

Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le de crédito al documento y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA
UNIVERSIDAD DE LA SABANA
Chía - Cundinamarca

**PRODUCCION DE ETANOL A PARTIR DE LODOS PAPELEROS USANDO EXTRACTO
ENZIMATICO PRODUCIDO POR HONGOS FILAMENTOSOS**

(Verticillium sp. y Penicillium sp.)

IVONNE ANGULO DE CASTRO

UNIVERSIDAD DE LA SABANA

FACULTAD DE INGENIERÍA

MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS

CHÍA

2016

**PRODUCCION DE ETANOL A PARTIR DE LODOS PAPELEROS USANDO EXTRACTO
ENZIMATICO PRODUCIDO POR HONGOS FILAMENTOSOS**

(Verticillium sp. y Penicillium sp.)

IVONNE ANGULO DE CASTRO

Proyecto de investigación para optar el título de
Magíster en Diseño y Gestión de Procesos

Directora

Rosa Erlide Prieto Correa
Magíster en ciencias bioquímicas
Directora de proyecto

UNIVERSIDAD DE LA SABANA

FACULTAD DE INGENIERÍA

MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS

CHÍA

2016

TABLA DE CONTENIDO

1	JUSTIFICACIÓN	1
2	MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	2
2.1	PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.....	2
2.1.1	BIOMASA LIGNOCELULÓSICA	2
2.1.2	DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA.....	8
2.1.3	PRODUCCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES Y BIOCOMBUSTIBLES CON ENZIMAS.....	16
2.2	MATRIZ DE PRIORIZACIÓN PARA TOMA DE DECISIONES	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GENERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	METODOLOGÍA	24
4.1	PRODUCCIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS A PARTIR DE HONGOS FILAMENTOSOS.....	25
4.1.1	OBTENCIÓN DEL INÓCULO	26
4.1.2	CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN EXTRACTOS.....	26
4.1.3	DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	26
4.2	SELECCIÓN DE ENZIMA COMERCIAL	27
4.2.1	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	28
4.3	CARACTERIZACIÓN DEL SUSTRATO LIGNOCELULÓSICO	28
4.3.1	COMPOSICIÓN DEL LODO PAPELERO.....	29
4.3.2	CAPACIDAD BUFFER DEL LODO	29
4.3.3	ADSORCIÓN DE CELULASAS	29
4.4	HIDRÓLISIS DEL SUSTRATO LIGNOCELULÓSICO.....	30
4.4.1	HIDRÓLISIS PRELIMINAR CON ENZIMA COMERCIAL.....	31
4.4.2	HIDRÓLISIS CON EXTRACTO ENZIMÁTICO	33
4.5	PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LODO PAPELERO	34
4.5.1	DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE EFICIENCIA DEL PROCESO	36
4.5.2	DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD TÉCNICA DEL EXTRACTO.....	38

5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
5.1	PRODUCCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO.....	39
5.1.1	OBTENCIÓN DEL INÓCULO DE HONGOS FILAMENTOSOS.....	39
5.1.2	CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN EXTRACTOS.....	42
5.1.3	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	47
5.2	ENZIMA COMERCIAL.....	50
5.2.1	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	50
5.3	CARACTERIZACIÓN DEL LODO PAPELERO.....	51
5.4	HIDRÓLISIS DEL SUSTRATO LIGNOCELULÓSICO.....	54
5.4.1	HIDRÓLISIS CON ENZIMA COMERCIAL.....	54
5.4.2	HIDRÓLISIS CON EXTRACTO ENZIMÁTICO.....	63
5.5	PRODUCCIÓN DE BIOETANOL POR HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA 69	
5.5.1	PARÁMETROS DE EFICIENCIA DEL PROCESO.....	73
5.5.2	DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD TÉCNICA DEL EXTRACTO.....	76
6	CONCLUSIONES.....	80
7	RECOMENDACIONES.....	81
8	BIBLIOGRAFÍA.....	82
9	ANEXO A.....	100
	a) Composición Medios de Cultivo y Solución salina para la producción del extracto enzimático por fermentación en medio sólido.....	100
	b) Composición medio de reacción para la hidrólisis y fermentación simultánea.....	100
	c) Curva de calibración para determinación de proteínas método Bradford modificado (Zor & Selinger, 1996).....	101
	d) Perfiles electroforéticos SDS-PAGE de extractos enzimáticos.....	103
	e) Curva de calibración para determinación de azúcares reductores por el método DNS.....	104
	f) Calibración de micropipetas para adición de enzima comercial Cellic®.....	106
	g) Curva patrón para determinación de etanol por cromatografía de gases.....	107
10	ANEXO B.....	108
	MÉTODOS Y RESULTADOS DE CARACTERIZACIÓN DEL SUSTRATO.....	108
	a) T 203 Alfa, beta y gama celulosa en pulpa.....	108
	b) T236 Número Kappa de pulpa – Contenido de lignina.....	111

c)	T204 Extractivos en solventes de pulpa y madera.....	113
d)	T211. Determinación de cenizas en madera, pulpa, papel y cartón: combustión a 525°C	115
f)	T413. Determinación de cenizas en madera, pulpa, papel y cartón: combustión a 900°C	117
g)	Ensayo de adsorción en cenizas y lodo	119
11	ANEXO C.....	121
a)	RESULTADOS CANTIDAD DE EXTRACTO PRODUCIDO POR CEPA	121
b)	RESULTADOS CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	121
c)	ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN EXTRACTOS	123
d)	ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN ENZIMA CELLIC®	126
12	ANEXO D	129
13	ANEXO E.....	138
13.1	REVISIÓN DE ESTUDIOS DE HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTANEA	138
14	ANEXO F.....	142
a)	RESULTADOS ENSAYOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON ENZIMA COMERCIAL CELLIC®.....	142
b)	RESULTADOS CONDICIONES DE AGITACIÓN	145
c)	RESULTADOS ENSAYOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON EXTRACTO ENZIMÁTICO	146
d)	RESULTADOS ENSAYOS DE HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA	149

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de biocombustibles (<i>Alarcon, 2010; Alaswad, Dassisti, Prescott, & Olabi, 2015</i>).....	2
Tabla 2. Composición de algunos residuos agrícolas y desechos.....	3
Tabla 3. Composición lodo papelerero.....	6
Tabla 4. Generación de lodo en la industria papelera.....	7
Tabla 5. Características fisicoquímicas influyentes en el proceso de hidrólisis de la celulosa.....	9
Tabla 6. Clasificación de las celulasas.....	11
Tabla 7. Otras proteínas presentes en complejos celulósicos.....	12
Tabla 8. Algunas propiedades de celulasas en diferentes hongos <i>Penicillium</i> y <i>Verticillium</i>	14
Tabla 9. Ventajas y desventajas de la hidrólisis y fermentación simultánea.....	17
Tabla 10. Revisión bibliográfica sobre el uso de lodo papelerero y enzimas celulósicas.....	19
Tabla 11. Métodos para determinación de las actividades enzimáticas.....	27
Tabla 12. Método para determinación de la actividad total en complejos de alta actividad	28
Tabla 13. Métodos caracterización del lodo papelerero.....	29
Tabla 14. Cálculos empleados en adsorción de proteína	30
Tabla 15. Diseño de experimento con enzima comercial.....	31
Tabla 16. Diseño experimental para evaluación agitación.....	32

Tabla 17. Diseño de experimento con extracto enzimático.....	33
Tabla 18. Condiciones generales SSF.....	36
Tabla 19. Parámetros de eficiencia	37
Tabla 20. Tasa de crecimiento de las cepas en CMC 1% y PDA.....	41
Tabla 21. Contenido de proteína en cultivos sumergidos de diferentes especies de <i>Penicillium</i>	43
Tabla 22. Estimación de pesos moleculares del extracto <i>Verticillium sp.</i> en gel SDS-Page	44
Tabla 23. Estimación pesos de del extracto <i>Penicillium sp.</i> en gel SDS-Page	46
Tabla 24. Actividades FPA de diferentes extractos enzimáticos.....	48
Tabla 25. Actividades CMCCase en diferentes extractos enzimáticos.....	49
Tabla 26. Resultados caracterización del lodo <i>papelero</i>	51
	55
Tabla 27. Condiciones de carga de sólidos y enzima para hidrólisis enzimática.....	
Tabla 28. ANOVA de dos factores para AR producidos en 12 horas.....	58
Tabla 29. Prueba LSD para Temperatura.....	59
Tabla 30. Prueba LSD para concentración de enzima.....	59
Tabla 31. pH de muestras en hidrólisis con enzima comercial.....	60
Tabla 32. ANOVA para condiciones de agitación evaluadas.....	63
Tabla 33. Cantidades de lodo y extracto empleados en el diseño con extracto enzimático	63
Tabla 34. ANOVA de 4 factores principales para AR producidos en 12 h con extracto	68

Tabla 35. Parámetros cinéticos estimados.....	73
Tabla 36. Productividad observada en procesos de hidrólisis y SSF.....	74
Tabla 37. Costos asociados a la producción del extracto enzimático.....	77
Tabla 38. Aspectos a priorizar en matriz de priorización.....	78
Tabla 39. Tabla de valores para matriz de priorización.....	78
Tabla 40. Tabla de resolución de prioridades.....	79
Tabla 41. Distancias marcador para electroforesis de extractos <i>Verticillium sp.</i> y <i>Penicillium sp.</i>	103
Tabla 42. Datos de absorbancia de patrones - método de azúcares reductores.....	104
Tabla 43. Relación concentración de etanol y alturas para curva patrón.....	107
Tabla 44. Revisión de estudios SSF.	138
Tabla 45. Condiciones ensayo hidrólisis con enzima comercial.....	142
Tabla 46. Resultados hidrólisis con enzima Cellic® con 150 rpm a diferentes temperaturas	143
Tabla 47. Producción de AR con enzima comercial expresados en g AR/g glucano.....	144
Tabla 48. Resultados de hidrólisis con enzima Cellic® y diferentes cargas de sólidos en 6 y 12 horas de hidrólisis.....	145
Tabla 49. Condiciones ensayos de agitación en hidrólisis con 6% de enzima y 18.17% de sólidos.....	145
Tabla 50. Resultados de hidrólisis a 37 y 45°C con 6% enzima y carga de sólidos 18,17%, en diferentes agitaciones.....	146
Tabla 51. Condiciones ensayo extracto enzimático.....	146

Tabla 52. Resultados hidrólisis con extracto enzimático 6 y 12 horas.....	148
Tabla 53. Resultados azúcares reductores y etanol en SSF e hidrólisis de control con	149
Tabla 54. Resultados de azúcares reductores y etanol en SSF e hidrólisis de control con extracto enzimático.....	146
Tabla 55. pH final de SSF e hidrólisis (9 días)	150
Tabla 54. Resultados de azúcares reductores y etanol en SSF e hidrólisis de control con extracto enzimático	150

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo estructural de microfibrilla de celulosa (Taiz & Zeiger, 2006)...	3
Figura 2. Estructura de la celulosa (Adaptación de Glazer & Nikaido, 1998; Golan, 2011; G. Henriksson et al., 2009a).....	5
Figura 3. Mecanismo para depolimerización y amorfogénesis de la celulosa (adaptación de Zhang et al. (2006) y Arantes & Saddler (2010))	9
Figura 4. Metodología de trabajo.....	24
Figura 5. Proceso de producción extractos enzimáticos (Pulido, 2013).....	25
Figura 6. Clasificación de significancia estadística en ANOVA (Stirling, 2000).....	32
Figura 7. Montaje ensayo de SSF.....	34
Figura 8. Crecimiento radial de <i>Verticillium sp.</i> en CMC 1% a 25°C.....	40
Figura 9. Crecimiento radial de <i>Verticillium sp.</i> en PDA a 25°C.....	40
Figura 10. Crecimiento radial de <i>Penicillium sp.</i> en CMC 1% a 25°C.....	41
Figura 11. Crecimiento radial de <i>Penicillium sp.</i> en PDA a 25°C.....	41
Figura 12. Gel SDS-Page extractos <i>Verticillium sp.</i>	44
Figura 13. Gel SDS-Page extractos <i>Penicillium sp.</i>	45
Figura 14. Capacidad buffer del lodo papelerero.....	54
Figura 15. Hidrólisis con enzima Cellic® a 150 rpm en 37, 45 Y 55 °C durante 72 horas.....	56
Figura 16. Efectos principales e identificación de interacciones en hidrólisis con enzima comercial.....	58

Figura 17. Azúcares reductores con 18,17% de sólidos y 6% de enzima en diferentes agitaciones.....	61
Figura 18. Efectos principales en ensayo de agitación.....	62
Figura 19. Hidrolisis con extracto enzimático a 37, 45 y 55°C.....	65
Figura 20. Efectos principales e identificación de interacciones en hidrólisis con extracto enzimático.....	67
Figura 21. Comparación de producción de AR con extracto y enzima comercial en 12 horas de hidrólisis.....	69
Figura 22. SSF con enzima comercial Cellic®.....	70
Figura 23. SSF con extracto enzimático.....	71
Figura 24. Perfil electroforético (extracto <i>Verticillium</i> sp. y <i>Penicillium</i> sp.)	103
Figura 25. Curva de calibración azúcares reductores DNS	105
Figura 26. Curva de calibración azúcares reductores para actividad enzimática	105
Figura 27. Curva patrón de etanol	107

1 JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas se han hecho esfuerzos considerables para utilizar lignocelulosa como la materia prima para producción de azúcares fermentables y bioetanol como una fuente alternativa de los combustibles fósiles, toda vez que la celulosa y hemicelulosa representan los biopolímeros más abundantes sobre el planeta (Weitz & Feldman, 2012). La producción comercial actual de bioetanol, se basa principalmente en la fermentación de la biomasa azucarada de la caña de azúcar y remolacha y de la biomasa amilácea, derivada de los cultivos a base de almidón tales como maíz, trigo, mandioca y yuca (Kemppainen et al., 2012; Yamashita et al., 2008), sin embargo, la comunidad científica ha trabajado de manera intensiva en la búsqueda de nuevas alternativas sostenibles que sean competitivas en el mercado (Kemppainen et al., 2012).

Por otra parte, las celulasas están despertando cada vez más interés en aplicaciones dirigidas a la agricultura, biotecnología y usos bioenergéticos (Phitsuwan et al., 2013). El uso de enzimas en la producción de bioetanol a partir de material celulósico, es uno de los factores de mayor costo (Lark, Xia, Qin, Gong, & Tsao, 1997). Las celulasas son actualmente producidas comercialmente, pero en una escala relativamente pequeña (Wang et al., 2010), es así que en los últimos años muchas investigaciones se han centrado en las enzimas celulasas, producción de extractos celulolíticos y en la importancia de mejora de las mismas con el fin de lograr que su costo permita hacer más rentable su uso en biorefinerías (Zhang, Himmel, & Mielenz, 2006).

Paralelamente, numerosas industrias a nivel mundial han respondido a los llamados de responsabilidad ambiental en el uso eficiente de recursos, minimización de residuos y procesos de valoración. En la industria papelera, la búsqueda de nuevas alternativas para la gestión del lodo papelerero, ha sido un objetivo agresivamente perseguido por muchas compañías y son especificadas como prioridad en los compromisos de la Agenda 2020 (American Forest & Paper Association, 1994). Diversos autores consideran el lodo papelerero como un subproducto de interés con potencial para la producción de bioetanol, a causa de su composición alta en celulosa y baja en lignina comparada con otros materiales lignocelulósicos (Kang, Wang, & Lee, 2010; Lynd et al., 2001; Mora & Banerjee, 2013; Peng & Chen, 2011; Silva et al., 2011; Wang et al., 2010; Yamashita et al., 2008).

La presente propuesta pretende lograr la producción de bioetanol por medio de una hidrólisis y fermentación simultánea con *Sacharomyces cerevisiae*, usando un extracto enzimático crudo para la conversión del lodo papelerero como sustrato lignocelulósico en azúcares fermentables, estableciendo así, las variables y la eficiencia del proceso, respecto a los resultados con la enzima comercial Cellic®.

2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1 PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Los biocombustibles son una fuente de energía renovable, producidos a partir de una amplia gama de fuentes de biomasa como: alimentos, residuos de madera, cultivos de rotación breve y desechos agrícolas e industriales (Aларcon, 2010). Los biocombustibles líquidos pueden clasificarse también según la biomasa de la que provienen (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de biocombustibles (Aларcon, 2010; Alaswad, Dassisti, Prescott, & Olabi, 2015)

Tipo	Descripción
Primera generación	Son los producidos directamente de los cultivos de alimentos como el maíz, trigo y soya. El biocombustible se deriva del almidón, azúcar o aceite que proporcionan estos cultivos.
Segunda generación	Proviene de cultivos biomasa lignocelulósica que no son alimentos, tal como: madera, material vegetal residual de cultivos, cultivos de rotación breve, residuos industriales compuesto por material lignocelulósico.
Tercera generación	Proviene del uso de microalgas y algas para la producción del biocombustible. Estos microorganismos llevan a cabo la fotosíntesis y acumulan lípidos o azúcares y otros carbohidratos como la principal forma de energía almacenada.

