de arroz (4) <sup>103</sup>	14,59	Pasto de guinea (12) <sup>104</sup>	5,40	Pasto de Bermudas (19) <sup>105</sup>	1,27
Bagazo de caña (5) <sup>106</sup>	8,93	Bambú Indú (13) <sup>107</sup>	40,57	Aserrín de eucalipto (20) <sup>108</sup>	43,90
Cáscara de coco (6) <sup>109</sup>	17,72	Olivo (14) <sup>110</sup>	16,72	Bagazo de agave (21) <sup>111</sup>	30,91
Paja de colza (7) <sup>112</sup>	13,02	Paja de colza (15) <sup>113</sup>	18,25		
Pasto costero de Bermudas (8) <sup>114</sup>	14,76				

\*  $\%Diferencia\ de\ Ci = \frac{\%Ci\ cáscara\ de\ cacao - \%Ci\ BL}{\%Ci\ cáscara\ de\ cacao}$  ; \* Donde los valores (x) indican el material utilizado presente en la figura 3.

La composición de los materiales seleccionados, fue analizada antes y después del pretratamiento (porcentaje de celulosa) y los resultados obtenidos por los autores son mostrados en la Figura 3.

<sup>103</sup> TORRES JARAMILLO, MORALES VÉLEZ, and QUINTERO DÍAZ, Óp. Cit.

<sup>104</sup> CASTILLO SILDARRIAGA and VELÁSQUEZ LOZANO, Óp. Cit.

<sup>105</sup> LEE, SHI, VENDITTI, and JAMEEL, Óp. Cit.

<sup>106</sup> TORRES JARAMILLO, MORALES VÉLEZ, and QUINTERO DÍAZ, Óp. Cit.

<sup>107</sup> SINDHU, KUTTIRAJA, BINOD, SUKUMARAN, and PANDEY, Óp. Cit.

<sup>108</sup> CEBREIROS, CLAVIJO, BOIX, FERRARI, and LAREO, Óp. Cit.

<sup>109</sup> ALBERNAS CARVAJAL, CORSANO, MESA GARRIGA, SANTOS HERRERO, and GONZALES SUÁREZ, Óp. Cit.

<sup>110</sup> CARA, RUIZ, OLIVA, SÁEZ, and CASTRO, Óp. Cit.

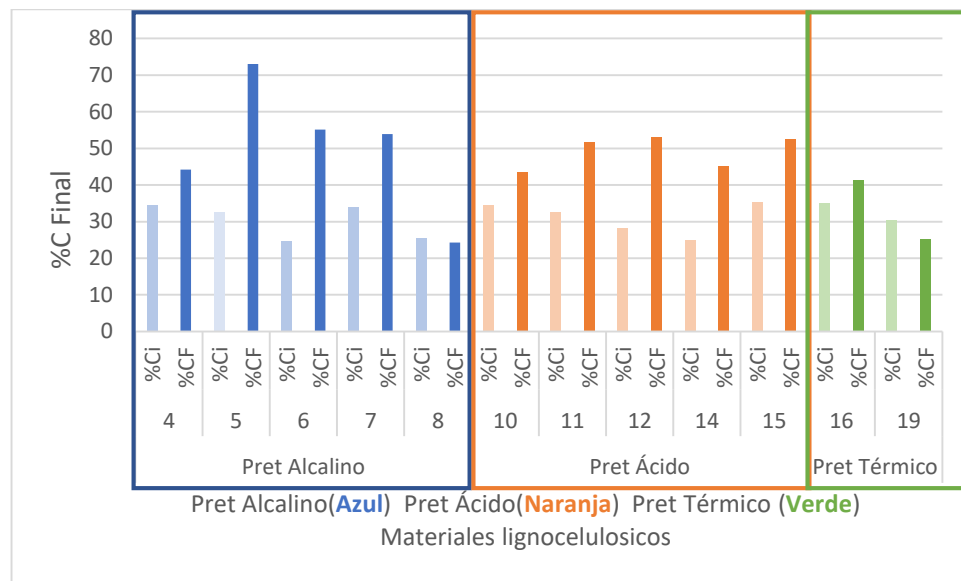
<sup>111</sup> RIOS-GONZÁLEZ, *et.al*, Óp. Cit.

<sup>112</sup> KANG, JEONG, and PARK, Óp. Cit.

<sup>113</sup> KUGLARZ, ALVARADO-MORALES, DĄBKOWSKA, and ANGELIDAKI, Óp. Cit.

<sup>114</sup> WANG, KESHWANI, REDDING, and CHENG, Óp. Cit.

**Figura 3. Porcentaje de celulosa inicial (%Ci) y después del pretratamiento (%CF) en los diferentes materiales lignocelulósicos**



\* 4 cascarilla de arroz, 5 bagazo de caña, 6 cáscara de coco, 7 paja de colza, 8 pasto costero de bermudas, 10 cascarilla de arroz, 11 bagazo de caña, 12 pasto de guinea, 14 olivo, 15 paja de colza, 16 pasto T85, 19 pasto de bermudas.

La figura 3 muestra que los materiales lignocelulósicos que obtuvieron un porcentaje de celulosa superior a la concentración inicial corresponden a los materiales pretratados con el pretratamiento alcalino y ácido. En el caso del pretratamiento alcalino, los materiales 5 y 6 alcanzaron porcentajes de recuperación de celulosa mayores al 55%. Este comportamiento también fue observado en los materiales con pretratamiento ácido, observándose, un porcentaje de recuperación para los materiales lignocelulósicos 12 y 15 de 53 y 52.5%, respectivamente.

Por otro lado, los materiales pretratados con el tratamiento hidrotérmico mostraron un comportamiento diferenciado. En la figura 3 se observó que la concentración de celulosa (después del pretratamiento) sufrió una caída importante comparada con los resultados obtenidos en los tratamientos alcalino y ácido. Por ejemplo, la concentración de celulosa luego del pretratamiento hidrotérmico fue de 41.5% para

el pasto T85 (comparado con porcentajes superiores al 55% obtenidos en los tratamientos alcalino y ácido), siendo así, la recuperación de celulosa tan solo del 6.5%. A pesar de observar un cambio favorable en la concentración final, es evidente que no es significativo, por lo que los pretratamientos alcalino y ácido son mejores para la recuperación de celulosa en los materiales lignocelulósicos.