El bioetanol es considerado el producto de biotecnología más importante en términos de volumen y valores del mercado, en la actualidad el mercado de biocombustibles es dominado por el etanol, el cual es principalmente producido por sacarosa o almidón a partir de materias primas de diversas cadenas de valor de la industria alimenticia. Por otra parte, la comunidad científica se ha esforzado en desarrollar combustibles más sostenibles que los que actualmente se encuentran en el mercado (Kempainen *et al.*, 2012). La creciente crítica a los combustibles de primera generación, ha despertado mayor interés para ser reemplazados por aquellos producidos a partir de material lignocelulósico (Sims *et al.*, 2010).

2.1.1 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

La lignocelulosa es el principal tejido de sostén vegetal y sus porcentajes de polímeros en su composición varían según el tipo de biomasa. Este complejo de polisacáridos está compuesto por una compleja estructura de fibras de celulosa cristalina estrechamente unidas a hemicelulosa y lignina (Golan, 2011; Schwarz, 2012) (ver Figura 1), la celulosa y la hemicelulosa se encuentran en mayor proporción en la lignocelulosa que la lignina (Juturu & Wu, 2012). La Tabla 2 lista la composición de algunos materiales lignocelulósicos y su variación de acuerdo al tipo de material.

Figura 1. Modelo estructural de microfibrilla de celulosa (Taiz & Zeiger, 2006)

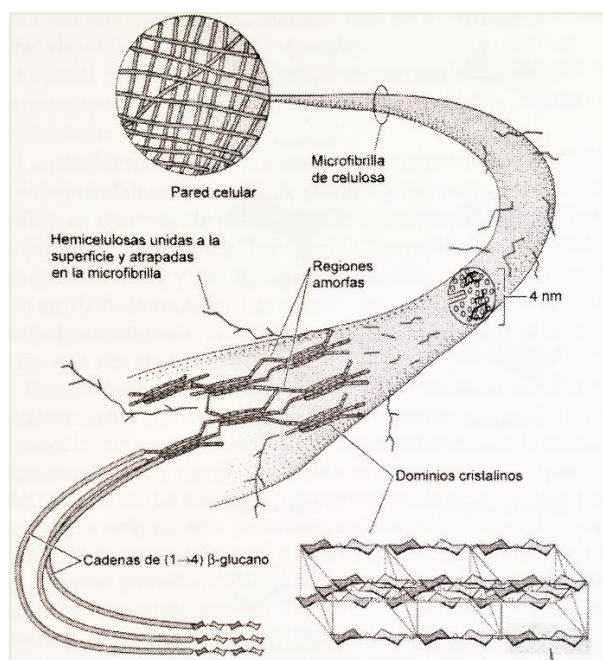


Tabla 2. Composición de algunos residuos agrícolas y desechos

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Referencias
Hojas	15-20	80-85	0	Sun & Cheng (2002)
Desechos de pastos	25-40	35-40	18-30	Sun & Cheng (2002)
Cascarilla de arroz	39	15	10	Merino & Cherry (2007)
Madera dura	40-55	24-40	18-25	Sun & Cheng (2002)
Papel periódico	40-55	25-40	18-30	Sun & Cheng (2002)
Bagazo de Caña de azúcar	43	25	24	Merino & Cherry (2007)
Madera suave	45-50	25-35	25-35	Sun & Cheng (2002)
Desechos de papel de pulpeos químicos	60-70	10-20	5-10	Sun & Cheng (2002)
Algodón	80-95	0	0	Sun & Cheng (2002)
Papel	85-99	0	0-15	Sun & Cheng (2002)

La lignina es el tercer componente principal del material lignocelulósico (Bisaria & Ghose, 1981), es un polímero natural irregular de alto peso molecular compuesto por fenilpropano (C₉) unido a oxígeno en diversas formas. Las enzima de origen fúngico y bacteriano que degrada este compuesto es la *peroxidasa lignina* mediante depolimerización (Glazer & Nikaido, 1998). Este compuesto es el principal obstáculo en la hidrólisis del material lignocelulósico, debido a que es una barrera física para la celulosa, que previene

el contacto celulosa-celulasas además de adsorber y desactivar las celulasas (Bernardez, Lyford, Hogsett, & Lynd, 1993; R. Gupta & Lee, 2009; Jørgensen & Olsson, 2006; Lark et al., 1997; Marjamaa, Toth, Bromann, Szakacs, & Kruus, 2013; Mosier et al., 2005; Pan, Xie, Gilkes, Gregg, & Saddler, 2005; Zhang & Lynd, 2004)

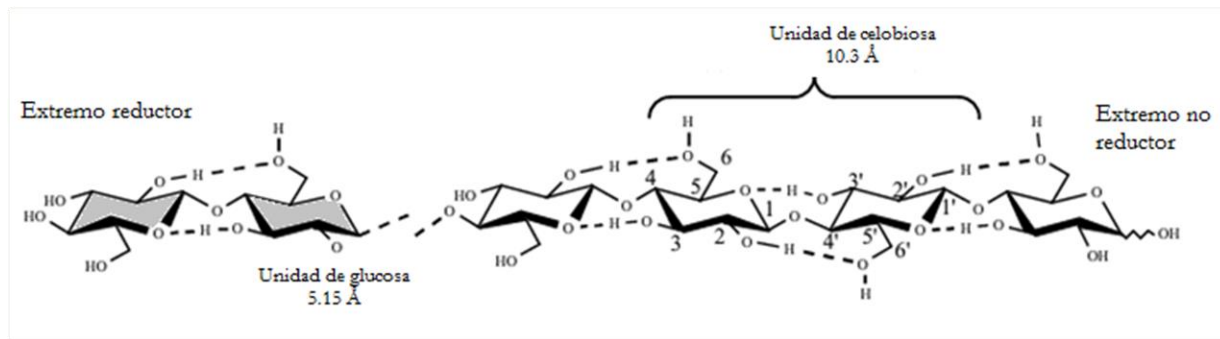
La *hemicelulosa* es un polisacárido flexible que se une de forma característica a la superficie de la celulosa (formando entramados que mantienen las microfibrillas de celulosa juntas o como cobertura resbaladiza para evitar el contacto directo entre microfibrillas), generalmente no es cristalina y altamente ramificado (Glazer & Nikaido, 1998; Taiz *et al.*, 2006). El principal componente de la hemicelulosa es la xilosa (Juturu & Wu, 2012) y los azúcares residuales presentes en la hemicelulosa son: pentosas (D-xilosa, L-arabinosa), hexosas (D-galactosa, L-galactosa, D-manosa, L-ramnosa, L-fructosa) y ácidos urónicos (D-ácido glucurónico). La hemicelulosa presenta un grado de polimerización considerablemente más bajo que la celulosa (inferior a 200 azúcares residuales y un mínimo cercano a 50 monómeros). Las soluciones alcalinas solubilizan los polisacáridos con enlaces β ,(1,4)- unidos a xilanos y galactoglucomananos, pero los glucomananos, que son un compuesto importante cuantitativamente en la hemicelulosa, son insolubles en medio alcalino por lo que continúan estrechamente asociados a las fibras de celulosa (Glazer & Nikaido, 1998; G. Henriksson, Gellerstedt, & Ek, 2009a; Ragauskas, 2014).

En cuanto a la *celulosa*, es un compuesto insoluble en agua mucho más resistente a la degradación que otros polímeros de glucosa como el almidón (Glazer & Nikaido, 1998), sus propiedades químicas y físicas están definidas por su interacción intermolecular, estructura en forma de red y la longitud del polímero entre otras características (Golan, 2011). Desde el punto de vista químico, la celulosa corresponde a un enlace regular de unidades D-glucopiranosas (Gnanou & Fontanille, 2008; Nobel, 2005), es decir, unidades β -D Glucosa unidas por enlaces β - 1-4, con un grado de polimerización (GP) que se encuentra entre 300 y 25.000, en el caso de la madera y la pulpa, los valores típicos oscilan entre 300 y 1700, mientras que en el algodón y otras fibras de plantas puede estar entre 800 y 10.000 (Bisaria & Ghose, 1981; Golan, 2011; G. Henriksson *et al.*, 2009a; Heredia, Jiménez, & Guillén, 1995; Ragauskas, 2014). Por lo general, las fibras varían ampliamente en longitud y en el grado de interacción en sus cadenas, por ejemplo, pueden estar compuestas hasta por 15.000 D-glucosas dependiendo de la fuente en la que se encuentren (Cowling, 1975; Golan, 2011; Hildén & Johansson, 2004; Pallardy & Kozlowski, 2008).

Las cadenas de celulosa son estabilizadas por los enlaces de hidrógeno y fuerzas van der Waals, que causan una fuerte interacción entre ellas, organizando varias cadenas paralelamente por su misma polaridad y haciéndolas insolubles y rígidas (Glazer & Nikaido, 1998; Golan, 2011; Teeri, 1997; Zhang et al., 2006). La Figura 2, representa la estructura de la celulosa con sus unidades de glucosa enlazadas mediante β -1,4. En resumen, la unidad de repetición básica de la cadena de celulosa es la una unidad de celobiosa (indicada

por los anillos sombreados de piranosa), que conforman microfibrillas (cadenas muy largas de extensos agregados cristalinos compuestas por grupos de 15 a 45 glucanos), dichas estructuras se combinan entre sí para conformar las fibrillas o fibras largas, organización que constituye las capas de la pared celular de las plantas (Glazer & Nikaido, 1998; G. Henriksson *et al.*, 2009a; Heredia *et al.*, 1995; Ragauskas, 2014).

Figura 2. Estructura de la celulosa (Adaptación de Glazer & Nikaido, 1998; Golan, 2011; G. Henriksson *et al.*, 2009a)



2.1.1.1 Cristalinidad de la celulosa

Las fibras de celulosa tienen regiones de alto orden (*regiones cristalinas*) y regiones de menos orden (*regiones amorfas*). Según las características químicas descritas en el numeral anterior, las regiones cristalinas están dadas por el alto grado de enlaces de hidrógeno dentro y entre las cadenas de celulosa formando así una estructura de rejilla en 3D, mientras que las regiones amorfas carecen de ese alto grado de enlaces de hidrógeno y por ende tienen una estructura menos ordenada (Golan, 2011). En otras palabras, las propiedades físicas, químicas y su reactividad son determinadas por la disposición de las moléculas de celulosa con respecto a las otras y al eje de la fibra, de tal forma que la distribución de los dominios no cristalinos está asociado a la disminución del GP (D. Ciolacu, Ciolacu, & Popa, 2011).

Esta propiedad de la celulosa puede ser modificada por tratamientos químicos o mecánicos, en el caso del lodo papelerero, la cristalinidad del sustrato es reducida respecto a la materia prima del proceso debido al proceso mecánico y químico que ocurre en la operación de pulpeo (Duff & Murrayh, 1996)

2.1.1.2 Lodo Papelerero

El lodo papelerero es un residuo sólido de la industria manufacturera de productos elaborados a partir de papel reciclado o de fibra virgen como materia prima, entre más reciclada sea la materia prima se producen más fibras cortas (<0.5 mm para papel de imprenta), que según las especificaciones del papel producido, no alcanzan entrecruzarse para la formación del papel en las operaciones de pulpeo, refinación, destintado, blanqueo y tratamiento del agua de proceso, por lo cual cerca del 15-20% de las fibras recicladas son muy

cortas para incorporarse al proceso, convirtiéndose en el rechazo del proceso de fabricación de papel (Area & Popa, 2014; Biermann, 1996; G. Henriksson, Gellerstedt, & Ek, 2009b; Lark *et al.*, 1997; Monte *et al.*, 2009).

La recuperación biotecnológica de este residuo, requiere de la conversión de sus componentes principales (celulosa y hemicelulosa) en azúcares fermentables, que podrían convertirse adicionalmente en combustibles y productos químicos, tales como el etanol, ácidos orgánicos o plásticos biodegradables (Marques *et al.*, 2008). El tratamiento mecánico y químico intensivo que sufren las fibras en el proceso de producción del papel, permite que este residuo sea mucho más susceptible a la hidrólisis enzimática comparado con otros materiales lignocelulósicos gracias a su estructura dispersa, área superficial alta y a la reducción del tamaño de las fibras (Domke, Aiello-Mazzarri, & Holtzaple, 2004; Duff, Moritz, & Andersen, 1994; Z. Fan & Lynd, 2007a, 2007b; Li Kang *et al.*, 2010; Lark *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2011; Wei Wang *et al.*, 2010).

En cuanto a su composición, este residuo comprende principalmente fibras cortas de pulpa, cenizas (material inorgánico) y alrededor de un 60% de agua (Chen *et al.*, 2014; Wajima *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2008); Lynd *et al.* (2001) y Monte *et al.* (2009) reportan una estabilidad en la composición del lodo de un molino según una producción controlada, así como una variación significativa en su composición entre diferentes industrias de papel, dependiendo de las operaciones unitarias y fuentes de las materias primas empleadas. En el caso de la etapa del pulpeo, puede removerse hasta un 50% de la hemicelulosa y generar cambios en la estructura de las fibras (Li Kang *et al.*, 2010; Runge & Zhang, 2013). La Tabla 3 resume la composición de diferentes lodos papeleros efectuada en diversos estudios.

Tabla 3. Composición lodo papeleros

Origen de lodo	Glucano / Celulosa	Hemicelulosa	Cenizas	Solubles en ácido	Insolubles en ácido	Lignina	Extractivos	Otros
Con fibras recicladas	23 - 67.3%	8.6%	7.2 - 56.1%	22.0%	8.0%	4.6 - 16.5%	2.6%	2.1%
Con fibra virgen	34.1 - 63%	10 - 14.8%	11.2 - 36%	10 - 26%	7 - 20.4%	8.1 - 22.6%	3.0%	0.6 - 8.3%

Fuentes: Chen *et al.* (2014), Fan *et al.* (2003), Kang, Wang & Lee (2010), Kempainen *et al.* (2012), Lark *et al.* (1997), Lin *et al.* (2012), Lynd *et al.* (2001), Marques *et al.* (2008), Peng & Chen (2011), Soucy *et al.* (2014), Yamashita *et al.* (2008), Wang *et al.* (2010)

Respecto a las cenizas, estas son la fracción inorgánica del lodo que proviene de los minerales empleados como aditivos en el papel reciclado que cumplen la función de recubrimiento (G. Henriksson *et al.*, 2009b; Wei Wang *et al.*, 2010), son partículas finas cuyo tamaño oscila entre 0.1 – 10 µm y están compuestas

principalmente por CaCO₃, que componen la fracción soluble en ácido, así como arcillas y TiO₂, que corresponden a la fracción insoluble en ácido (Kang *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2010); el contenido de sílice en las cenizas, ha disminuido debido al uso decreciente de minerales de silicato en los recubrimientos (Wajima *et al.*, 2006).

La cantidad de lodo generado en el proceso de producción de papel depende del tipo de proceso y de las materias primas. A partir de fibra virgen se genera menos residuos que el proceso con fibras recicladas (etapa de destintado). Si bien los residuos de estos dos procesos presentan similitud en sus características fisicoquímicas, el producido a partir de fibra virgen presenta menor contenido de material inorgánico que el lodo de destintado (Monte *et al.*, 2009). La Tabla 4 resume algunos índices de producción de este residuo.

Tabla 4. Generación de lodo en la industria papelera

Tipo de materia prima		Tipo de papel producido	% Producción de lodos (T base seca/ T papel producida)	Referencias
Fibra virgen	Fibra reciclada			
X		* Prom	4 - 10 %	Lynd <i>et al.</i> (2001)
X		* Prom	3 - 4 %	Mahmood (2006)
	X	* Prom	10 - 50 %	Lynd <i>et al.</i> (2001)
	X	* Prom	15 - 30 %	Mahmood (2006)
	X	Papeles suaves	23 - 38 %	Gavrilesco (2008)
* Prom: Valores promedios genéricos de la industria.				