De esta forma y basados en los resultados observados en la Figura 3, el bagazo de caña (material 5) mostró resultados superiores (porcentaje de recuperación de celulosa igual a 40.3%) comparados con los demás materiales lignocelulósicos tratados. De esta forma, se demostró que el bajo los parámetros establecidas por los autores<sup>115, 116, 117, 118, 119</sup> el pretratamiento alcalino es superior, y por tanto podría suponerse que es el más indicado para pretratar materiales lignocelulósicos para el presente estudio.

## 4.2 MODELO CINÉTICO

La resolución del sistema de ecuaciones no lineales (Ec.6 y Ec.7), se llevó a cabo en el programa de Matlab por la función SOLVE, en donde se obtuvieron los valores de  $E_{1b}$ ,  $E_{1f}$ ,  $E_{2b}$  y  $E_{2f}$ . Dichos valores se ingresaron en el sistema de ecuaciones diferenciales del modelo cinético, teniendo en cuenta que cambiaban de acuerdo con la concentración de enzima ingresada según el diseño experimental planteado por el programa STATGRAPHICS. En total se desarrollaron 27 experimentos y las gráficas del seguimiento en la concentración de celulosa, celobiosa y glucosa para

---

<sup>115</sup> CARDONA, RIOS, PEÑA, and RIOS, Óp. Cit.

<sup>116</sup> TORRES JARAMILLO, MORALES VÉLEZ, and QUINTERO DÍAZ, Óp. Cit.

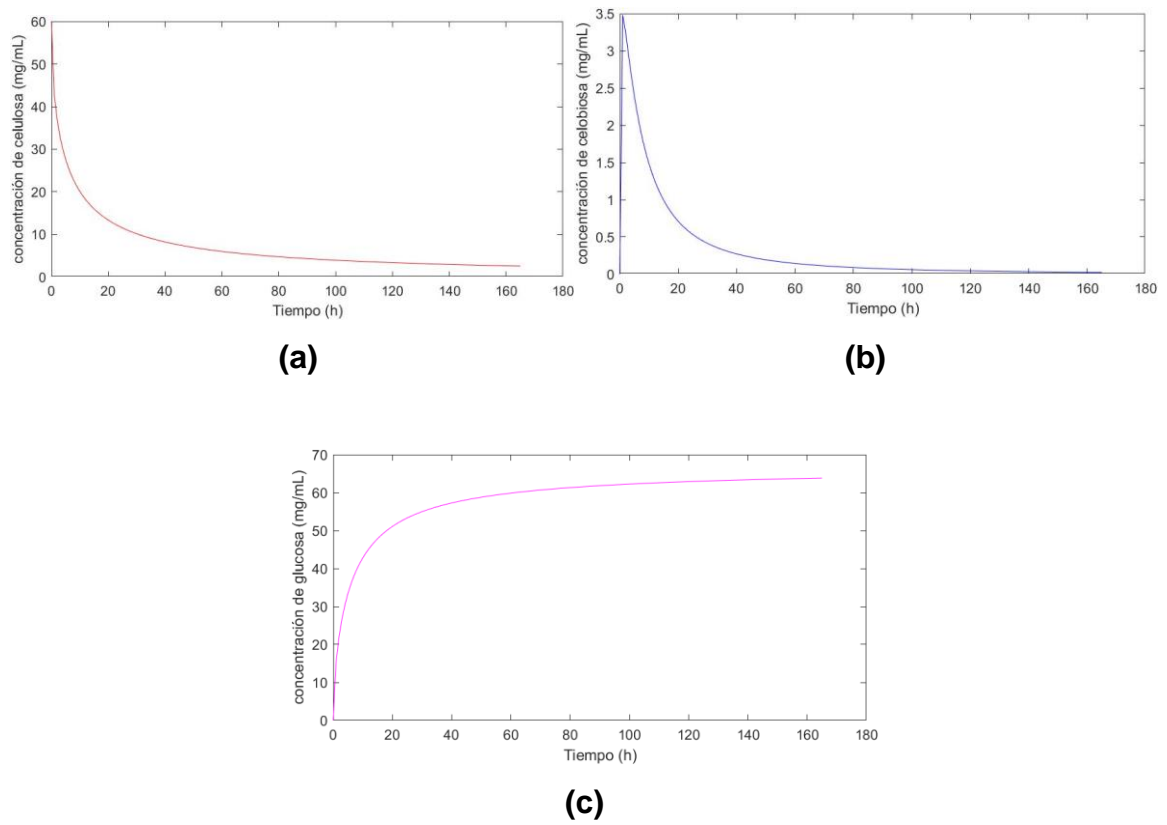
<sup>117</sup> ALBERNAS CARVAJAL, CORSANO, MESA GARRIGA, SANTOS HERRERO, and GONZALES SUÁREZ, Óp. Cit

<sup>118</sup> KANG, JEONG, and PARK, Óp. Cit.

<sup>119</sup> WANG, KESHWANI, REDDING, and CHENG, Óp. Cit.

el experimento con el que se obtuvieron los mejores resultados (mostrado más adelante) se muestran en la figura 4.

**Figura 4. Variación de la concentración**



\* **a)** Celulosa **b)** Celobiosa y **c)** Glucosa en el tiempo

Las curvas de concentración de celulosa, celobiosa y glucosa obtenidos, sigue un patrón de comportamiento similar al descrito por Kadam et.al.<sup>120</sup>, de esta manera se asegura la confiabilidad en el código simulado.

<sup>120</sup> KADAM, RYDHOLM, and MCMILLAN, Óp. Cit.

Se pudo observar en la figura 4a el seguimiento de la concentración de celulosa en el tiempo, que como puede observarse va disminuyendo debido a su consumo para la producción de celobiosa (Figura 4b), la cual, alcanza un pico máximo de concentración para luego decaer y convertirse en glucosa. En la Figura 4c la mayor parte de la glucosa producida se obtiene en los primeros tiempos (entre la hora 20 y 40) de hidrólisis. Esto se observó en todos los experimentos alcanzándose en promedio de 77.64 y 88.36% respectivamente, del máximo de concentración de glucosa en el medio. Lo cual indica que el proceso no necesita tiempos largos de hidrólisis, debido a que alcanza sus mayores picos de concentración de glucosa para la hora 40 aproximadamente.