La mayor parte de este residuo es dispuesto en rellenos, esparcido sobre terrenos o incinerado, situación que sumada a las grandes cantidades producidas diariamente y la capacidad limitada de los sitios de disposición, ha ocasionado problemas sociales y ambientales (Hui Chen, Han, et al., 2014; Hui Chen, Venditti, et al., 2014; Lark et al., 1997; Wajima et al., 2006; Wei Wang et al., 2010), si bien no se encontraron disponibles reportes de generación en Colombia, en 2014 el sector papelerero tuvo un consumo aparente de 127 mil toneladas de papel post consumo blanco, periódico y otros (ANDI - Cámara de Pulpa Papel y Cartón, 2014), considerando los índices de producción de lodo presentados en la Tabla 4 (asumiendo un 35%), podría estimarse una producción mínima de 44.450 toneladas de lodo (base seca) en el año en referencia (sin considerar lodos secundarios del tratamiento biológico de las aguas residuales). Debido a su alto contenido de carbohidratos, los lodos pueden ser convertidos en productos de valor agregado sin requerir un pre tratamiento drástico, como los requeridos comúnmente para el material celulósico recalcitrante (Chen *et al.*, 2014; Marques *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010).

La industria papelera en Colombia, ha demostrado esfuerzos en la minimización de residuos y procesos de valoración de los mismos. En los últimos cinco años, se han desarrollado alternativas de uso que

consisten en sustitución parcial o total de materias primas en otros procesos productivos por el lodo, tal es el caso del compostaje, lombricultura, fabricación de ladrillos, camas avícolas, entre otras. Sin embargo, el volumen de generación del residuo y la demanda del mismo por parte de los aprovechadores, es muy variable (dependiendo de aspectos climáticos, condiciones de proceso, capacidad de producción y espacio de almacenamiento, etc.), situación que lleva a la industria papelera a la exploración de nuevas alternativas que permitan diversificar el aprovechamiento y mejorar en cantidad y estabilidad la demanda del material.

2.1.2 DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA

La depolimerización de la celulosa en glucosa es un pre-requisito para la fermentación microbiana (Juturu & Wu, 2014), existen dos formas de tratar la celulosa para convertir en glucosa: hidrólisis química e hidrólisis enzimática. La hidrólisis química emplea ácidos inorgánicos en condiciones severas, por lo que los hidrolizados que se obtienen contienen no solo los azúcares fermentables, sino también productos de degradación de los azúcares tales como el aldehído furfural, el cual es tóxico para los microorganismos empleados en las siguientes etapas de fermentación, por ende se requiere una etapa de desintoxicación con el fin de remover los inhibidores de los hidrolizados (Juturu & Wu, 2012). De acuerdo con Ciolacu, Ciolacu & Popa (2011), las interacciones que primero ocurren entre los sustratos celulósicos y el agua, enzimas u otras sustancias adsorbidas por el mismo, se dan en los dominios no cristalinos y/o en las superficies cristalinas mientras que las regiones intracristalinas permanecen intactas.

La susceptibilidad de la celulosa como sustrato para procesos de bioconversión está determinado por la accesibilidad que tengan las celulasas (Bisaria & Ghose, 1981). Dichas enzimas pueden hidrolizarla en condiciones menos agresivas que un tratamiento químico, sin generar subproductos inhibitorios de la degradación de los azúcares y lignina, sin problemas de corrosión y con menor toxicidad, por lo cual es un bioproceso ambientalmente amigable con un catalizador potencialmente reutilizable (Karmakar & Ray, 2011; Kuhad, Gupta, & Singh, 2011; Marques *et al.*, 2008; Ragauskas, 2014). Es así que la accesibilidad y reactividad de las fibras de celulosa está relacionada con su morfología, por lo que las regiones amorfas son más fácilmente hidrolizables que las cristalinas (D. Ciolacu *et al.*, 2011; Schwarz, 2012).

Un proceso a considerar como pretratamiento del material lignocelulósico es una dilución ácida, la cual no solo rompe los enlaces entre la lignina, hemicelulosa y celulosa, sino que remueve la hemicelulosa. Así mismo, la adición de proteínas no hidrolíticas (como el BSA - Albumina de suero bovino), podría reducir la minimización de la adsorción no hidrolítica de las celulasas a la lignina (Pan *et al.*, 2005).

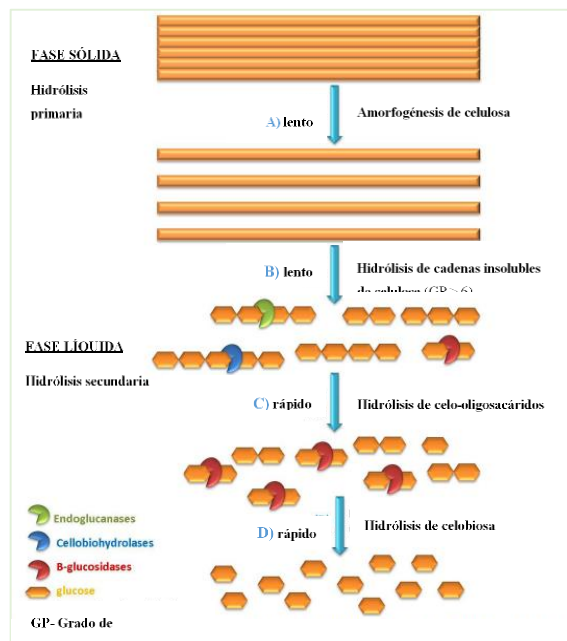
2.1.2.1 Hidrólisis enzimática de la celulosa

La hidrólisis enzimática de la celulosa (también llamada sacarificación enzimática) generalmente se define como un sistema de reacción heterogéneo en el cual las celulasas reaccionan con la celulosa compuesta por zonas cristalinas y amorfas (Arantes & Saddler, 2010), la Tabla 5 resume algunas características influyentes en este proceso.

Tabla 5. Características fisicoquímicas influyentes en el proceso de hidrólisis de la celulosa

Criterio asociado	Características	Referencias
Sustrato	Accesibilidad, concentración, cristalinidad, estructura supramolecular, asociación a lignina y/o hemicelulosa, grado de polimerización y tamaño de partícula.	Diana Ciolacu, Ciolacu & Popa (2008) M. Coughlan (1992) Q. Sun (2014)
Enzimas	Temperatura y pH de proceso, tiempo de reacción, relación sustrato / enzima.	M. Coughlan (1992) Q. Sun (2014)
	Inhibición por productos finales, trabajo sinérgico, adsorción irreversible.	Q. Sun (2014) M. P. Coughlan (1985) Martins <i>et al.</i> (2008)
Agitación	Mejora mecanismos de ataque celulolítico, la absorción de las celulasas en el sustrato aumentando las actividades de las enzimas.	Cavaco-Paulo & Almeida (1994; 1996) Castellanos <i>et al.</i> (1995b) Ingesson <i>et al.</i> (2001) Samaniuk <i>et al.</i> (2011) Kang <i>et al.</i> (2011) Sakata, Ooshima & Harano (1985)

Figura 3. Mecanismo para depolimerización y amorfogénesis de la celulosa (adaptación de Zhang *et al.* (2006) y Arantes & Saddler (2010))



La hidrólisis de la celulosa, representada en Figura 3, se da principalmente en dos etapas, la hidrólisis primaria ocurre en la superficie del sustrato sólido y la hidrólisis secundaria ocurre en la fase líquida donde se hidrolizan los carbohidratos solubles. En consecuencia, durante el proceso de hidrólisis de la celulosa, se da una transformación en el sustrato lo cual incluye: i) cambios en el número de terminales de la cadena como resultado de la acción de las enzimas (Kongruang *et al.*, 2004; Zhang & Lynd, 2005) y, ii) cambios en la accesibilidad de la celulosa como resultado de desorden molecular en las regiones cristalinas (Q. Sun, 2014; W. Wang, Liu, Chen, Zhang, & P., 2003).

2.1.2.1.1 Enzimas celulósicas o celulasas

Estas proteínas tienen como función catalizar la hidrólisis de la celulosa y son producidas por cientos de especies de hongos, bacterias y protozoos así como las plantas (Golan, 2011). Dichos organismos pueden ser aerobios y anaerobios, mesófilos y termófilos, todos ellos trabajan sinérgicamente para degradar los polisacáridos estructurales en la biomasa. Sin embargo, aunque muchos microorganismos pueden crecer sobre la celulosa y producir enzimas que degraden la celulosa amorfa, muy pocos producen la totalidad de las celulasas extracelulares capaces de degradar la celulosa cristalina (Burkheisser, 2010). Las celulasas pueden ser secretadas por algunos microorganismos como enzimas libres o como celulosomas extracelulares (Burkheisser, 2010; Juturu & Wu, 2014), se conocen como celulasas no complejas y celulasas complejas respectivamente (Zhang *et al.*, 2006). Los hongos las secretan a en su entorno, mientras que las celulasas complejas se dan principalmente en bacterias anaerobias como estructuras externas adheridas a la pared celular (Juturu & Wu, 2014; Wilson, 2011). Entre los más estudiados se encuentran los hongos *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Phaneroacete* y las bacterias *Cellulomonas* y *Clostridium thermocellum*. (Bisaria & Ghose, 1981; Glazer & Nikaido, 1998; Jørgensen & Olsson, 2006).

Estas proteínas son clasificadas como glicosil hidrolasas (GH) ya que hidrolizan los enlaces glicosídicos β -1,4 de la celulosa de manera sinérgica entre sus componentes (Eveleigh *et al.* 2009; Luciano S. *et al.* 2012; Q. Sun, 2014), esto es, el trabajo de una proteína aumenta la eficacia de otra (Bender, Datta, & Smith, 2000), logrando en conjunto la degradación de la celulosa (ver Figura 3). La Tabla 6 presenta su clasificación y la Tabla 7 describe otras proteínas que pueden existir en los complejos de celulasas con un patrón de acción diferente al hidrolítico.

Tabla 6. Clasificación de las celulasas

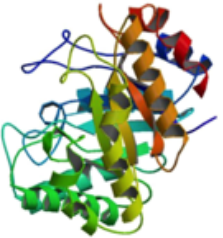
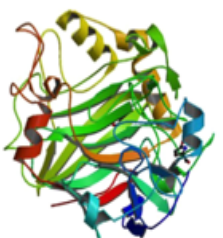
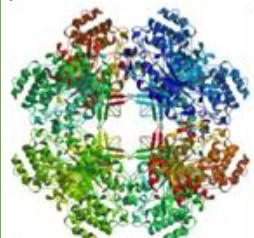
	Endo-1,4 glucanasa (EG)	Referencia	Exo-1,4 glucanasa (ExG)	Referencia	β-D glucosidasa (βG)	Referencia
Descripción	<ul style="list-style-type: none"> - Sitio activo: hendidura abierta - Mayor eficacia en regiones amorfas - Su acción proporciona sitios de unión para las Exo-1-4 glucanasas - Constituyen aproximadamente el 15% de las proteínas secretadas. - Sinergia con ExG: es mayor en estructuras cristalinas que amorfas 	Bisaria & Ghose (1981); Hildén & Johansson (2004); Merino & Cherry (2007); Zhang <i>et al.</i> (2006); Golan (2011)	<ul style="list-style-type: none"> - Sitio activo: en forma de túnel - Estructura de serpentines y cadenas antiparalelas conformando túneles - Constituyen el 80% de las proteínas secretadas. - Ataque progresivo: es más probable que permanezca vinculado al sustrato después del ciclo catalítico 	Merino & Cherry (2007); Luciano <i>et al.</i> (2012); Henriksson <i>et al.</i> (1996); Divne <i>et al.</i> (1994); Dies <i>et al.</i> (1995)	<ul style="list-style-type: none"> - Sitio activo: cráter o bolsillo formado por los pares asociados por los ejes de un octámero - Constituyen aproximadamente el 0,5% de las proteínas secretadas - Su actividad incrementa la velocidad de la hidrólisis (la celobiosa es inhibidor de las EG y ExG) 	Merino & Cherry (2007); Zhang <i>et al.</i> (2006); Juturu & Wu (2014); Bhat, S. Bhat (1997); Bhatia, Mishra, & Bisaria (2002); Golan (2011)
Estructura	EG de <i>Thermoascus aurantiacus</i> . 	Juturu & Wu (2014)	ExG de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> 	Juturu & Wu (2014)	β G de <i>Bacillus polymyxa</i> 	Juturu & Wu (2014)
Patrón hidrolítico	<ul style="list-style-type: none"> - Ruptura aleatoria en cualquier parte de la cadena de glucano. - Hidroliza enlaces β-1,4 glicosídicos 	Luciano <i>et al.</i> (2012); Maki, Leung & Quin (2009); Stålbrand <i>et al.</i> (1998); Teeri (1997); Zhang <i>et al.</i> (2006)	<ul style="list-style-type: none"> - Ataque progresivo en extremos reductores y no reductores - Descompone celulosa cristalina - Hidroliza enlaces β-1,4 glicosídicos - Requiere una cadena de glucano con GP \geq 10 para unión de la enzima 	Merino & Cherry (2007); Luciano <i>et al.</i> (2012); Maki, Leung & Quin (2009); Teeri (1997); Gupta & Lee (2009); Nevalainen & Penttilä (1995); Kim <i>et al.</i> (1992)	<ul style="list-style-type: none"> - Transforma sustratos solubles celobiosa y celo-oligosacáridos con bajo GP(<7) 	Merino & Cherry (2007); Zhang <i>et al.</i> (2006); Gupta & Lee (2009); M. P. Coughlan (1985), Zhang y Lynd (2004)
Productos	Polímeros insolubles (GP \geq 8) Son inhibitorios para su misma actividad	M. P. Coughlan (1985); Burkheisser (2010)	Celobiosa y glucosa principalmente y algunos oligosacáridos. Son inhibitorios para su misma actividad		Glucosa	

Tabla 7. Otras proteínas presentes en complejos celulósicos

Otras proteínas presentes en complejos celulósicos				
	Swollenins y Expansinas	Ref.	Celobiosa oxidasa y glucosa oxidasa	Ref.
Descripción	<ul style="list-style-type: none"> - Denominadas por su función de hinchar y expandir la red de celulosa - Perturban la estructura de los enlaces químicos para aumentar la accesibilidad al sustrato y la acción de las celulasas - Son producidas por hongos o plantas - Peso molecular ~27 - 49 kDa - Ocurre antes de liberar cualquier azúcar reductor - Conforman la primera etapa de la hidrólisis: "Amorfogénesis" 	Arantes & Saddler (2010); Chen <i>et al.</i> (2010); Jäger <i>et al.</i> (2011); Kang <i>et al.</i> , (2013); Kim <i>et al.</i> , (2014); McQueen, Durachko, & Cosgrove, (1992); Saloheimo <i>et al.</i> , (2002); Y. Wang <i>et al.</i> , (2011); Wilson, (2009); Zhou <i>et al.</i> , (2011); Coughlan, (1985); Din <i>et al.</i> , (1991); Teeri, (1997)	<ul style="list-style-type: none"> - Mecanismo oxidativo - Ayudan en proceso de degradación de la celulosa - Han mostrado homología a la familia 61 de las GH 	Luciano S. <i>et al.</i> , (2012)

2.1.2.1.2 Actividad y propiedades de las celulasas

Para comparar la eficacia de una celulasa o de celulasas como sistema, existen diversas técnicas que permiten medir dicha actividad, en general se emplean diversos sustratos que se caracterizan por los enlaces y estructura de interés para la determinación de actividades específicas o la actividad total (Dashtban *et al.*, 2010). De acuerdo con Burkheisser (2010), la actividad colectiva de los sistemas de enzimas es mucho más eficiente que la actividad individual o cualquier enzima aislada, por esto, deben ser estudiadas como sistemas que trabajan sinérgicamente.

Existen múltiples propuestas de ensayos para evaluar la actividad, de acuerdo a los propósitos de los experimentos muchos institutos de investigación adoptan diferentes métodos y realizan modificaciones de acuerdo a su propia experiencia (Shuangqi *et al.*, 2011). Sin embargo, en la mayoría de técnicas, las condiciones del ensayo (pH y temperatura) dependen de las propiedades de cada enzima y varían de acuerdo al microorganismo del que provienen (Dashtban *et al.*, 2010). Las celulasas presentan principalmente cuatro actividades:

- **Actividad total:** es el resultado de la acción concertada entre EG, ExG y β G. Se basa en el grado de conversión del sustrato insoluble con fracciones cristalinas y amorfas en un tiempo específico. (Zhang *et al.*, 2006; Zhang, Hong, & Ye, 2009)
- **Actividad Endoglucanasa:** es el resultado de la acción de las EG al romper los enlaces β -1,4-glicosídicos de sustratos solubles de alto GP derivados de celulosa como carboximetilcelulosa o

hidroxietilcelulosa entre otros, midiendo los cambios en azúcares reductores, viscosidad o color según el método (Eveleigh *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009).

- **Actividad Exoglucanasa:** es el resultado de la acción de las ExG en los terminales reductores y no reductores de las cadenas del derivado de celulosa con bajo grado de polimerización y alta relación terminales/accesibilidad. Se sugiere medirse en enzimas purificadas, pues los productos de su actividad son transitorios en presencia de β -G, o en complejos enzimáticos inhibiendo la acción de las β G (Dashtban *et al.*, 2010; Goyal, Ghosh, & Eveleigh, 1991; Zhang *et al.*, 2009)
- **Actividad β -Glucosidasa:** es el resultado de la acción de las β G hidrolizando los enlaces β -1,4-glicosídicos de sustratos solubles de la celobiosa y celodextrinas con GP 3–6 y sustratos cromogénicos como el *p-nitrofenol*- β -D-1,4-glucosido (Zhang *et al.*, 2009)

La unidad de medida empleada en las actividades enzimáticas es la Unidad Internacional (UI), la cual se define como la liberación de 1 μ mol/min del producto de hidrólisis bajo las condiciones de ensayo (Ghose, 1987).

En cuanto a las propiedades de estas proteínas, es difícil generalizar el tamaño de las diferentes celulasas. Las EG más pequeñas y más grandes reportadas han sido 5.3 y 145 kDa respectivamente (Bisaria & Ghose, 1981; Ladisch, Lin, Voloch, & Tsao, 1983; Selby & Maitland, 1965), la mayoría de las ExG son glicoproteínas con pesos moleculares más pequeños respecto a las demás celulasas (M. P. Coughlan, 1985) y las β G parecen ser las celulasas de mayor peso molecular encontradas hasta ahora con valores en el rango de 35 a 440 kDa (Meyer & Canevascini, 1981; T.M. Wood, 1975). La Tabla 8 resume algunas propiedades de celulasas identificadas en diferentes hongos de las especies *Verticillium sp.* y *Penicillium sp.*, la revisión de estudios hecha para la consolidación de esta información permite destacar que fueron escasos los estudios disponibles respecto a celulasas producidas por la especie *Verticillium*, lo cual genera un impacto en el conocimiento de potenciales aplicaciones industriales con estas cepas.

Tabla 8. Algunas propiedades de celulasas en diferentes hongos *Penicillium* y *Verticillium*

Celulasa	Peso molecular (kDa)	pH isoelectrico	pH / T° óptimo	Organismo	Referencias
Exo-glucanasas	46.3	4.36	60°C	<i>P. funiculosum</i>	Wood, McCrae, & Macfarlane (1980)
	48	5.0	4.5 / 65°C	<i>Penicillium sp. CR-316</i>	Picart <i>et al.</i> (2007)
	38	N.R.	N.R.	<i>P. expansum YT01</i>	Tao <i>et al.</i> (2009)
	58.41	5.62	N.R.	<i>Verticillium dahliae</i> VdLs.17	Mandelc & Javornik (2015)
	49.24	7.49	N.R.	<i>Verticillium albo-atrum VaMs.102</i>	Mandelc & Javornik (2015)
I	63	N.R.	N.R.	<i>P. brasilianum IBT 20888</i>	Jørgensen <i>et al.</i> (2003)
	55	3.7	4.0 / -	<i>P. verruculosum</i>	Morozova <i>et al.</i> (2010)
	66	4.6	4.0 / -	<i>P. verruculosum</i>	Morozova <i>et al.</i> (2010)
	50.8	N.R.	5.0 / -	<i>P. oxalicum GZ-2</i>	Liao <i>et al.</i> (2015)
II	70	4.1	N.R.	<i>P. brasilianum IBT 20888</i>	Jørgensen <i>et al.</i> (2003)
	50	4.2	4.0 / -	<i>P. verruculosum</i>	Morozova <i>et al.</i> (2010)
	60	4.6	4.0 / -	<i>P. verruculosum</i>	Morozova <i>et al.</i> (2010)
	60	-	5.0 / 50°C	<i>P. decumbens</i>	Gao <i>et al.</i> (2011)
Endo-glucanasas	35 - 37	7.1	4,5 / 65°C	<i>Penicillium sp. CR-316</i>	Picart <i>et al.</i> (2007)
	91.37	6.6	N.R.	<i>Verticillium albo-atrum VaMs. 102</i>	Mandelc & Javornik (2015)
	43.7	5.96	N.R.	<i>Verticillium dahliae</i> VdLs.17	Mandelc & Javornik (2015)
	42	8.3	5.0 / 50°C	<i>P. pinophilum MS20</i>	Pol, Laxman & Rao (2012)
	37	5.0	5.0 / 28°C	<i>P. pinophilum KMJ601</i>	Jeya <i>et al.</i> (2010)
	25	N.R.	4 - 5/50-60°C	<i>P. pinophilum</i> IMI87160ii	Bhat, McCrae & Wood (1989)
	70.13 - 78.83	N.R.	5.0 / 70°C	<i>P. echinulatum 9A02S1</i>	Volkov <i>et al.</i> (2014)
	37	7.4	3.4 / 60°C	<i>P. purpurogenum</i> KJS506	Lee <i>et al.</i> (2010)
	48	5.28	N.R.	<i>P. canescens</i>	Chulkin <i>et al.</i> (2009)
	33	N.R.	N.R.	<i>P. citrinum</i>	Lima <i>et al.</i> (2013)
I	73.0	N.R.	N.R.	<i>P. expansum YT01</i>	Tao <i>et al.</i> (2009)
	25.32	8.53	N.R.	<i>Verticillium albo-atrum VaMs.102</i>	Mandelc & Javornik (2015)
	21	5.4	5 / -	<i>P. brasilianum IBT 20888</i>	Jørgensen <i>et al.</i> (2003)
	52	3.4	4.3 / -	<i>P. verruculosum</i>	Morozova <i>et al.</i> (2010)
	70	4.0	5.0 / -	<i>P. verruculosum</i>	Morozova <i>et al.</i> (2010)
	58,1	N.R.	3.0 / 50°C	<i>P. oxalicum GZ-2</i>	Liao <i>et al.</i> (2015)
	47,2	N.R.	4 - 5 / 55°C	<i>P. decumbens</i>	Sun <i>et al.</i> (2008)
	80 - 90	4.5	4 - 4.5 / 50°C	<i>P. canescens</i>	Zampieri <i>et al.</i> (2013)
II	43	N.R.	N.R.	<i>P. expansum YT01</i>	Tao <i>et al.</i> (2009)
	53-54	4.1-4.1	5 / -	<i>P. brasilianum IBT 20888</i>	Jørgensen <i>et al.</i> (2003)
	39	2.0	4.5 / -	<i>P. verruculosum</i>	Morozova <i>et al.</i> (2010)
	33	4.1	3.5 / -	<i>P. verruculosum</i>	Morozova <i>et al.</i> (2010)
	43.9	N.R.	N.R.	<i>P. janthinellum</i>	Pol, Laxman & Rao (2012)
	40	N.R.	4.0 / 50°C	<i>P. verruculosum</i>	Chulkin <i>et al.</i> (2009)
	41,8	N.R.	4 - 5 / 55°C	<i>P. decumbens</i>	Sun <i>et al.</i> (2008)

Celulasa	Peso molecular (kDa)	pH isoelectrico	pH / T° óptimo	Organismo	Referencias
III	40	N.R.	N.R.	<i>P. expansum</i> YT01	Tao <i>et al.</i> (2009)
	25	5.6	4.0 / -	<i>P. verruculosum</i>	Morozova <i>et al.</i> (2010); Tishkov <i>et al.</i> (2013)
V	20 – 25	N.R.	4 - 5 / 55°C	<i>P. decumbens</i>	Sun <i>et al.</i> (2008)
	58	N.R.-	5.0 / 60°C	<i>P. verruculosum</i>	Kim, Cho, Choi, <i>et al.</i> (1992)
V	30.37	9.33	N.R.	<i>Verticillium dahliae</i>	Mandelc & Javornik (2015)
	34 - 43	N.R.	4 - 5 / 55°C	<i>VdLs.17</i> <i>P. decumbens</i>	Sun <i>et al.</i> (2008)
<u>β-Glucosidasas</u>	120	N.R.	4.4-5.2/60°C	<i>P. expansum</i> YT01	Bai <i>et al.</i> (2013)
	66.8	6,28	N.R.	<i>Verticillium Dahliae</i>	Mandelc & Javornik (2015)
	57.8	N.R.	N.R.	<i>VdLs.17</i> <i>P. oxalicum</i> GZ-2	Liao <i>et al.</i> (2015)
	120	N.R.	3.5 / 32°C	<i>P. echinulatum</i> 9A02S1	Zampieri <i>et al.</i> (2013)
	92	N.R.	5.0 / 60°C	<i>P. decumbens</i>	Ko <i>et al.</i> (2013)
	220	N.R.	N.R.	<i>P. piceum</i>	Gao, Gao <i>et al.</i> (2013)
	101	N.R.	5.0 / 60°C	<i>P. pinophilum</i> KMJ601	Joo <i>et al.</i> (2010)
	44.4	4.5	5.0 / 60°C	<i>P. janthinellum</i>	Kaur, Chadha, <i>et al.</i> (2015)
	120	N.R.	4.0 - 5.0 / 60°C	<i>P. funicolosum</i> NCL1	Ramani <i>et al.</i> (2012)
	110	N.R.	5.0 / 65°C	<i>P. purpurogenum</i> KJS506	M. Chen <i>et al.</i> (2010)
I	98	5.5	4.5-5/65-70°C	<i>P. decumbens</i>	M. Chen <i>et al.</i> (2010)
I	98	5.5	N.R.	<i>P. occitanis</i>	Bhiri <i>et al.</i> (2008)
II	98	5.3	N.R.	<i>P. occitanis</i>	Bhiri <i>et al.</i> (2008)

* N.R.: Valores no reportados en los estudios.

2.1.2.1.3 Producción de extractos celulósicos

La información respecto a la producción de enzimas en especies como *Penicillium sp.* y *Verticillium sp.* en diferentes sustratos es inferior en comparación con los reportados para especies como *Trichoderma* y *Aspergillus*. No obstante, estudios como los de Bahkali (1995, 1996), Brown *et al.* (1987a, 1987b), Chaabouni *et al.* (1994), Chandra *et al.* (2009), Carder (1989), Esterbauera *et al.* (1991), Krogh *et al.* (1991), Jørgensen, Eriksson, *et al.* (2003), Jørgensen, Kutter, *et al.* (2003), Jørgensen, *et al.* (2004, 2005), Jørgensen & Olsson (2006), Martins, *et al.* (2008), Moreno & Vélez (2010), Morozova, *et al.* (2010), Singhania, Sukumaran & Pandey (2007), Shi, Xu & Zhu (2009), Skomarovskiĭ *et al.* (2006) y Wang *et al.* (2003) entre otros, demuestran que son organismos productores eficientes de celulasas y hemicelulasas en diferentes sustratos y con gran potencial para el proceso de producción de azúcares fermentables.

De hecho, preparaciones de celulasas de cepas mutantes de *Penicillium verruculosum* han demostrado tener un rendimiento superior sobre preparaciones de *Trichoderma* en la hidrólisis de diferentes sustratos celulósicos, debido a una composición más equilibrada en el complejo de celulasas y un mayor nivel de actividad de βG (Berlin *et al.*, 2006; Castellanos, Sinitsyn, & Vlasenko Yu., 1995a; Castellanos *et al.*, 1995b; Morozova *et al.*, 2010; Skomarovskiĭ *et al.*, 2006; Skomarovsky *et al.*, 2005). Sumado a lo anterior,

diferentes estudios han demostrado que especies de *Penicillium* generalmente producen una mezcla de enzimas con mejor actividad en papel filtro y actividad β G que *Trichoderma* (Brown, Collin, & Wood, 1987a; Chaabouni *et al.*, 1994; Jørgensen & Olsson, 2006; Krogh *et al.*, 2004).

De igual forma, Bahkali (1995) reporta producción de EG, ExG y β G en cultivos de *Verticillium tricorpus* con diferentes fuentes de carbono (Xilano, Pectina, y CMC), teniendo la máxima producción de ExG y β G en los cultivos con pectina, corroborando los resultados de Gupta & Heale (1971) respecto a la producción de celulasas totalmente constitutivas (EG, ExG y β G) en ausencia de celulosa como sustrato. Dichos hallazgos se coinciden con lo reportado por Mandelc & Javornik (2015), quienes identificaron la producción de diversas proteínas en *Verticillium albo-atrum* y *Verticillium dahliae*, de las cuales se identificaron según el sustrato, 12% en celulosa, 14% en hemicelulosa y 50% en pectina, entre otros sustratos evaluados.

2.1.3 PRODUCCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES Y BIOCOMBUSTIBLES CON ENZIMAS

El uso de enzimas para la producción de azúcares fermentables, es uno de los factores de mayor costo en la producción de etanol a partir de material celulósico (Merino & Cherry, 2007) y se estima que puede representar hasta el 50% del costo del proceso (Ramos, Breuil, & Saddler, 1993).

En la actualidad, la mayoría de celulasas comerciales (incluyendo β G) son producidas por las especies *Trichoderma sp.* y *Aspergillus sp.* (Cherry & Fidantsef, 2003; G. Henriksson *et al.*, 2009a; Kirk, Torben V., & Fuglsang, 2002; Zhang *et al.*, 2006); Nieves, *et al.* (1998) analizaron 13 celulasas comerciales (Biocellulase, Celluclast, Cellulase, Econase, Multifect, Spezyme y ULM entre otras) de diferentes compañías productoras para determinar el origen de las preparaciones comerciales, encontrando que el 77% de las enzimas estudiadas tenían como organismo de origen *T. reesei*, 15% provenían de cepas de *A. niger* y solo 8% corresponden a *T. viride*.

A manera de ejemplo, Skomarovsky *et al.* (2006) compararon la eficiencia en la hidrólisis de pulpa lignocelulósica (madera conífera pretratada) haciendo uso de una preparación de celulasas del género *Penicillium*, respecto a la eficiencia obtenida con una enzima comercial del género *Trichoderma*. Como resultado del estudio, la hidrólisis con la preparación de enzimas de *Penicillium* tuvo un rendimiento superior en azúcares reductores y glucosa que los de la otra especie. Por otra parte, Wang *et al.* (2010) no encontraron diferencias significativas en el rendimiento de las celulasas producidas por *T. reesei* en lodo papelerero como sustrato, frente a las celulasas comerciales Spezyme CP®, del mismo microorganismo en un proceso SSF.

2.1.3.1 Hidrólisis y fermentación simultánea (SSF)

La hidrólisis y fermentación simultánea, también conocida como SSF por sus siglas en inglés (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*), es un método para producir etanol a partir de biomasa lignocelulósica en el que tanto la hidrólisis enzimática de la celulosa por enzimas fúngicas y la fermentación de los azúcares resultantes se producen en el mismo reactor (Dowe & Mcmillan, 2008; Lynd et al., 2001; Ma, Kosa, & Sun, 2014). En este proceso, la hidrólisis de las fibras de celulosa a glucosa se da por la acción de las celulasas y la conversión de glucosa a etanol se logra por fermentación con levadura (Lynd *et al.*, 2001). La Tabla 9 resume algunas ventajas y desventajas del proceso.

Sin embargo, Novozymes (2010) indica que para lograr unas condiciones ideales durante la SSF, se requiere dar más tiempo a las celulasas para la conversión de los azúcares que permita alcanzar un nivel específico de conversión de glucosa. Con respecto a esta afirmación, Farid, El-Enshasy & Noor El-Deen (2002) reportan que la cantidad de alcohol producida en un proceso SSF con *S. cerevisiae* se ve afectado por el tiempo de adición del inóculo, aumentando la producción de etanol a 68% con un inóculo a las 72 horas de fermentación.

La SSF se considera como el principal proceso para la bioconversión de materiales lignocelulósicos (Ma et al., 2014; Merino & Cherry, 2007; G P Philippidis, Smith, & Wyman, 1993; Prasetyo et al., 2011). Se han identificado cuatro factores principales que influyen en la cinética de este proceso: (i) calidad del sustrato celulósico; (ii) calidad del complejo de celulasas; (iii) interacción entre sustrato – enzima; y (iv) interacción entre las enzimas y la levadura (G. P. Philippidis, Spindler, & Wyman, 1992).