Es por esto que el análisis de la velocidad inicial en cada uno de los experimentos fue llevado a cabo, debido a que éste permite determinar la rapidez con la que se genera la glucosa.

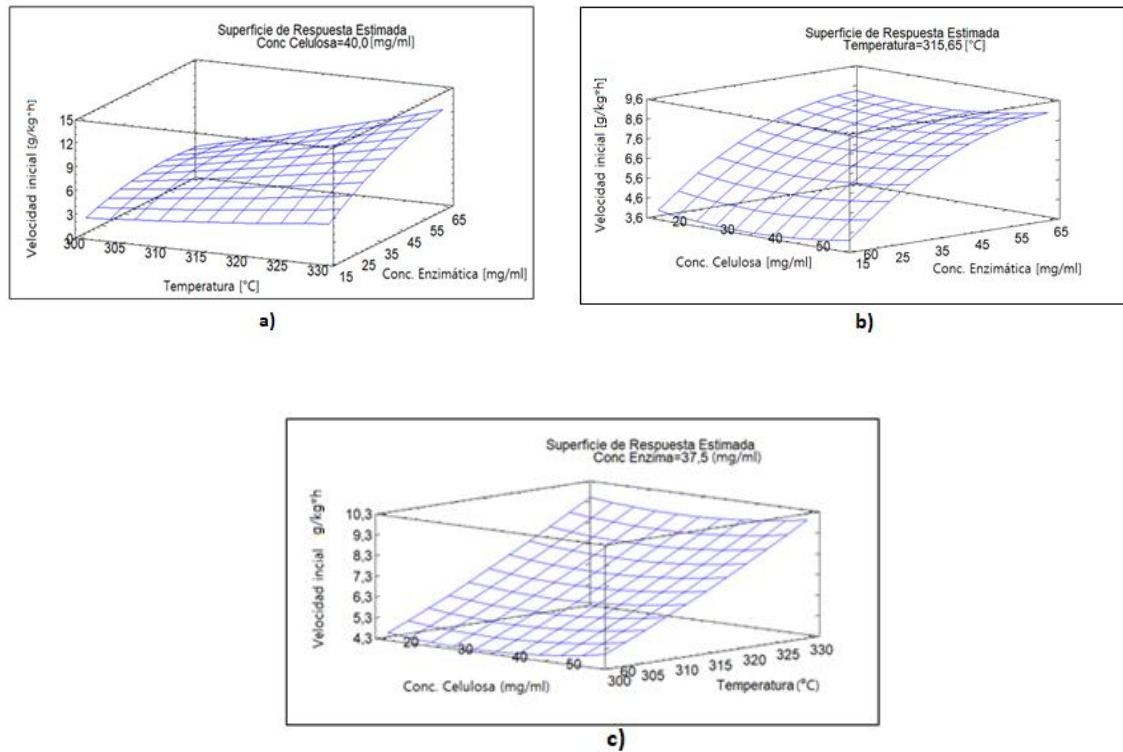
**4.2.1 Cálculo de la velocidad inicial.** Los datos de concentración de glucosa en el tiempo, para cada uno de los 27 experimentos fueron graficados por el programa CurveExpert y se ajustaron los datos al “modelo racional” (Anexo F). Este modelo mostró un excelente ajuste de los datos con un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) del 0.9984.

$$y = \frac{a + b * x}{1 + cx * +d * x^2} \quad (\text{Ec. 16})$$

En donde a, b, c y d, son los parámetros que ajustan cada curva. Una vez ajustada la curva, se llevó a cabo la determinación de las velocidades iniciales por medio de la primera derivada de la ecuación 16 para cada experimento en un  $t=0$ . Por lo tanto, los resultados para las demás velocidades iniciales encontradas se muestran en el Anexo G. Luego, en la Figura 5 se comparó como afectaba las variables de entrada

(concentración de enzima, temperatura y concentración de celulosa) en la velocidad inicial.

**Figura 5. Superficie de respuesta estimada en el punto medio**

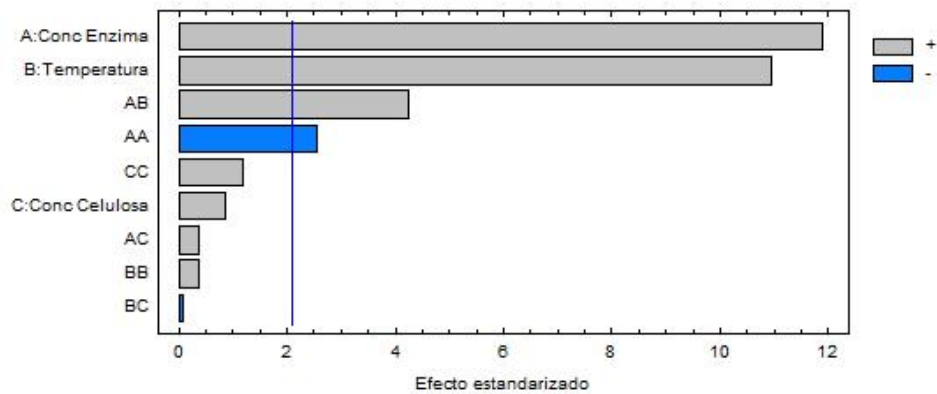


\* a) Concentración de celulosa b) Temperatura c) Concentración de enzima

Al observar el dominio en las superficies de nivel, puede denotarse que aquella superficie con mayor alcance en la velocidad inicial es la figura 5a, con tendencia a un máximo que llega a los 12 [g/kg·h]. Dicha figura, fija como punto central a la concentración de celulosa, dejando a las variables de entrada temperatura y concentración de enzima, como aquella configuración que marca mejor la tendencia a un máximo en la velocidad inicial.

Como resultado del análisis experimental, llevado a cabo en el programa StatGraphics, se encontró que el estadístico  $R^2$  que ajustaba los datos fue de 94.43%, dando seguridad a los resultados ilustrados. El diagrama de Pareto mostrado en la figura 6, muestra que las variables A: Concentración de enzima, B: Temperatura y C: Concentración de celulosa, junto con las combinaciones entre ellas son significativas para la velocidad inicial. Como se puede observar, la variable con mayor efecto, fue la de la concentración enzimática seguida de la temperatura.

**Figura 6. Diagrama de Pareto estandarizado para velocidad inicial**



La barra azul que marca el efecto cuadrático AA de la concentración de la enzima en dicha figura, hace referencia a una curvatura generada en el eje X (Concentración de enzima) que se muestra levemente en la superficie de nivel dentro de la figura 5 a). Como dicha curvatura no es predominante en los efectos cuadráticos BB y CC, estos no son significativos sobre la velocidad inicial.

De igual manera, podría corroborarse la anterior afirmación de acuerdo con el valor-P obtenido, donde la significancia se encontraba para valores de P menores a 0.05 (ver Tabla 3), quedando descartados nuevamente los efectos cuadráticos BB y CC

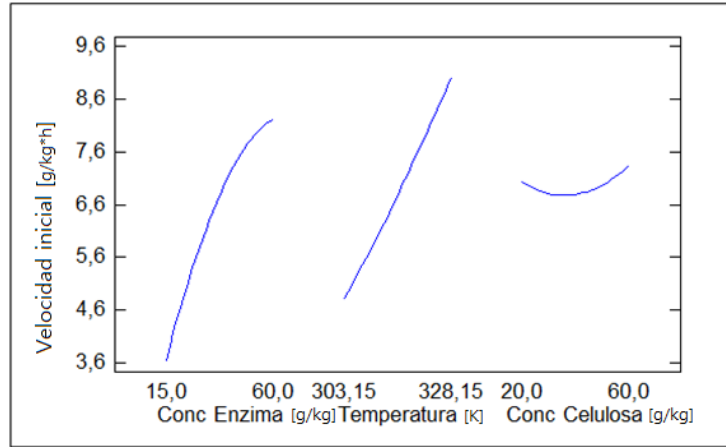
y prevaleciendo los efectos de primer orden (A y B) al tener un valor-P dentro del rango ( $\alpha \leq 0.05$ ) establecido, todo esto dándose con un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 3. Efectos estimados para la velocidad inicial**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Conc Enzima	93,5229	1	93,5229	141,35	0,0000
B: Temperatura	79,4178	1	79,4178	120,03	0,0000
C: Conc Celulosa	0,492263	1	0,492263	0,74	0,4004
AA	4,29667	1	4,29667	6,49	0,0208
AB	11,9155	1	11,9155	18,01	0,0005
AC	0,0968403	1	0,0968403	0,15	0,7068
BB	0,0928522	1	0,0928522	0,14	0,7126
BC	0,00277552	1	0,00277552	0,00	0,9491
CC	0,94145	1	0,94145	1,42	0,2493
Error total	11,2483	17	0,661663		
Total (corr.)	202,027	26			

Por último, el valor óptimo encontrado para la serie de experimentos realizados, fue denotado en la figura 7, donde las líneas azules indican el rango en que se manejó la concentración de enzima, temperatura y concentración de celulosa, respectivamente. El seguimiento de estas líneas muestra que, a mayor rango tomado para cada una de las variables, existirá un efecto más significativo sobre la velocidad inicial, por lo tanto, para la concentración de enzima, el mayor valor de concentración trabajado sería de 60g/kg en la temperatura de 328.15 K y finalmente para la concentración de la celulosa un valor de 60 g/kg sería lo registrado.

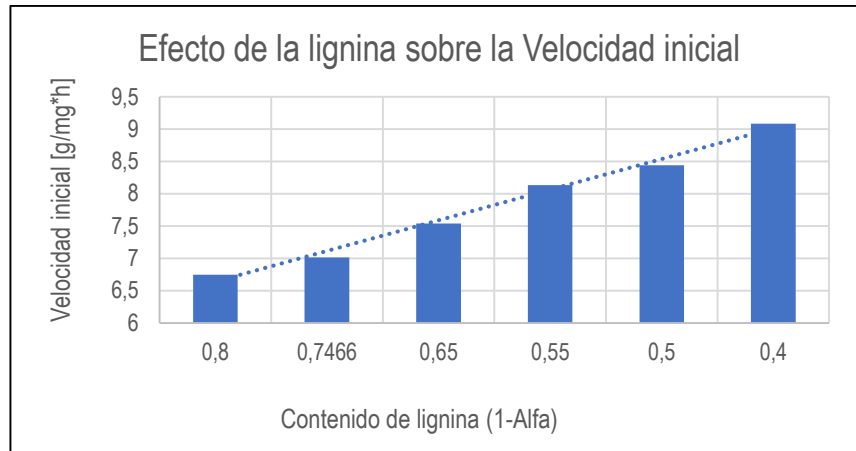
**Figura 7. Efectos principales para la velocidad inicial**



**4.2.2 Modelo trabajado con alfas inferiores a uno.** Recordando que alfa ( $\alpha$ ) asumió un valor de 1 para indicar que toda la cáscara de cacao reaccionaría en la hidrólisis enzimática solo como celulosa, fue necesario apreciar que existían otros componentes dentro del material como la lignina, hemicelulosa, entre otros polímeros. Por lo tanto, se asumieron valores de alfa en el rango de 0.2 y 0.6 definidos anteriormente, donde se aproximaría la idea que  $1 - \alpha$  correspondería a la intervención de la lignina dentro del material. Estos valores fueron ingresados al código de Matlab, teniendo en cuenta que la concentración de enzima y celulosa, al igual que la temperatura fue establecida para este caso con el valor óptimo hallado, permitiendo así, encontrar el seguimiento de la concentración de glucosa en el tiempo para cada uno de ellos.

Luego de esto, por medio del programa CurveExpert, se encontraron las velocidades iniciales para cada alfa.