Tabla 9. Ventajas y desventajas de la hidrólisis y fermentación simultánea

	Descripción	Referencias
Ventajas	Mantiene la concentración de azúcar soluble por debajo del límite de inhibición, haciendo que la SSF se dé bajo condiciones de azúcares limitadas.	Li Kang <i>et al.</i> (2010); T. Ma <i>et al.</i> (2014); Madrid & Quintero (2011) ; Merino & Cherry (2007); Wu & Lee (1997); Villadsen, Nielsen & Lidén (2011)
	Ventajas cinéticas: - Mejora las velocidades de hidrólisis - Reduce los tiempos de residencia - Mejora los rendimientos de etanol	Wu & Lee (1997); Lynd <i>et al.</i> (2001); Wingren <i>et al.</i> (2003); Yamashita <i>et al.</i> (2008); Bezerra & Dias (2005); G P Philippidis <i>et al.</i> (1993)
	El efecto de la acumulación de etanol es más importante en su misma producción que el efecto inhibitorio en las celulasas	Duff & Murray (1996)
	Aumenta la eficiencia de las celulasas pues la temperatura del proceso evita la desnaturalización de las mismas.	Duff & Murray (1996)
	La agitación mejora la transferencia de masa de los azúcares a la levadura	L Kang <i>et al.</i> (2011) Villadsen, Nielsen & Lidén (2011)

	Descripción	Referencias
Desventajas	La temperatura del ensayo compromete la temperatura óptima de hidrólisis (45 - 50 °C según la enzima) y la de fermentación (20 - 40 °C según el microorganismo), lo cual puede afectar el rendimiento de alguno de los dos procesos.	Duff & Murray (1996) Lin, Wang & Wang (2012)
	El aumento de la agitación puede disminuir la producción de etanol	Santos <i>et al.</i> (2012)

2.1.3.2 Producción de etanol a partir de lodos papeleros

El lodo paplero es un candidato potencial para la producción de etanol. Diversos autores destacan las características y ventajas que hacen de este residuo una materia prima de interés frente a otros materiales lignocelulósicos para procesos enzimáticos industriales emergentes de biomasa celulósica: i) viabilidad para hidrólisis de la mayoría de lodos de la industria paplera; ii) producción concentrada en un sitio específico y de manera constante; iii) aprovechamiento que evita los elevados costos de transporte y disposición en un relleno sanitario; iv) costo cero o negativo de la materia prima; v) posibilidad de aprovechamiento de algunos elementos e infraestructura disponible en las fábricas de papel, vi) potencial de recuperación de minerales mejorados como resultado de la hidrólisis enzimática; y vii) potencial de simplificación del proceso al no requerir pre-tratamiento de la biomasa (a diferencia de otros residuos lignocelulósicos) (Hui Chen, Venditti, et al., 2014; Duff et al., 1994; Zhiliang Fan et al., 2003; Li Kang et al., 2010; Lynd et al., 2001; Madrid & Quintero, 2011; Marques et al., 2008; Yu, Jameel, Chang, & Park, 2011), según Kang *et al.* (2010) el pre-tratamiento es la etapa principal en las plantas de bioetanol y puede representar un 30% del costo total de la producción.

La revisión bibliográfica efectuada respecto al uso del lodo paplero en producción de azúcares fermentables y/o etanol (Tabla 10), permite destacar que la mayoría de los estudios (89%) emplearon enzimas comerciales para la hidrólisis enzimática, sólo 2 estudios (11%) emplearon lodo como sustrato para la producción de extractos enzimáticos y un solo estudio (5.2%) corresponde producción científica colombiana para producción de bioetanol con enzimas comerciales. A la luz de esta información, el uso de extractos enzimáticos en procesos de biotransformación de lodos de papel en azúcares fermentables y/o etanol, es un aspecto que no se ha evaluado a nivel internacional ni nacional.

Tabla 10. Revisión bibliográfica sobre el uso de lodo papelerero y enzimas celulósicas

Tipo de estudio	Autores	Total
Hidrólisis enzimática o SSF de lodo papelerero con enzimas comerciales	Chen <i>et al.</i> (2014), Hui Chen <i>et al.</i> (2012), Chu & Feng (2013), Duff, Moritz & Andersen (1994), Z. Fan & Lynd (2007a), Fan <i>et al.</i> (2003), Helm <i>et al.</i> (2011), Kang <i>et al.</i> (2011), Li Kang <i>et al.</i> (2010), Lark <i>et al.</i> (1997), Lynd <i>et al.</i> (2001), Madrid & Quintero (2011), Marques <i>et al.</i> (2008), Peng & Cheng (2011), Silva <i>et al.</i> (2011) y Yamashita <i>et al.</i> (2008).	16
Hidrólisis enzimática o SSF de lodo papelerero con extractos enzimáticos	No se encuentran estudios disponibles	0
Producción de extractos celulósicos con lodo papelerero como sustrato	Wang <i>et al.</i> (2010), Prasetyo <i>et al.</i> (2011)	2

De acuerdo con Yamashita, *et al.* (2008) y Lark *et al.* (1997), la SSF es el proceso ideal para la producción de bioetanol a partir del lodo papelerero, la conversión de este sustrato por el proceso SSF ha sido previamente estudiado por varios autores (Duff *et al.*, 1994; Z. Fan & Lynd, 2007a; Zhiliang Fan *et al.*, 2003; L Kang *et al.*, 2011; Li Kang *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2012; Lynd *et al.*, 2001; Marques *et al.*, 2008; Prasetyo *et al.*, 2011; Wei Wang *et al.*, 2010; Yamashita *et al.*, 2008). De hecho el estudio de Lynd *et al.* (2001) indica que la mayoría de los lodos papeleros son altamente susceptibles a la hidrólisis enzimática tal como se reciben del proceso. Lark *et al.* (1997) reporta producción de etanol de hasta 35 g/L a partir de 190 g/L de lodo de papel reciclado en de 72 horas de fermentación. De otro lado, entre las concentraciones más altas de etanol reportadas en estudios de SSF usando paja de trigo ha sido 57 g/L con solo una conversión del 70% de la celulosa (Mohagheghi *et al.*, 1992), así mismo, el estudio comparativo de SHF y SSF de Prasetyo *et al.* (2011) muestra que la hidrólisis previa a la fermentación (60 horas aproximadamente) no es apropiada para este proceso considerando los extensos tiempos para producción de azúcares y las altas concentraciones de azúcares que podrían afectar el proceso de hidrólisis.

En tal sentido, Kang *et al.* (2011) obtuvo rendimientos de etanol superiores en un proceso SSF a 250 rpm, con carga de sólidos de 13.5% de glucano en un lodo papelerero sin tratar y 10 FPU de celulasas + 20 CBU de β -glucosidasa/g glucano, comparado con los rendimientos logrados bajo 150 y 100 rpm. Por otra parte Duff, Moritz & Andersen (1994) lograron un 60% de reducción en masa del lodo papelerero al ser tratado por SSF, sumado a la disminución de capacidad de retención de agua del lodo después del proceso reportado por Lark *et al.* (1997). Adicionalmente, Duff, Moritz & Casavant (1995) reportan que la reducción del tamaño de partícula del lodo mejora el proceso de hidrólisis aumentando la producción de azúcar a 35 g/L.

2.1.3.3 Algunos factores de inhibición en la bioconversión

La actividad de las celulasas y la eficiencia del proceso en sí puede verse afectado por algunos aspectos que se han mencionado de manera general en los numerales 2.1.2 y 2.1.2.1.1 Algunas de estas se describen en mayor detalle a continuación.

Respecto a las hemicelulasas, la síntesis de xilanas (principal hemicelulosa), es inhibida por la celobiosa (Wilson, 2011), una baja actividad de xilanasas corresponde a una menor transformación de xilano, que a su vez afecta la hidrólisis del glucano pues el xilano físicamente rodea las fibras de celulosa en la estructura de la lignocelulosa, convirtiéndose en una barrera para la acción de la glucanasa (Li Kang *et al.*, 2010; Wei Wang *et al.*, 2010). Resultados del trabajo de Wang *et al.* (2010) lo confirman, pues el alto rendimiento del glucano observados en la hidrólisis de la α -celulosa de su investigación era debido a una actividad de xilanasas.

Considerando el producto de la hidrólisis enzimática, la velocidad de la hidrólisis se ve afectada por los azúcares monoméricos y oligoméricos liberados (Merino & Cherry, 2007) por las razones descritas en la Tabla 6. Varga *et al.* (2002) reportan que la inhibición del producto se da a partir de 15 g/L de glucosa, de igual forma; en cuanto a la fermentación, el etanol es un inhibidor moderado de las celulasas pero menos potente que la celobiosa y glucosa como inhibidores (G P Philippidis *et al.*, 1993). Es así que, Madrid & Quintero (2011) reportan una inhibición significativa del proceso de producción de etanol con lodos papeleros por concentraciones de etanol iguales o mayores a 5 g/L.

Así mismo, diversos estudios demuestran que en procesos de fermentación, la carga de sólidos puede crear un efecto inhibitorio para la actividad de las celulasas (Li Kang *et al.*, 2010; Madrid & Quintero, 2011). Kang *et al.* (2011) reporta bajo rendimiento de producción de etanol con cargas de 21,6% w/v de lodo base seca, de igual forma Madrid y Quintero (2011) observaron una mezcla inapropiada del bioproceso con cargas de lodo base seca de 9% w/v. En resumen, la agitación puede verse afectada por una alta carga de sólidos en el proceso pues esta condición aumenta la viscosidad de la mezcla de reacción y por ende requiere más tiempo para lograr licuefacción y reducción del tamaño de partícula de los sólidos (L Kang *et al.*, 2011).

Considerando que la carga de sólidos presenta un contenido de cenizas según lo descrito en 2.1.1.2, estas pueden causar problemas de manipulación y obstaculizar la bioconversión (Wei Wang *et al.*, 2010; Yamashita *et al.*, 2008). Las cenizas solubles en ácido (como CaCO_3), no solo crean un efecto buffer (usualmente 2-3 niveles mayores al pH óptimo de las enzimas), sino que adsorbe las celulasas con mayor afinidad a las fibras celulósicas (Chen *et al.*, 2012). Kang *et al.* (2011) demostraron que el efecto inhibitorio de las cenizas se da más en la reacción enzimática que en la reacción microbiana de la fermentación, ya que

algunos compuestos de las cenizas recubren las fibras, obstruyendo el acceso de las enzimas al sustrato, otros como las arcillas, forman agregados con moléculas orgánicas que crean complejos enzima-arcilla por su extensa área superficial que disminuyen su movilidad y alteran la actividad catalítica generando así un efecto inhibitorio en la actividad de las celulasas y por ende, afectando la digestibilidad de las fibras del lodo (Cabezas, Salvador, & Sinisterra, 1991; Chen, Han, *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2012; Hamzei & Pflug, 2007; Haskå, 1981; L Kang *et al.*, 2011; Lammirato, *et al.*, 2010).

Las cenizas presentes en los lodos de los procesos de pulpa virgen de papel kraft y de destintado reciclado estudiados por Chen *et al.*, (2014), presentaron absorción de 3 – 5 mg de enzima por gramo de arcilla insoluble en ácido y la mitad de este valor de enzima es absorbida por el carbonato soluble en ácido. Chen *et al.*(2012) y Kang *et al.* (2010) encontraron una conversión enzimática ineficiente por SHF de dos lodos papeleros haciendo uso de enzimas comerciales, debido a la interferencia ocasionada por las cenizas en el bioproceso que se resumen en tres razones principales: i) alto pH a causa del contenido de CaCO_3 de las cenizas, ii) limitación de la capacidad de carga de la fermentación a causa del alto contenido de cenizas y disminución de la eficiencia de las enzimas en el bioproceso, así como iii) interferencia en control de pH debido a que las cenizas son parcialmente neutralizadas por el ácido carbónico entre otros producidos en los procesos SSF y SSCF (hidrólisis y cofermentación simultánea), actuando como buffer en el proceso de fermentación. Esta última, pudo convertirse en una condición favorable en el proceso SSF con *S. cerevisiae*, considerando que un proceso de fermentación de ambos lodos sin control de pH, presentaron pH inicial de 7.05 y 7.12, los cuales disminuyeron hasta 5.73 y 5.69 respectivamente, valores cercanos al pH óptimo de esta levadura, pero distante del pH óptimo de las celulasas.

Wang *et al.* (2010), evalúan este residuo con eliminación parcial del contenido de cenizas como sustrato para producción de celulasas y como fuente de carbono en un proceso SSF, las cenizas presentes en el lodo no resultaron inhibitorias en la producción de etanol por *S. cerevisiae* con una carga de glucano inicial de 6%. Por otro lado, Kang *et al.* (2011) obtuvieron un rendimiento de etanol de 72.8% y 6% w/v de carga de glucano.

2.1.4 MATRIZ DE PRIORIZACIÓN PARA TOMA DE DECISIONES

Una matriz de criterios o priorización, es una herramienta para evaluar opciones basándose en una determinada serie de criterios explícitos que se han decidido calificar como importantes para tomar una decisión aceptable de manera racional y coherente (Ministerio de protección social, 2006)

Esta herramienta permite la selección de una decisión entre varias opciones con base en la ponderación que se le puede dar a la opción al aplicar un determinado criterio. La aplicación de la matriz de priorización conlleva pasos previos como lo son: determinación de las opciones o aspectos sobre las cuáles decidir, identificación de criterios y la valoración o peso de los criterios, para ponderar cada una de las opciones o aspectos (Espinoza & Gómez, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Producir bioetanol a partir de lodos papeleros por técnicas de hidrólisis y fermentación simultánea con un extracto enzimático obtenido a partir de hongos filamentosos.

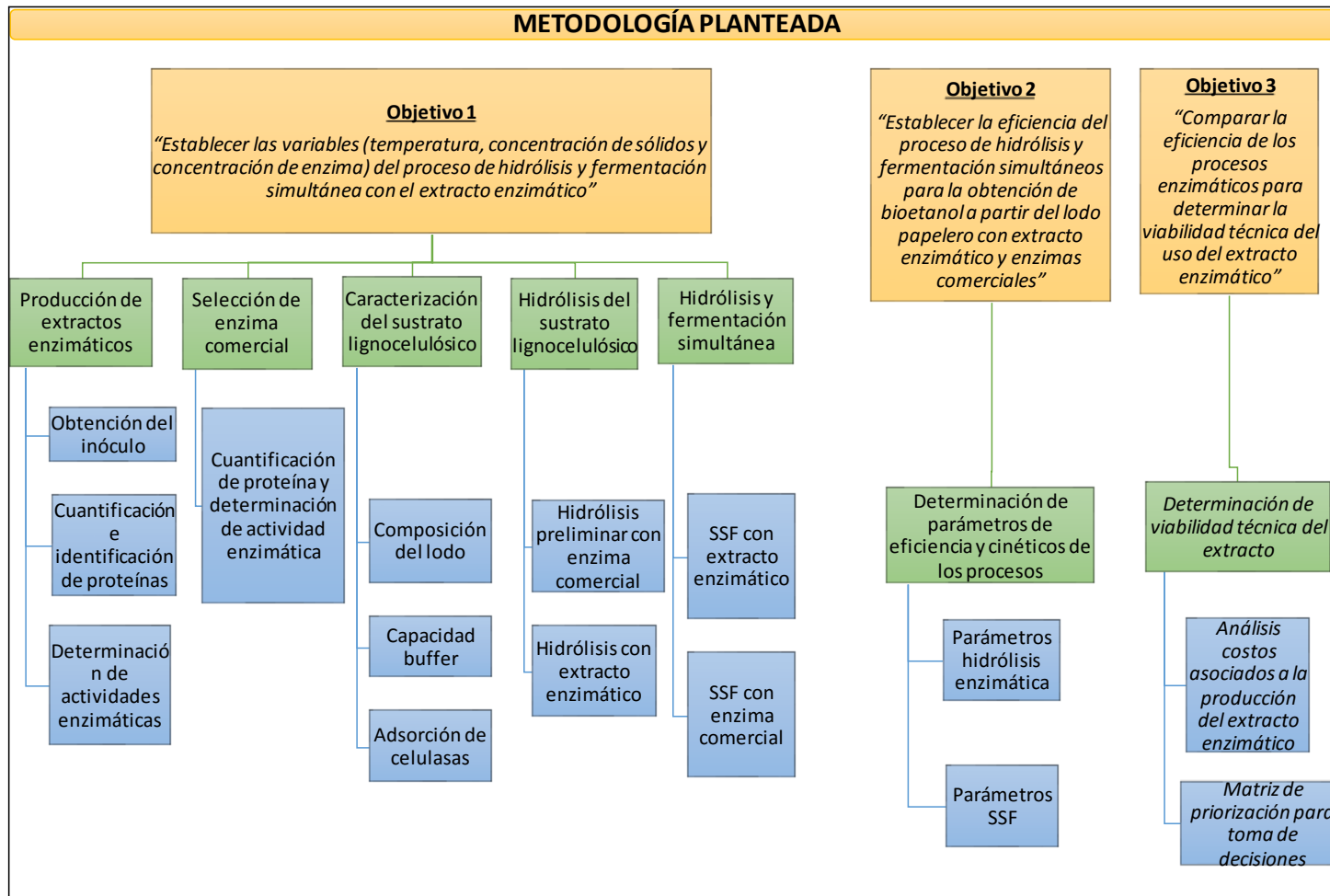
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer las variables (temperatura, concentración de sólidos y concentración de enzima) del proceso de hidrólisis y fermentación simultánea con el extracto enzimático.
- Establecer la eficiencia del proceso de hidrólisis y fermentación simultáneas para la obtención de bioetanol a partir de lodo paplero con extracto enzimático y enzimas comerciales.
- Comparar la eficiencia de los procesos enzimáticos para determinar la viabilidad técnica del uso del extracto enzimático.

4 METODOLOGÍA

Para el logro de los objetivos planteados, se propone el esquema de trabajo planteado en la Figura 4.

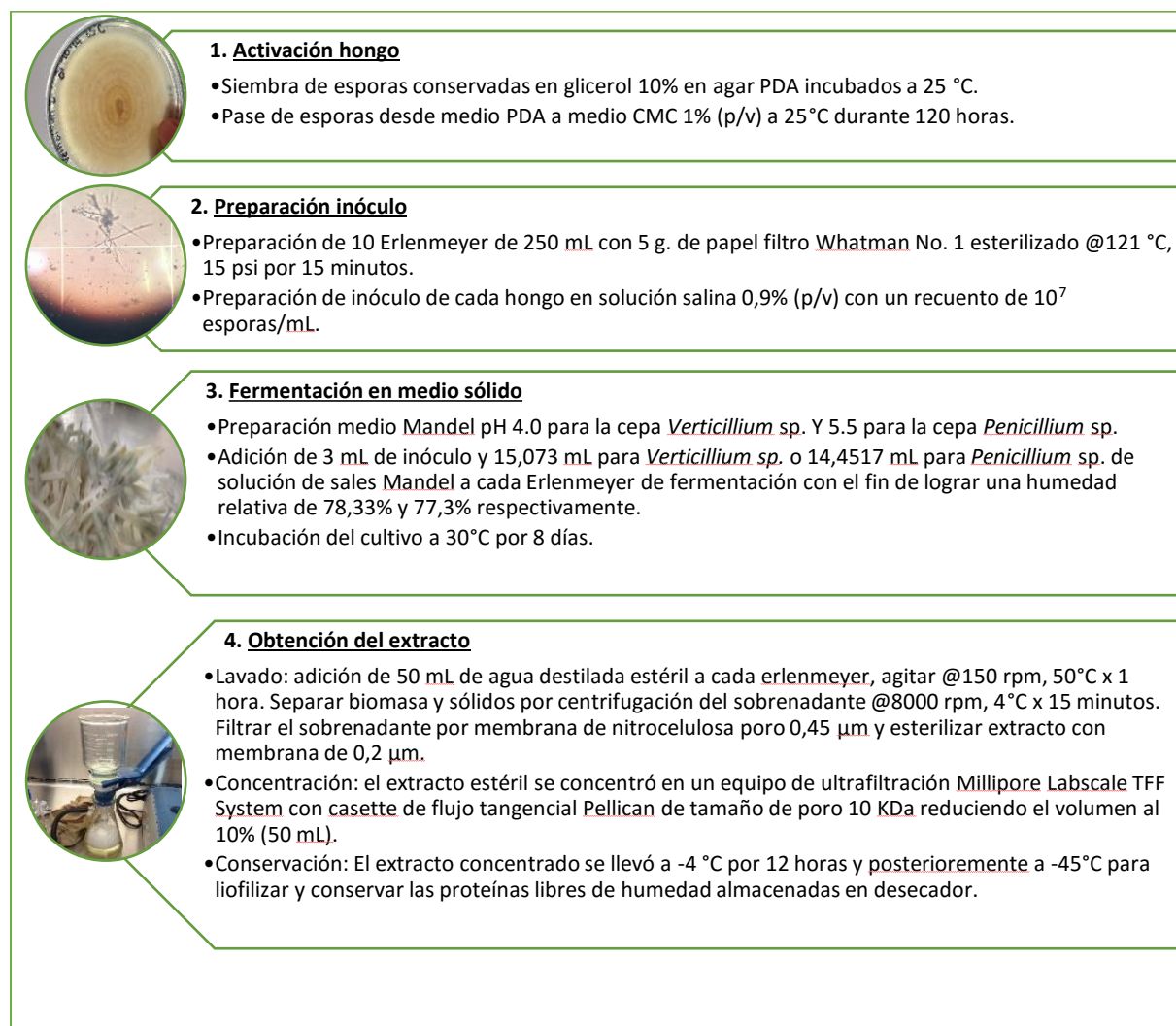
Figura 4. Metodología de trabajo



4.1 PRODUCCIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS A PARTIR DE HONGOS FILAMENTOSOS

Las cepas seleccionadas, *Verticillium sp.* y *Penicillium sp.*, fueron aisladas a partir de residuos sólidos agroindustriales por Beltrán & Leguizamón (2012) e identificados morfológica y molecularmente por Méndez (2015). Estos hongos se encuentran crioconservados en el cepario de la Universidad de La Sabana. Fueron seleccionados en este estudio considerando la actividad celulolítica identificada por Beltrán & Leguizamón (2012) y caracterización bioquímica del extracto enzimático producido a partir de estos hongos hecha por Pulido (2013). El proceso general para producción del extracto enzimático se hizo de acuerdo al protocolo desarrollado por Pulido (Pulido, 2013), el cual se resume en la Figura 5. La preparación de los medios de cultivo y solución salina se describen en el ANEXO A.

Figura 5. Proceso de producción extractos enzimáticos (Pulido, 2013)



4.1.1 OBTENCIÓN DEL INÓCULO

Posterior a la activación de las cepas en PDA, de acuerdo a lo descrito en la Figura 5, se hizo pase de esporas a cajas de Petri con agar CMC 1% a 25°C, haciendo seguimiento al crecimiento radial. Estos datos fueron ajustados a un modelo de crecimiento microbiano con la herramienta DMFit®, el cual es un complemento de Excel que basado en el modelo de crecimiento microbiano de Gompertz, permite identificar diferentes parámetros de crecimiento. Para este caso, se determinó la tasa de crecimiento y el coeficiente de correlación del ajuste del modelo (R^2).

4.1.2 CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN EXTRACTOS

Una vez se obtuvo el extracto liofilizado, este fue pesado con el fin de tener un valor de referencia de la cantidad de extracto producido a partir de una cantidad específica de papel filtro inicial. Adicionalmente, las proteínas presentes en los extractos enzimáticos fueron cuantificadas por el método de Bradford modificado (Zor & Selinger, 1996) en extractos concentrados por ultrafiltración y en resuspensión del extracto liofilizado con agua desionizada en diferentes concentraciones. La curva de calibración empleada en este método tuvo un coeficiente de correlación de 0.9968 y todos los ensayos se hicieron por triplicado por medio de la técnica de microplatos con el equipo iMark Microplate – Reader marca Biorad. El ANEXO A presenta la información referente al método desarrollado.

Para identificar los pesos moleculares de algunas de las proteínas presentes en el extracto enzimático, se realizó electroforesis SDS-PAGE, las imágenes fueron analizadas con la herramienta ImageJ®, dicho programa se empleó para medir las distancias de las bandas tanto en el marcador como en las muestras respecto a una medida de referencia, con el fin de obtener la información del perfil electroforético y estimar así los pesos moleculares de las bandas identificadas en las tres réplicas de cada extracto. El perfil electroforético para cada gel se presenta en el ANEXO A.

4.1.3 DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Para la determinación de las actividades enzimáticas se seleccionaron los métodos descritos en la Tabla 11, la unidad empleada para describir la actividad en una celulasa es la Unidad Internacional (U), definida como los micromoles equivalentes de glucosa liberados por minuto según las condiciones del ensayo (Dashtban *et al.*, 2010). Para estos ensayos, se preparó una suspensión de 100 mg/mL para cada extracto en buffer citrato de sodio 0.05M y pH 4.8. La curva de calibración para el método de azúcares reductores DNS (Miller, 1959), tuvo un coeficiente de correlación de 0.9973 y todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Dicho método se preparó de acuerdo a la modificación propuesta por Bello, Carrera y Díaz (2006), usando 0.5 mL de DNS para 0.5 mL de muestra y posteriormente 5 mL de agua para dilución por cada mililitro de muestra con DNS. La información referente a la calibración del método se presenta en el ANEXO A.

Tabla 11. Métodos para determinación de las actividades enzimáticas en complejos de baja actividad

	Métodos	Unidad de medida	Autor
Actividad Total	<p>FPase. Se estima de acuerdo a la concentración de equivalentes de glucosa liberados por 1 mL de enzima de baja actividad, a partir de 50 mg de sustrato en 60 minutos de hidrólisis.</p> <p>Sustrato: papel filtro</p> <p>Producto: azúcares reductores (método DNS)</p>	<p>FPU: micromoles de glucosa liberados por minuto en las condiciones del cultivo.</p> <p>Para enzimas con baja actividad:</p> $FPU = \frac{mg \text{ Glucosa Liberados}}{0.18 \times 0.5 \times 60 \left(\frac{\mu mol}{min \times mL} \right)}$	<p>Ghose (1987)</p> <p>Miller (1959)</p>
Actividad Endoglucanasa	<p>CMCase. Se estima a partir de la concentración crítica de 0.5 mL de enzima que libera 0.5 mg de glucosa en 30 minutos de hidrólisis.</p> <p>Sustrato: CMC 0.5% (p/v)</p> <p>Producto: azúcares reductores (método DNS)</p>	<p>UI: micromol de equivalentes de glucosa liberados por minuto en las condiciones del cultivo.</p> <p>Para ensayos con baja actividad:</p> $CMC = \frac{mg \text{ Glucosa Liberados}}{0.18 \times 0.5 \times 30 \left(\frac{\mu mol}{min \times mL} \right)}$	<p>Ghose (1987)</p> <p>Eveleigh <i>et al.</i> (2009)</p> <p>Miller (1959)</p>

4.2 SELECCIÓN DE ENZIMA COMERCIAL

La enzima comercial empleada en este estudio para hidrólisis de material lignocelulósico fue el complejo CELLIC® de Novozymes, dicho complejo está compuesto por el complejo de celulasas CTec2 y complejo de endoxilanasas HTec2, sus características y beneficios se encuentran descritos en la ficha técnica presentada en el ANEXO D.

Se tomaron como dosis de referencia 3%, 6% y 9% (g Enzima/ g Celulosa) para efectos de comparación con el proceso del extracto enzimático, de acuerdo con las especificaciones de la ficha técnica, se estableció un suplemento intermedio de HTec2 de tal forma que la composición del complejo a manejar sea 70:30 (CTec2:HTec2).

4.2.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se cuantificó el contenido de proteína por el método de Bradford modificado (Zor & Selinger, 1996). La curva de calibración empleada en este método tuvo un coeficiente de correlación de 0.9968 y todos los ensayos se hicieron por triplicado por medio de la técnica de microplatos con el equipo iMark Microplate – Reader marca Biorad. El ANEXO A presenta la información referente al método. En cuanto a la actividad enzimática, la Tabla 12 describe el método empleado para determinar la actividad total de la enzima comercial.

Tabla 12. Método para determinación de la actividad total en complejos de alta actividad

	Métodos	Unidad de medida	Autor
Actividad Total	<p>FPase. Se estima a partir de la concentración crítica de 1 mL de enzima que libera 2 mg de equivalentes de glucosa (basado en azúcares reductores) a partir de 50 mg de sustrato en 60 minutos de hidrólisis.</p> <p>Sustrato: papel filtro</p> <p>Producto: azúcares reductores (método DNS)</p>	<p>FPU: micromoles de glucosa liberados por minuto en las condiciones del cultivo.</p> <p>Para enzimas con alta actividad:</p> $FPU = \frac{0.37}{[E]}$ <p>Donde: [E] es la concentración de enzima en la que se libera 2 mg de equivalentes glucosa bajo condiciones del ensayo.</p>	<p>Ghose (1987)</p> <p>Miller (1959)</p>

4.3 CARACTERIZACIÓN DEL SUSTRATO LIGNOCELULÓSICO

El lodo empleado en el presente estudio, proviene de una planta de producción de papeles suaves (papel tissue) localizada en la región de la sabana al norte de Bogotá, su proceso productivo emplea aproximadamente 85% de materia prima reciclada y solo 15% de fibra virgen, las etapas a destacar en el tratamiento de las fibras recicladas son: pulpeo, destintado y blanqueo.

Para la caracterización del sustrato, basados en la importancia de aspectos mencionados en los numerales 2.1.3.2 y 2.1.3.3, se realizaron diferentes ensayos que permitieran conocer: composición del lodo, capacidad buffer y adsorción de celulosas en ceniza y lodo. Para tal fin, se emplearon los métodos TAPPI (Asociación Tecnológica de la Industria de Pulpa y Papel por sus siglas en inglés), considerando que la porción orgánica del lodo presenta una composición química muy parecida a una pulpa de celulosa grado comercial. Y un tamaño de fibras inferior (Wei Wang et al., 2010), además de otros métodos identificados en la revisión bibliográfica.

4.3.1 COMPOSICIÓN DEL LODO PAPELERO

Para la composición, los métodos se describen en la Tabla 13, los cálculos se encuentran en detalle en el ANEXO B

Tabla 13. Métodos caracterización del lodo papelerero

<u>Método</u>	<u>Componente</u>	
T 203	Carbohidratos	
	Celulosa	Alfa celulosa: celulosa resistente a solución de hidróxido de sodio Beta celulosa: Celulosa parcialmente degradada
	Hemicelulosa	Gama celulosa
T 236	Lignina	
T 204	Extractivos	
	En Diclorometano	Resinas, ácidos grasos y sus ésteres, ceras y sustancias insaponificables.
	En Etanol:Benceno	Carbohidratos de bajo peso molecular, sales y otras sustancias solubles en agua que son extraídos también por DCM
T 211	Cenizas	525 °C
T 413		900 °C

A partir del contenido de celulosa y humedad del lodo, se definirán las cantidades específicas de enzima o extracto (según los niveles de % de enzima establecidos en el diseño) y de lodo requerido para los diferentes ensayos de hidrólisis enzimática, los cuales serán descritos en los siguientes numerales (4.4.1 y 4.4.2).

4.3.2 CAPACIDAD BUFFER DEL LODO

Para evaluar la capacidad buffer del lodo, de acuerdo con la propuesta de Li Kang, Wang & Lee (2010), se tituló con ácido sulfúrico 3N una mezcla de agua desionizada con 18.17% de lodo papelerero (simulando el volumen de trabajo de los ensayos de hidrólisis y fermentación y el máximo nivel de carga de lodo en los ensayos) y se registra el pH final de la muestra, con el fin de analizar su comportamiento según la adición de ácido. Paralelamente, como blanco del ensayo, se adiciona la misma concentración de ácido a un volumen de agua con el fin de comparar el comportamiento del pH.

4.3.3 ADSORCIÓN DE CELULASAS

La adsorción de celulasas se midió tanto en las cenizas como en el lodo papelerero, con enzima comercial Cellic® siguiendo el procedimiento establecido por Chen *et al.* (2014). En la prueba se evaluó el contenido de proteína libre en el medio en los diferentes ensayos por medio del método Bradford modificado (Zor &

Selinger, 1996). El ensayo consistió la adición de una cantidad específica de enzima Cellic® (315.16 µL compuesta por 70% CTec2 y 30% HTec2) a 3 erlenmeyer de 250 mL de capacidad y 100 mL de buffer citrato de sodio pH 4.0 como volumen de reacción, las tres pruebas se desarrollaron a 4°C para evitar la actividad de la enzima, manteniendo 150 rpm de agitación para permitir el contacto con los sustratos durante 15 minutos. Al primer erlenmeyer se agregó 100 mL de solución buffer como blanco de prueba, en el segundo se agregó la cantidad de cenizas correspondientes a una carga lodo de 18,17% en 100 mL de volumen de reacción con solución buffer, y en el tercero se adicionó la carga de lodo papelerero equivalente a una carga de sólidos de 18,17%. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Las cenizas empleadas en la prueba se obtuvieron por incineración de una muestra de lodo a 525 °C de acuerdo con el método Tappi T211. Todas las muestras fueron centrifugadas a 5300 rpm por 10 minutos a 4°C, con el fin de reducir las interferencias por las fracciones de arcilla suspendidas durante la cuantificación de proteínas según Lozzi *et al.* (2008). El sobrenadante fue filtrado por membrana PTFE de 0.2 µm previo al análisis de proteínas según Bradford mediante el ensayo de microplatos con el equipo iMark Microplate – Reader marca Biorad. La adsorción específica se estimó con las ecuaciones descritas en la Tabla 14.