**Figura 8. Efecto de la lignina sobre la velocidad inicial**



Finalmente, se analizó el seguimiento de datos de la velocidad inicial, con los valores de 1-alfa mostrados en la figura 8. La tendencia encontrada, fue muy similar a lo trabajado por los autores R, Sun. *et.al.*,<sup>121</sup> en donde estudiaron el efecto de la lignina sobre la concentración de glucosa obtenida al final del proceso. De igual forma, en la tendencia de la figura se observa que la dependencia de la lignina sobre velocidad inicial es inversa, es decir, a menor concentración de lignina mayor es el valor alcanzado por la velocidad inicial.

<sup>121</sup> SUN, R.; SONG, X.; SUN, R. and JIANG, J. "Effect of lignin content on enzymatic hydrolysis of furfural residues," *BioResources*, vol. 6, no. 1, pp. 317–328, 2011, doi: 10.15376/biores.6.1.317-328

## 5. CONCLUSIONES

Se observó que el pretratamiento alcalino, ácido e hidrotérmico presentaban remociones máximas de lignina de hasta 14.42, 2.77 y 4.4% respectivamente, remociones de hemicelulosa de 11.2, 12.3 y 20.7% y recuperación de celulosa de 40.3, 24.6 y 17.1%; mostrando que la mejor recuperación de celulosa se obtenía implementando el pretratamiento alcalino.

A partir del análisis estadístico, se obtuvo que el efecto de la concentración enzimática sobre la velocidad inicial de liberación de glucosa, fue la más significativa seguida de la temperatura, de acuerdo a lo registrado por el diagrama de Pareto en la figura 10, donde el valor-P confirmaba estos resultados con un valor del estadístico ( $\alpha$ ) menor a 0.05 (nivel de confianza del 95%).

Se determinó que el valor óptimo de la velocidad inicial sobre la producción de glucosa fue de 11.866 [g/kg\*h], para las condiciones de temperatura, concentración de enzima y celulosa de 328.15 K, 60 [g/kg] y 60 [g/kg], respectivamente.

## 6. RECOMENDACIONES

- La elección del modelo cinético se podría plantear con otros tipos de inhibición como la inactivación térmica, teniéndose en cuenta el delta H dentro de la reacción de hidrólisis presentada en las ecuaciones 8, 9 y 10 al igual que material bibliográfico que muestre los resultados de concentraciones y demás condiciones de operación, con las cuales se pueda comparar en una simulación.

$$K_D = A_D * e^{\frac{-\Delta H}{RT}} \quad (\text{Ec. 17})$$

- El seguimiento del consumo de glucosa luego del proceso de hidrólisis para la producción de alcoholes, se podría llevar a cabo en un trabajo posterior a éste, mediante otra herramienta de simulación para conocer los rendimientos presentes en el proceso, al igual que la posibilidad de optimizar datos de la cinética enzimática.
- El estudio de la reacción de hidrólisis se podría apreciar con otros componentes comunes en la degradación enzimática de los materiales lignocelulósicos, como es el caso de la obtención de xilosas y pentosas dentro de la ruta de reacciones, aproximando así, el proceso real con lo simulado.

## BIBLIOGRAFÍA

A. I. N. Press, "Progress in bioethanol processing," vol. 34, pp. 551–573, 2008, doi: 10.1016/j.pecs.2007.11.001

ACEVEDO J., G.O. et al, "Simulación y diseño básico de un reactor de hidrólisis enzimática de bagazo de caña," pp. 1–58, 2008

ALBERNAS CARVAJAL, Y.; CORSANO, G.; MESA GARRIGA, L.; SANTOS

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M. and IRSHAD, M. "Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review," J. Radiat. Res. Appl. Sci., vol. 7, no. 2, pp. 163–173, 2014, doi: 10.1016/j.jrras.2014.02.003

BENALCAZAR, J. "Evaluación de diferentes pretratamientos químicos a la biomasa de la cáscara de cacao para procesos de fermentación alcohólica.," pp. 1–62, 2018

BRANDON, S. K.; SHARMA, L. N.; HAWKINS, G. M.; ANDERSON, W. F.; CHAMBLISS, C. K. and DORAN-PETERSON, J. "Ethanol and co-product generation from pressurized batch hot water pretreated T85 bermudagrass and Merkeron napiergrass using recombinant *Escherichia coli* as biocatalyst," *Biomass and Bioenergy*, vol. 35, no. 8, pp. 3667–3673, 2011, doi: 10.1016/j.biombioe.2011.05.021

CARA, C.; RUIZ, E.; OLIVA, J. M.; SÁEZ, F. and CASTRO, E. "Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 6, pp. 1869–1876, 2008, doi: 10.1016/j.biortech.2007.03.037

CARDONA, E.M.; RIOS, J.A.; PEÑA, J.D. and RIOS, L.A. "Pretratamiento Alcalino de Pasto Elefante (*Pennisetum* sp) y King Grass (*Pennisetum hybridum*) Cultivados en Colombia para la Producción de Bioetanol," *Inf. Tecnol.*, vol. 24, no. 5, pp. 69–80, 2013, doi: 10.4067/S0718-07642013000500009

CARDONA, E.M.; RIOS, J.A.; PEÑA, J.D. and RIOS, L.A. "Pretratamiento Alcalino de Pasto Elefante (*Pennisetum* sp) y King Grass (*Pennisetum hybridum*) Cultivados en Colombia para la Producción de Bioetanol," *Inf. Tecnol.*, vol. 24, no. 5, pp. 69–80, 2013, doi: 10.4067/S0718-07642013000500009

CASTILLO SALDARRIAGA, C. R. and VELÁSQUEZ LOZANO, M. E. "Efecto del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido sobre la hidrólisis enzimática del *Panicum maximum*," *Biotechnol. en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial*, vol. 16, no. 1, pp. 68–79, 2018, [Online]. Available: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612018000100068&lang=es%0Ahttp://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v16n1/1692-3561-bsaa-16-01-00068.pdf](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612018000100068&lang=es%0Ahttp://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v16n1/1692-3561-bsaa-16-01-00068.pdf)

CEBREIROS, F.; CLAVIJO, L.; BOIX, E.; FERRARI, M. D. and LAREO, C. "Integrated valorization of eucalyptus sawdust within a biorefinery approach by autohydrolysis and organosolv pretreatments," *Renew. Energy*, vol. 149, pp. 115–127, 2020, doi: 10.1016/j.renene.2019.12.024