Tabla 14. Cálculos empleados en adsorción de proteína

Tipo de adsorción específica	Descripción	Términos
Adsorción en cenizas	$Ads_{cen} = \frac{[BP]-[PC]}{[C]} \left[\frac{mg\ Prot}{g\ cen} \right]$	[BP]: Blanco proteína (mg/mL) [PC]: Proteína libre en prueba con cenizas
Adsorción en lodo	$Ads_{lod} = \frac{[BP]-[PL]}{[L]} \left[\frac{mg\ Prot}{g\ lod} \right]$	[PL]: Proteína libre en prueba con lodo [C]: Concentración de cenizas (g/100mL)
Adsorción en carbohidratos	$Ads_{cen} = \frac{[PL]-[PC]}{[CH]} \times 100 \left[\frac{\mu g\ Prot}{g\ CH} \right]$	[L]: Concentración de lodo (g/100mL) [CH]: Concentración de carbohidratos (g/100mL)

4.4 HIDRÓLISIS DEL SUSTRATO LIGNOCELULÓSICO

Para la hidrólisis del sustrato lignocelulósico con enzima comercial y extracto enzimático, se formularon dos diseños experimentales, el primero permitió describir el proceso de hidrólisis durante 72 horas de proceso con enzima comercial. El segundo diseño experimental fue planteado para el extracto enzimático, con las condiciones de interés a evaluar para el cumplimiento del objetivo general 2. El procedimiento para cada uno, se describe a continuación.

4.4.1 HIDRÓLISIS PRELIMINAR CON ENZIMA COMERCIAL

La hidrólisis enzimática del lodo papelerero, se evaluó inicialmente según un diseño experimental factorial de dos factores y tres niveles para cada uno, descrito en la Tabla 15. Todos los experimentos se hicieron por triplicado para estimar la variabilidad dentro de cada tratamiento.

Tabla 15. Diseño de experimento con enzima comercial

Diseño experimental para hidrólisis con enzima comercial - Diseño factorial 3²			
Factores		Niveles	Variables de respuesta
1.	Temperatura	37 °C	1. Concentración de azúcares reductores
		45 °C	
		55 °C	
2.	Concentración de enzima (g Enzima / g Celulosa)	3%	
		6%	
		9%	

El volumen de trabajo para cada ensayo de hidrólisis fue de 100 mL en matraces de 250 mL, como condiciones del ensayo se definió una carga de sólidos de 5% (5 gr lodo base seca / 100 mL medio) agitación de 150 rpm y acidificación previa con ácido sulfúrico concentrado hasta pH 4.0. El volumen de enzima comercial se adicionó de acuerdo a la calibración de las micropipetas empleadas respecto al peso de diferentes volúmenes de enzima (ANEXO A). El número de matraces para cada combinación del diseño se definió, garantizando que el volumen de reacción final fuera mayor al 90% del volumen inicial. Se tomaron alícuotas de 1 mL cada 12 horas hasta 72 horas de reacción. Las muestras de cada triplicado fueron centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos, condiciones de referencia del trabajo de Madrid & Quintero (2011) y se conservaron a -4 °C hasta su análisis. Los azúcares reductores (AR) se analizaron por el método DNS (Miller, 1959) con un espectrofotómetro marca Perkin Elmer modelo Lambda35 a 540 nm.

Los factores evaluados en este diseño, se definieron como resultado del análisis comparativo de las condiciones de trabajo de los experimentos desarrollados por Lynd *et al.* (2001); Wang, Kang & Lee (2010); Kang, Wang & Lee (2010); Kang *et al.* (2011); Fan *et al.* (2003); Madrid & Quintero (2011) y Lark *et al.* (1997), el cual se encuentra consolidado en el ANEXO E.

A partir de los resultados del diseño experimental para la hidrólisis con enzima comercial, se analizaron las gráficas de los valores medios de azúcares reductores (AR) para cada una de las condiciones, con el fin de identificar máximos y mínimos de AR producidos, así como posibles interacciones entre los factores Temperatura y %Enzima comercial. Posteriormente se empleó la herramienta estadística **R**®, para analizar los efectos principales e identificar aquellos factores e interacciones entre los factores significativos a través de un análisis de varianza ANOVA de dos variables, con el fin de determinar la existencia o no de

diferencias significativas entre las medias de los diferentes factores. La Figura 6 permitirá calificar la significancia de los valores P en los ANOVA.

Figura 6. Clasificación de significancia estadística en ANOVA (Stirling, 2000)

Valor de P	Clasificación de significancia
> 0.1	No hay diferencia estadística significativa
0.05 - 0.1	Diferencia significativa débil
0.01 - 0.05	Diferencia estadística significativa moderadamente fuerte
< 0.01	Diferencia estadística significativamente fuerte

4.4.1.1 Evaluación de agitación

En pro de identificar las mejores condiciones para la etapa de producción de bioetanol, se evalúa el efecto de la agitación en las temperaturas que no presentaron diferencias estadísticamente significativas (37 y 45°C) en la hidrólisis preliminar con enzima comercial. El propósito de estos ensayos, es detectar condiciones que puedan ser aprovechadas en la etapa inicial de la SSF, aspecto que se discutirá en numeral 4.5.

Para tal fin se plantea un diseño experimental de 3 factores y dos niveles, la concentración de enzima empleada fue de 6% y carga de lodo de 18,17%. El diseño se describe en la Tabla 16.

Tabla 16. Diseño experimental para evaluación agitación

Diseño experimental para evaluación de agitación Diseño factorial 2 ³			
Factores		Niveles	Variable de respuesta
1	Temperatura (°C)	37	1. Concentración de azúcares reductores
		45	
2	Agitación (rpm)	150	
		200	
3	Tiempo hidrólisis (h)	6	
		12	

Los resultados de este ensayo, fueron analizados inicialmente por el gráfico de efectos para identificar posibles interacciones y un análisis de varianza ANOVA de 3 factores para verificar si existen diferencias significativas entre los valores medios de AR producidos según los diferentes tratamientos y/o una interacción significativa entre los efectos principales.

4.4.2 HIDRÓLISIS CON EXTRACTO ENZIMÁTICO

La hidrólisis enzimática con extracto enzimático, se evaluó con un diseño experimental factorial con niveles mezclados, es decir, tres factores con tres niveles y un factor con dos niveles y una variable de respuesta (Tabla 17).

Tabla 17. Diseño de experimento con extracto enzimático

Diseño experimental para hidrólisis con extracto enzimático - Diseño factorial con niveles mezclados 3 ³ x2 ¹			
Factores		Niveles	Variable de respuesta
1.	Temperatura	37 °C	1. Concentración de azúcares reductores
		45 °C	
		55 °C	
2.	Carga de sólidos (g lodo base seca /mL medio)	5%	
		9.09%	
		18.17%	
3.	Concentración de enzima (gEnzima / gCelulosa)	3%	
		6%	
		9%	
4	Tiempo de hidrólisis (h)	6	
		12	

Con base en los resultados de composición del lodo, se determinó la cantidad de extracto en peso requeridos para los diferentes niveles establecidos en el diseño experimental. El volumen de trabajo para cada ensayo de hidrólisis fue de 100 mL en matraces de 250 mL, como condiciones del ensayo se definió una agitación de 150 rpm y acidificación previa con ácido sulfúrico concentrado hasta pH 4.0. Considerando que en el medio natural, los microorganismos celulolíticos se encuentran en poblaciones mixtas (Béguin & Aubert, 1994; Wilson, 2011), el extracto enzimático fue adicionado en estado sólido compuesto en peso por 70% de extracto de *Penicillium sp.* y 30% de *Verticillium sp.* (estas dos cepas fueron aisladas de residuos de madera por Beltran & Leguizamón (2012)). El trabajo no incluye el estudio previo independiente para cada extracto considerando la disponibilidad de recursos y tiempo disponible para el trabajo experimental. El número de matraces para cada combinación del diseño se definió, garantizando que el volumen de reacción final fuera mayor al 90% del volumen inicial. Se tomaron muestras de 2 mL a partir del tiempo 0 6 y 12 horas de reacción. Las alícuotas de cada triplicado fueron centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos, según Madrid & Quintero (2011) y se conservaron a -4 °C, los azúcares reductores se analizaron por el método DNS (Miller, 1959) con un espectrofotómetro marca Perkin Elmer modelo Lambda35 a 540 nm.

La agitación, temperaturas, cargas de sólidos y concentración de enzimas empleadas, se definieron como resultado del análisis comparativo de las condiciones de trabajo de los experimentos desarrollados por Lynd *et al.* (2001); Wang, Kang & Lee (2010); Kang, Wang & Lee (2010); Kang *et al.* (2011); Fan *et al.* (2003); Madrid & Quintero (2011) y Lark *et al.* (1997), el cual se encuentra consolidado en el ANEXO E.

A partir de los resultados del diseño experimental para el extracto enzimático, se identificaron máximos y mínimos producidos, así como posibles interacciones entre los factores Temperatura, Carga de sólidos y cantidad de Extracto enzimático a través de gráficas de los efectos principales en los valores medios de AR,. En el análisis estadístico, se empleó la herramienta estadística **R**®. Se analizaron los efectos principales e identificar una posible interacción entre estas variables independientes a través de un análisis de varianza ANOVA de tres variables, con el fin de determinar la existencia o no de diferencias significativas entre las medias de los diferentes factores.

4.5 PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LODO PAPELERO

La obtención de etanol a partir de este sustrato lignocelulósico se planteó por medio de dos ensayos de hidrólisis y fermentación simultánea (SSF), uno con enzima comercial Cellic® y otro con extracto enzimático. Dicho ensayo se desarrolló teniendo como referencia los Protocolos Experimentales para SSF (Dowe & Mcmillan, 2008), así como los estudios de referencia mencionados en el numeral 4.4.1. En este sentido, el ensayo contó con un sistema de mangueras para la toma de muestras de cada erlemeyer de proceso, así como mangueras que permitieran evacuar el CO₂ producto de la actividad de la levadura y adicionalmente una trampa de agua para evitar el ingreso de oxígeno al sistema controlando así el crecimiento de la levadura en el proceso (Figura 7).

Figura 7. Montaje ensayo de SSF



Como medio para la fermentación se empleó el medio YP y fosfato diamónico como fuente de nitrógeno para la levadura, su composición se describe en el ANEXO A. Para la fermentación se empleó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial marca Fermipan®, con la cual se inoculó 21,5 mg por cada 100 mL de ensayo, ésta fue activada en agua estéril con glucosa al 5% a 37°C y dando un tiempo de activación de 20 minutos previo a la adición del inóculo. La cantidad de inóculo se definió de acuerdo con Prasetyo *et al.* (2011).

El número de matraces para cada combinación del diseño se definió, garantizando que el volumen de reacción final fuera mayor al 90% del volumen inicial. Se tomaron alícuotas de 2 mL cada 24 horas para el análisis de azúcares reductores y 2 mL para el análisis etanol a partir del tercer día del proceso con la misma frecuencia, estas últimas muestras, fueron centrifugadas a 6.500 rpm por 15 min a 4°C y posteriormente fueron filtradas por membrana de 0.2 µm. Como manejo previo de las muestras, fueron congeladas y selladas con cinta aislante hasta el análisis de las mismas en un término máximo de 5 días. La cuantificación de etanol se hizo por cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo marca Perkin Elmer modelo Clarus580, con una columna Carbowax (30 m, 0,32 mm y 0,25 µm), detector de ionización de llama (FID) a 250°C, temperatura del inyector 150°C condiciones de gradiente de temperatura iniciando a 85°C y luego se elevó a una velocidad de 45°C/min hasta 120°C se sostuvo durante 6 min. Se inyectaron 5 µL de cada muestra. Se construyó una curva patrón con Etanol Absoluto (99,9%) en un rango de concentraciones de 0,5 a 6% (v/v) de etanol y un coeficiente de correlación de 0.9853. La curva patrón se presenta en el ANEXO A.

De acuerdo a los resultados que se destacaron en los ensayos preliminares de hidrólisis con enzima comercial y extracto enzimático, se definen las condiciones de la SSF (Tabla 18). La agitación y temperatura en las primeras 12 horas, favorecerá la producción de azúcares, de forma que, en el momento de inocular la levadura, existirá una concentración de azúcares que permitirá a la levadura iniciar su consumo para transformación en etanol. Así mismo, la disminución de estas dos variables en el momento de inoculación, permitirá mantener las condiciones previamente estudiadas en la hidrólisis, así como favorecer las condiciones para la fermentación con la levadura, dadas las desventajas señaladas en el marco teórico (Tabla 9).

Tabla 18. Condiciones generales SSF

	Condiciones ensayo SSF	Valor
Condiciones generales SSF	Carga de lodo Carga de sólidos (g lodo b.s. /mL medio)	18.17%
	% Enzima o extracto	6%
	Tiempo total de proceso	9 días
Etapa inicial hidrólisis	Tiempo	12 h
	Temperatura	45 °C
	Agitación	200 rpm
Etapa fermentación	Inoculación	hora 12
	Temperatura	37 °C
	Agitación	150 rpm

Para la producción de azúcares reductores en el proceso de SSF, se monitoreó paralelamente una hidrólisis enzimática con la enzima comercial Cellic® y otra con el extracto. Las muestras fueron sometidas a los mismos cambios que las SSF. Las alícuotas para análisis de azúcares reductores se tomaron simultáneamente con las del proceso de fermentación. Por último, se midió el pH en los ensayos en el último día del proceso.

4.5.1 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE EFICIENCIA DEL PROCESO

Como parámetros del bioproceso, se determinaron el porcentaje de digestibilidad del lodo (%D), también conocido como % de conversión para el proceso de hidrólisis enzimática, rendimiento de etanol con respecto al máximo teórico ($\gamma_{e/hex}$), rendimiento de etanol aparente ($\gamma_{apar.}$) para las fermentaciones, y productividad observada ($\Gamma_{observada}$), tanto para los procesos de hidrólisis como para los de SSF. Los parámetros cinéticos del bioproceso, se calcularon de acuerdo con las ecuaciones presentadas en la Tabla 19.

Tabla 19. Parámetros de eficiencia

Parámetros de eficiencia del proceso			Referencia
Ecuación 1	% Digestibilidad del lodo		Dowe <i>et al.</i> (2008)
	$\%Digestibilidad = \frac{[AR] \times V}{1.111 \times L \times \%Glu} \times 100$	Donde: [AR]: Concentración de azúcares reductores producidos (g/L) L: peso lodo base seca (g) V: volumen hidrolizado (L) %Glu: concentración de glucano 1.111: Coeficiente de hidrólisis del glucano	
Ecuación 2	Rendimiento de etanol con respecto al teórico basado en la concentración inicial de hexosas		Prasetyo <i>et al.</i> (2011)
	$\gamma_{e/hex} = \frac{\Delta Ce}{Ce/hex} \times 100 ;$ $\Delta Ce/hex = (\%glu \times C_{lodo} \times 1.11 \times 0.51)$	Donde: %gluc: porcentaje glucano (g celulosa / g lodo base seca) C_{lodo}: Concentración de lodo (g/L) 1.11: Coeficiente de hidrólisis del glucano 0.51: Coeficiente de fermentación de hexosas a etanol. Ce/hex: Concentración teórica de hexosas convertidas a etanol ΔCe: concentración de etanol producido	
Ecuación 3	Rendimiento aparente		Adaptación de Doran (1995) y Dowe <i>et al.</i> (2008)
	$\gamma_{apar.} = \frac{P}{S} \times 100$ $\left[\frac{g \text{ etanol}}{g \text{ glucano}} \right]$ $S = P * 1.76$ $\left[\frac{g \text{ glucano}}{g \text{ glucano}} \right]$	Donde: P: concentración del producto presente (g/L) S: Concentración del sustrato consumido para producir el producto presente (g/L) 1.76: coeficiente de conversión de la cantidad de glucano a partir de la que se produjo el etanol. $1.76 = \frac{1 \text{ mol ROH}}{46gROH} \times \frac{1 \text{ mol glucosa}}{2molROH}$ $\times \frac{180g \text{ glucosa}}{1mol \text{ glucosa}} \times \frac{1g \text{ glucano}}{1.111glucosa}$	
Ecuación 4	Productividad o tasa de producción		Doran (1995)
	$\Gamma_{observada} = \frac{\partial P}{\partial t} = \frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1}$	Donde: δP: diferencia de concentración de producto entre tiempo 1 y 2 δt: diferencia de tiempos evaluados	

4.5.2 DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD TÉCNICA DEL EXTRACTO

Para determinar la viabilidad técnica del extracto enzimático se desarrollaron dos análisis específicos:

- Determinación de costos asociados a la producción del extracto y comparación con el costo de la enzima comercial.
- Diseño de una matriz de priorización para toma de decisiones como herramienta para determinar la viabilidad.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción de bioetanol con el extracto enzimático producido a partir de dos hongos filamentosos, se desarrolló enmarcado en 5 etapas:

1. Producción del extracto enzimático y selección de enzima comercial: basado en la obtención del inóculo, cuantificación e identificación de las posibles celulasas presentes en el extracto y determinación de actividades enzimáticas para el extracto y la enzima comercial.
2. Caracterización del lodo paplero, a partir de la cual se definen las condiciones de los ensayos planteados en hidrólisis enzimática y SSF.
3. Hidrólisis enzimática: se definieron las condiciones más favorables para la hidrólisis con enzima comercial y el extracto enzimático.
4. Producción de bioetanol con el lodo paplero mediante SSF usando el extracto enzimático y la enzima comercial.
5. Determinación de parámetros de eficiencia y cinéticos de los procesos de hidrólisis enzimática e hidrólisis y fermentación simultánea y finalmente, análisis de los costos asociados a las enzimas.