CERDÁ, E. "Energía obtenida a partir de biomasa," *Cuad. Económicos ICE*, no. 83, 2012, doi: 10.32796/cice.2012.83.6036

CHANG, V.S. and HOLTZAPPLE, M.T. "Fundamental Factors Affecting Biomass Enzymatic Reactivity," *Twenty-First Symp. Biotechnol. Fuels Chem.*, vol. 84, pp. 5–37, 2000, doi: 10.1007/978-1-4612-1392-5\_1

DELGADO CRUZ, M.J. and CAMARGO MORA, M.G. "Optimización de los residuos de cascarilla de arroz mediante pretratamiento por hidrólisis ácida para la obtención de azúcares reductores," *Artic. Ecuador*, vol. 1, no. 5, pp. 1–127, 2013

ESKANDRANI, R. M. "Optimización del pretratamiento con peroxido de hidrogeno alcalino del bagazo de caña de azúcar para la producción de glucosa," pp. 2007–2009, 2007

FERRERAS, E. "Expresión y estudio de enzimas termoestables de interés biotecnológico," p. 217, 2011

GÓMEZ, E. A.; RÍOS, L. A. and PEÑA, J. D. Efecto del Pretratamiento de Biomasa Maderera en el Rendimiento a Etanol," *Inf. Tecnol.*, vol. 24, no. 5, pp. 113–122, 2013, doi: 10.4067/S0718-07642013000500013

HERRERO, R. and GONZALES SUÁREZ, E. "Estudio de la cinética de la hidrólisis enzimática del bagazo petratado," *Afinidad Lxxii*, no. 570, pp. 127–132, 2015

IBÁÑEZ, A.I.B.L.D. "Caracterización de biomasa lignocelulósica (THEOBROMA CACAO L) para su uso en la obtención de etanol por via fermentativa," vol. 26, no. 2, pp. 78–79, 1993

KADAM, K. L.; RYDHOLM, E. C. and MCMILLAN, J. D. "Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass," *Biotechnol. Prog.*, vol. 20, no. 3, pp. 698–705, 2004, doi: 10.1021/bp034316x

KANG, K.E.; JEONG, G.T. and PARK, D.H. "Pretreatment of rapeseed straw by sodium hydroxide," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 35, no. 5, pp. 705–713, 2012, doi: 10.1007/s00449-011-0650-8

KUGLARZ, M.; ALVARADO-MORALES, M.; DAŹBKOWSKA, K. and ANGELIDAKI, I. "Integrated production of cellulosic bioethanol and succinic acid from rapeseed straw after dilute-acid pretreatment," *Bioresour. Technol.*, vol. 265, no. April, pp. 191–199, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2018.05.099

LEE, J. M.; SHI, J.; VENDITTI, R. A. and JAMEEL, H. "Autohydrolysis pretreatment of Coastal Bermuda grass for increased enzyme hydrolysis," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 24, pp. 6434–6441, 2009, doi: 10.1016/j.biortech.2008.12.068

MENA ESPINOSA, X. "Obtención de etanol a partir de residuos agroindustriales de plátano," p. 166, 2011

MOHAMMED NABAVI, S. *Obtencion de etanol de segunda generación a partir de biomasa lignocelulósica (cascarilla de arroz) en Tarapoto*, no. 2. 2019

NAVARRO, E. and ABRIL, A. *Etanol a partir de biomasa lignocelulósica*, no. October. 2015

NAZIR, N. - Novelina, Juita E.; Amelia, C. and FATLI, R. "Optimization of Pre-treatment Process of Cocoa Pod Husk Using Various Chemical Solvents," *Int. J. Adv. Sci. Eng. Inf. Technol.*, vol. 6, no. 3, p. 403, 2016, doi: 10.18517/ijaseit.6.3.848

NOGUÉS, F. S. *Energía de la Biomasa (volumen I)*. Prensas Universitarias de Zaragoza, 2010

OCAÑA, B.; DECKER, R. and CARDENAS, G.V. "Cinética de sacarificación y fermentación para producción de bioetanol a partir de cáscara de banano maduro mediante pretratamiento de secado.," 2019, [Online]. Available: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/14088>

OYOLA GILER, P.D. *Identificación de compuestos inhibidores que se forman en el hidrolizado enzimático de celulosa y hemicelulosa presentes en cáscara de arroz.*, vol. 27, no. 3. 2017

RAUD, M.; TUTT, M.; OLT, J. and KIKAS, T. "Effect of Lignin Content on Enzymatic Hydrolysis," *Agron. Res.*, vol. 13, no. 2, pp. 405–412, 2015

RIOS-GONZÁLEZ, L. J. *et al.*, "Autohydrolysis pretreatment assessment in ethanol production from agave bagasse," *Bioresour. Technol.*, vol. 242, pp. 184–190, 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.03.039

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S. and AIKAT, K. "Bioethanol production from agricultural wastes: An overview," *Renew. Energy*, vol. 37, no. 1, pp. 19–27, 2012, doi: 10.1016/j.renene.2011.06.045

SERRANO, N.E.G.Q.L.G.R. "Evaluación del proceso de autohidrólisis del bagazo de fique sobre la producción de metano," *Evaluación del proceso autohidrólisis del bagazo fique sobre la Prod. metano*, vol. 7, no. 6, pp. 1–25, 2012

SINDHU, R.; KUTTIRAJA, M.; BINOD, P.; SUKUMARAN, R. K. and PANDEY, A. "Bioethanol production from dilute acid pretreated Indian bamboo variety (*Dendrocalamus* sp.) by separate hydrolysis and fermentation," *Ind. Crops Prod.*, vol. 52, pp. 169–176, 2014, doi: 10.1016/j.indcrop.2013.10.021

SUN, R.; SONG, X.; SUN, R. and JIANG, J. "Effect of lignin content on enzymatic hydrolysis of furfural residues," *BioResources*, vol. 6, no. 1, pp. 317–328, 2011, doi: 10.15376/biores.6.1.317-328

TAHERZADEH, M. J. and KARIMI, K. *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review*, vol. 9, no. 9. 2008

TORRES JARAMILLO, D.; MORALES VÉLEZ, S.P. and QUINTERO DÍAZ, J.C. "Evaluación de pretratamientos químicos sobre materiales lignocelulósicos," *Ingeniare*, vol. 25, no. 4, pp. 733–743, 2017, doi: 10.4067/S0718-33052017000400733

WANG, Z.; KESHWANI, D. R.; REDDING, A. P. and CHENG, J. J. "Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 10, pp. 3583–3585, 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.097

YU, Q. *et al.*, "Liquid hot water pretreatment of sugarcane bagasse and its comparison with chemical pretreatment methods for the sugar recovery and structural changes," *Bioresour. Technol.*, vol. 129, pp. 592–598, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.099

ZHANG, Y.; DI, X.; XU, J.; SHAO, J.; QI, W. and YUAN, Z. "Effect of LHW, HCl, and NaOH pretreatment on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse: sugar recovery and fractal-like kinetics," *Chem. Eng. Commun.*, vol. 206, no. 6, pp. 772–780, 2019, doi: 10.1080/00986445.2018.1525365

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. and JENKINS, B.M. "Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated Creeping Wild Ryegrass," *Am. Soc. Agric. Biol. Eng. Annu. Int. Meet. 2009, ASABE 2009*, vol. 1, no. 09, pp. 547–570, 2009, doi: 10.13031/2013.26928

## ANEXOS

### ANEXO A. Artículos consultados en el pretratamiento alcalino

**Tabla 4. Condiciones y resultados de los diferentes artículos consultados en el pretratamiento alcalino**

Artículo	Material	% Composición antes del pretratamiento			Condiciones				% Composición después del pretratamiento		
		% C	% H	% L	T [°C]	% NaOH	t [min]	R-S/L	% C	% H	% L
1	Pastos elefante	22.6	20.9	19.4	80 – 120	1%- 2% [p/p]	30- 180	1:15-1:20 [p/p]	-	-	11.6
					<b>Condiciones óptimas pasto elefante</b>						
					100	0.7	120	1:17.5			
	King Grass	23.6	21.9	15.4	<b>Condiciones óptimas King Grass</b>				-	-	6
100					1,5	120	1:13.3				
2	Aserrín	36.6	7.0	38.8	70	10%[p/v]	75	1:10	48.7	7.3	33.8
	Cascarilla de arroz	34.4	9.5	22.1					44.2	6.8	16.2
	Bagazo de caña	32.7	21.3	15.3					73.0	10.1	7.4
3	Cáscara de coco	24.70	12.26	40.10	121	5%	40		55.17	7.80	29.91
4	Paja de colza	33.93	18.52	33.32	30-80	1-9% [p/p]	60-540	1:10	53.9	-	25.98
					<b>Condiciones óptimas</b>						
					67.5	7% [p/p]	180	1:10			
5	Pasto costero de Bermudas	25.59	15.88	19.33	121	0.5-0.75-1-2-3% [p/p]	15-30-60-90	1:10	24.24	11.84	4.91
					<b>Condiciones óptimas</b>						
					121	1	30	1:10			

## ANEXO B. Artículos consultados en el pretratamiento ácido

**Tabla 5. Condiciones y resultados de los diferentes artículos consultados en el pretratamiento ácido**

Artículo	Material	% Composición antes del pretratamiento			Condiciones				% Composición después del pretratamiento		
		% C	% H	% L	T [°C]	% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	t [min]	R-S/L-S/S	% C	% H	% L
1	Aserrín	36.6	7.0	38.8	70	10%[p/v]	75	1:10	42.8	6.3	37.5
	Cascarilla de arroz	34.4	9.5	22.1					43.5	7.9	19.6
	Bagazo de caña	32.7	21.3	15.3					51.7	14.9	16.1
2	Panicum maximum (Pasto de guinea)	28.4	19.3	25.4	130	0.5-1-1.5 % [p/v]	60	5-8.5-12% [p/p]	53	7	
					<b>Condiciones óptimas</b>						
					130	0.5	60	12			
3	Bambú Indú	42.2	16.1	27.8	121	1-3-5 % [p/p]	30-60-90		55.8	5.75	25.03
					<b>Condiciones óptimas</b>						
					121	5	30				
4	Olivo	25	15.8	18.8	170-210	0.2-0.6-1-1.4% [p/p]	10	1:5 [p/v]	45.2	-	-
					<b>Condiciones óptimas</b>						
					170	1%	10	1:5			
5	Paja de colza	35.5	18.9	21.7	180	1% [p/v]	10	10-15-20-25% [p/v]	52.5	8.0	32.3
					<b>Condiciones óptimas</b>						
					180	1	10	20			

### ANEXO C. Artículos consultados en el pretratamiento hidrotérmico

**Tabla 6. Condiciones y resultados de los diferentes artículos consultados en el pretratamiento hidrotérmico**

Artículo	Material	% Composición antes del pretratamiento			Condiciones			% Composición después del pretratamiento		
		% C	% H	% L	T [°C]	t [min]	R-S/L-S/S	% C	% H	% L
1	Pasto T85	35	31.7		230	2	5% [p/v]	41.5	24.1	-
	Pasto Merkeron	39.2	25.8					47.4	18	-
2	Bagazo de caña	45.2	23.6	21.3	180	20	5% [p/v]	37.9	2.9	19
3	Pasto de Bermudas	30.4	22.6	23.2	150-160-170	30-60	1:6 [p/v]	25.2	23.0	18.8
					<b>Condiciones óptimas</b>					
					150	30	1:6			
4	Aserrín de eucalipto	43.2	15.2	27.5	170-180	30-45-60-90- 120	-	60.3	3.0	34.9
					<b>Condiciones óptimas</b>					
					180	60	-			
5	Bagazo de agave	39.3	14.6		140-160-180-200	15	1:6 [p/v]	46.1	5.6	26.8
					<b>Condiciones óptimas</b>					
					180	15	1:6			

## ANEXO D. Parámetros estimados del modelo de Kadam

**Tabla 7. Parámetros del modelo cinético**

PARÁMETRO	VALOR
<b>Parámetros independientes establecidos</b>	
$K_{1ad}$ (g proteína/g sustrato)	0.4
$K_{2ad}$ (g proteína/g sustrato)	0.1
$E_{1max}$ (g proteína/g sustrato)	0.06
$E_{2max}$ (g proteína/g sustrato)	0.01
$E_a$ (Cal/mol)	-5540
$R_s$	$\alpha S/S_o \alpha=1$
<b>Parámetros obtenidos por regresión de los datos de sacarificación</b>	
$K_{1r}$ (g/mg*h)	22.3
$K_{11G2}$ (g/Kg)	0.015
$K_{11G}$ (g/Kg)	0.1
$K_{11X}$ (g/Kg)	0.1
$K_{2r}$ (g/mg*h)	7.18
$K_{21G2}$ (g/Kg)	132.0
$K_{21G}$ (g/Kg)	0.04
$K_{21X}$ (g/Kg)	0.2
$K_{3r}$ (h <sup>-1</sup> )	285.5
$K_{3M}$ (g/Kg)	24.3
$K_{31G}$ (g/Kg)	3.9
$K_{31X}$ (g/Kg)	201.0

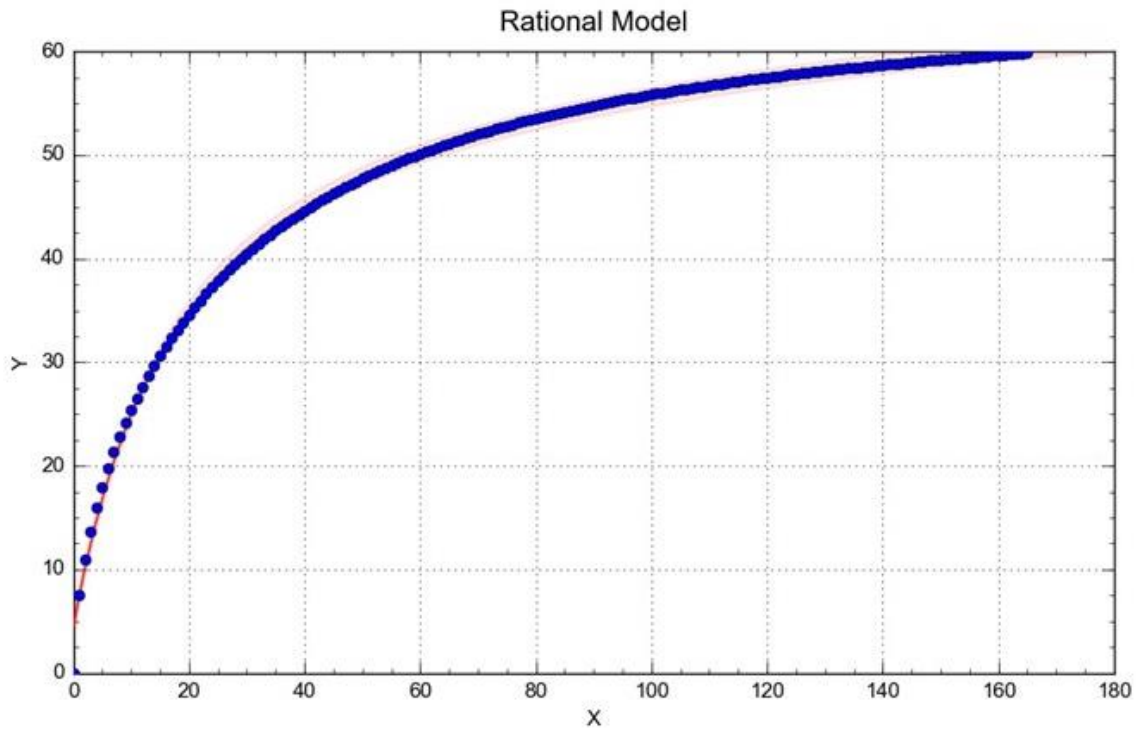
## ANEXO E. Diseño experimental

**Tabla 8. Diseño experimental**

Concentración de enzima [g/kg]	Temperatura [K]	Carga de celulosa [g/kg]
37.5	318.15	20
37.5	328.15	60
37.5	318.15	40
60.0	308.15	60
60.0	328.15	20
60.0	308.15	20
15.0	318.15	60
15.0	318.15	20
15.0	328.15	60
60.0	318.15	20
60.0	328.15	40
15.0	308.15	20
15.0	328.15	40
60.0	318.15	60
15.0	308.15	40
60.0	328.15	60
37.5	308.15	20
15.0	318.15	40
15.0	308.15	60
37.5	308.15	40
37.5	308.15	60
37.5	328.15	40
37.5	318.15	60
60.0	318.15	40
60.0	308.15	40
15.0	328.15	20
37.5	328.15	20

**ANEXO F. Ajuste (curva roja) del modelo racional a los datos de concentración de glucosa (curva azul).**

**Figure 9. Ajuste del modelo racional**



**ANEXO G. Velocidades iniciales obtenidas a diferentes condiciones de  
Concentración enzimática, de celulosa y temperatura.**

**Tabla 9. Velocidades iniciales del diseño experimental**

Experimentos	C.Enzima [g/kg]	Temperatura [K]	C. Celulosa [g/kg]	Velocidad inicial [g/kg*h]
1	15	303.15	60	3.1177
2	15	328.15	40	2.1987
3	37.5	315.65	20	6.735
4	15	328.15	60	6.0876
5	60	328.15	20	11.2543
6	37.5	303.15	20	4.6037
7	15	303.15	40	2.9442
8	15	303.15	20	2.8069
9	60	315.65	40	8.3343
10	60	315.65	20	8.028
11	60	303.15	40	5.8081
12	37.5	303.15	60	4.9391
13	37.5	303.15	40	4.7805
14	15	315.65	60	4.358
15	60	315.65	60	8.5137
16	60	303.15	60	6.01
17	37.5	328.15	20	9.5394
18	60	328.15	40	11.7031
19	37.5	315.65	60	7.0238
20	15	328.15	20	6.0829
21	60	328.15	60	11.866
22	60	303.15	20	5.5472
23	37.5	328.15	60	9.8495
24	15	315.65	20	4.1913
25	37.5	328.15	40	9.7849
26	37.5	315.65	40	6.9102
27	15	315.65	40	4.248