Dichas etapas se describen a continuación.

5.1 PRODUCCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

A continuación, se describen los resultados de la obtención del extracto enzimático.

5.1.1 OBTENCIÓN DEL INÓCULO DE HONGOS FILAMENTOSOS

Las cepas *Verticillium sp.* y *Penicillium sp.* seleccionadas, fueron activadas inicialmente en medio PDA, posteriormente se hicieron pases en Carboximetilcelulosa (CMC) 1% a 25°C durante 20 días. El crecimiento radial se registró diariamente de forma paralela en medio PDA y CMC a la misma temperatura, estos datos fueron procesados con la herramienta DMFit®.

La Figura 8 y Figura 9 describen el crecimiento de la cepa *Verticillium sp.* en CMC 1% y PDA a 25°C con sus respectivos modelos de ajuste.

Figura 8. Crecimiento radial de *Verticillium sp.* en CMC 1% a 25°C

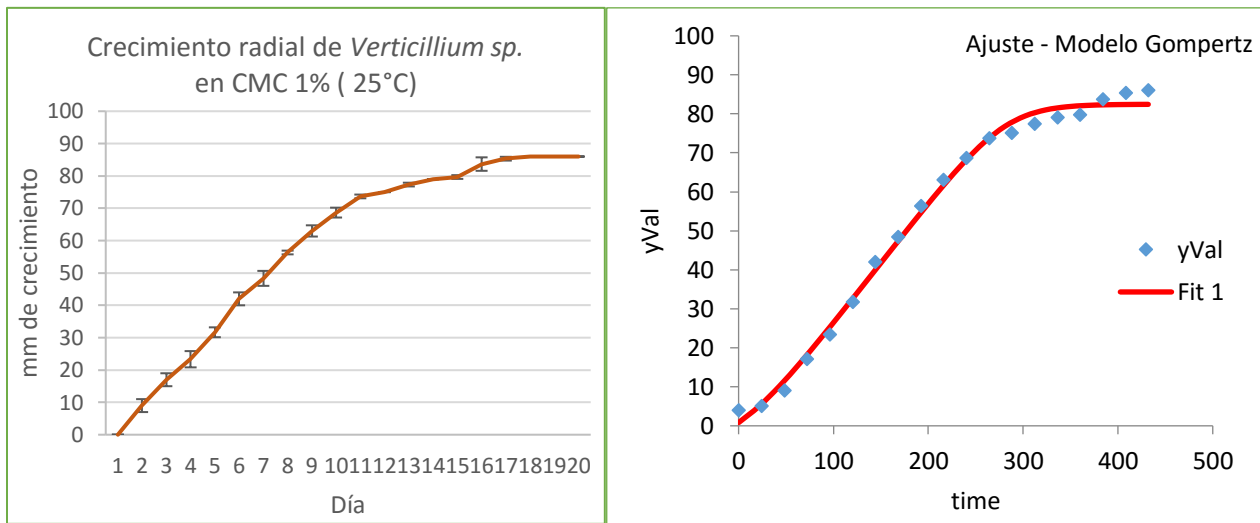
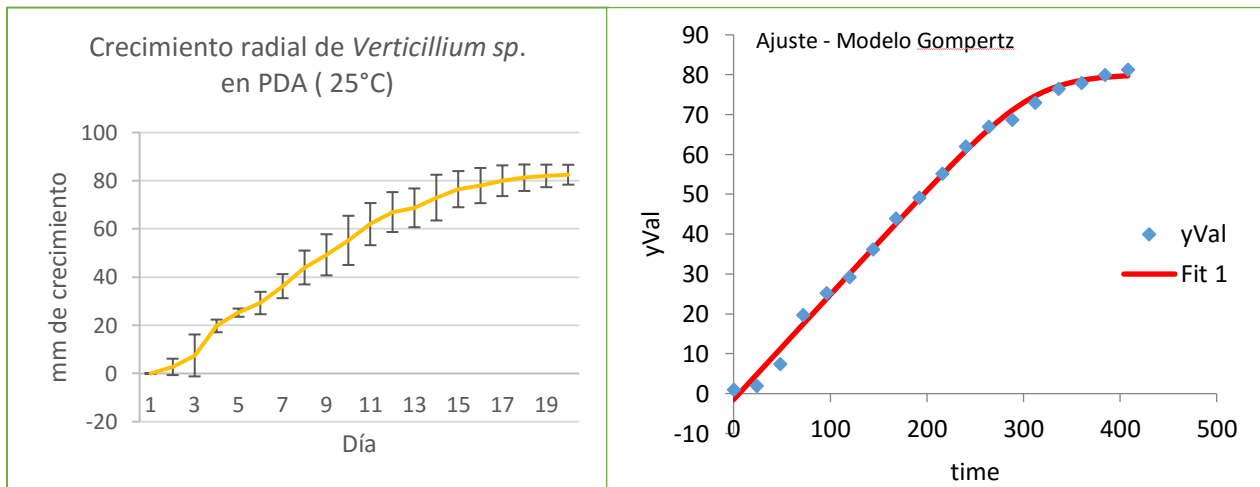


Figura 9. Crecimiento radial de *Verticillium sp.* en PDA a 25°C



En las figuras anteriores se observa que la cepa *Verticillium sp.* presenta menor variación en el crecimiento radial cuando su fuente de carbono es CMC, de acuerdo con las barras de error de las gráficas. Así mismo, el tiempo de crecimiento de esta cepa a 25°C coincide con el reportado por Novo *et al.* (2006), quien describe un crecimiento radial de 55 mm en 20 días en igual temperatura.

Las Figura 10 y Figura 11, describen el crecimiento radial de la cepa *Penicillium* en CMC 1% y PDA respectivamente, cada una junto al correspondiente ajuste de modelo de crecimiento microbiano. En el crecimiento de esta cepa, se presenta mayor desviación estándar en su crecimiento radial, lo cual se atribuye a una mayor esporulación observada.

Figura 10. Crecimiento radial de *Penicillium sp.* en CMC 1% a 25°C

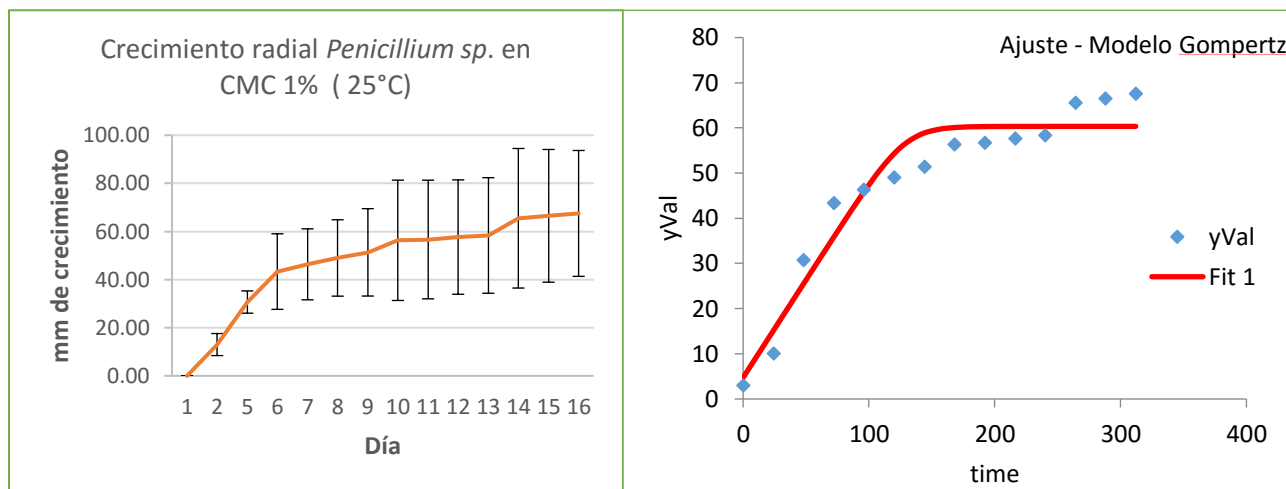
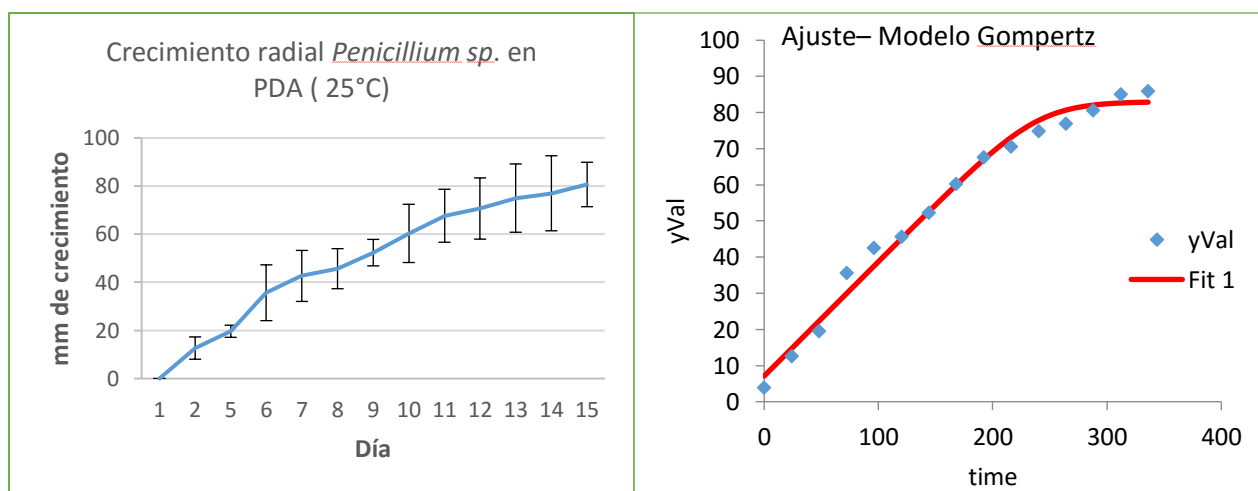


Figura 11. Crecimiento radial de *Penicillium sp.* en PDA a 25°C



La Tabla 20 resume las tasas de crecimiento y los coeficientes de correlación obtenidos en cada modelo de ajuste.

Tabla 20. Tasa de crecimiento de las cepas en CMC 1% y PDA

	<i>Verticillium sp.</i>		<i>Penicillium sp.</i>	
	CMC 25°C	PDA 25°C	PCMC 25°C	PPDA25
μ (h ⁻¹)	0.31091965	0.26304844	0.43222381	0.3167098
R ²	0.99350978	0.99565197	0.91946741	0.98536228

De acuerdo con la tabla anterior, la tasa de crecimiento de *Verticillium sp.* y *Penicillium sp.* en CMC 1%, es superior que en PDA, a su vez, la tasa de crecimiento de *Penicillium sp.* es 28% superior que la de *Verticillium sp.* en CMC 1%.

5.1.2 CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN EXTRACTOS

Durante el proceso de producción de los extractos enzimáticos con papel filtro como sustrato, de acuerdo al procedimiento descrito en Figura 5, se hizo seguimiento al peso final del extracto producido; la cepa *Verticillium sp.*, produjo 19.3% más extracto que *Penicillium sp.*, ya que en promedio se obtuvo 6.75 (± 2.78) mg de extracto / g de papel y 5.45 (± 1.39) mg de extracto / g de papel respectivamente para cada cepa.

Se midió el contenido de proteína en los extractos concentrados por ultrafiltración, liofilizados. Los extractos concentrados por ultrafiltración a partir de *Verticillium sp.* (CV) y *Penicillium sp.* (CP) presentaron un contenido de proteína de 3.15 (± 1.76) y 2.87 (± 1.6) mg/mL de extracto concentrado respectivamente, así mismo, 0.15 (± 0.04) y 0.22 (± 0.16) mg de proteína / mg de extracto liofilizado. Los resultados de estos análisis se encuentran consignados en el ANEXO C.

El contenido de proteína en el extracto concentrado por ultrafiltración de *Verticillium sp.*, difiere del presentado por Pulido (2013) para la misma cepa, pues corresponde al 23% del reportado por este autor (14.35 mg/mL). En la revisión bibliográfica efectuada, no se encuentra información adicional de concentraciones de proteína de extractos concentrados por ultrafiltración, producidos en condiciones similares.

Con respecto a la concentración de proteína en extractos de *Penicillium sp.*, el resultado, equivale al 15% del valor estimado por Pulido (2013), mientras que Bhat, McCrae & Wood (1989) reportan igual concentración de proteína en un extracto enzimático de *P. pinophilum* concentrado por ultrafiltración (2.9 mg/mL). No se encontró información adicional referente a concentraciones de celulasas a partir de fermentaciones en sólido. Sin embargo, la Tabla 21 resume algunos estudios de producción de celulasas a partir de diferentes hongos del género *Penicillium*, para fermentaciones en medio líquido y diferentes tipos de celulosa como fuentes de carbono. Es importante resaltar que la concentración de proteína en el extracto de *Penicillium sp.* en el presente estudio, es superior a los descritos en esta tabla. Esta condición se debe a que el contenido de proteína determinado en el extracto se hizo una vez se concentró por ultrafiltración.

Tabla 21. Contenido de proteína en cultivos sumergidos de diferentes especies de *Penicillium*

Hongo	Fuentes de carbono	Tiempo fermentación (días)	Proteína (mg/mL)	Autores
<i>P. pinophilum</i>	Madera abedul	9	0.45 - 1.07	Jørgensen <i>et al.</i> (2005)
	Solka-Floc			
<i>P. brasillianum</i>	Sigmacell	7	0.42 - 0.5	Jørgensen & Olsson (2006)
	Madera píceca			
<i>P. brasillianum</i>	Solka-Floc	9	0.01 - 0.78	Krogh <i>et al.</i> (2004)
<i>P. pulvillorum</i>	Paja de trigo pre tratada	5	0.2 - 0.82	Marjamaa <i>et al.</i> (2013)
<i>P. simplicissimum</i>	Avicel			
<i>P. decumbens</i>	Salvado de trigo	4	0.36 - 0.51	Sun <i>et al.</i> (2008)
<i>P. echinulatum</i>	Avicel	8	0.149 ^a	Martins <i>et al.</i> (2008)

^aEn extracto precipitado con etanol

- **Identificación de proteínas:**

En cuanto a la identificación de proteínas realizada por la técnica de electroforesis, la Figura 12 presenta el gel SDS-Page para el extracto *Verticillium sp.*, en el cual se identificaron 3 bandas de mediana intensidad referidas como A, B y C, y 4 bandas de alta intensidad referidas como D, E, F y G. De acuerdo con el perfil electroforético calculado en el numeral d del ANEXO A, las 7 proteínas identificadas presentan pesos moleculares en el rango 12,56 (± 1.5) - 102,27 (± 2.3) kDa, cuyos valores corresponden al promedio de las tres réplicas hechas en el gel. Los cálculos de los pesos moleculares se muestran en la Tabla 22.

Figura 12. Gel SDS-Page extractos *Verticillium sp.*

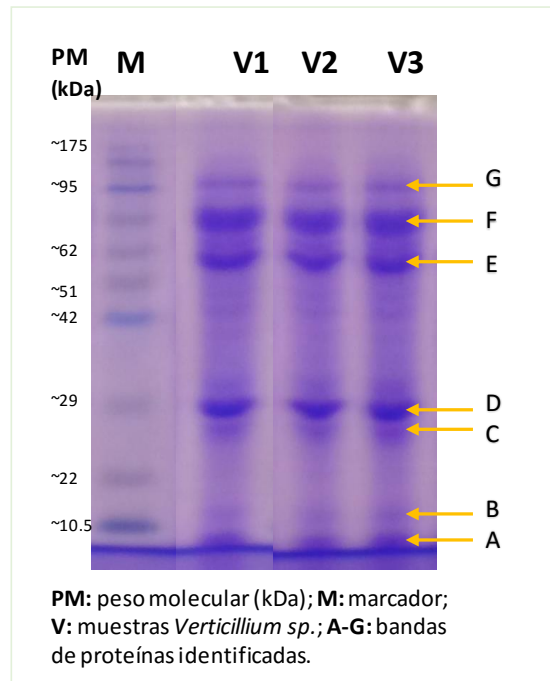


Tabla 22. Estimación de pesos moleculares del extracto *Verticillium sp.* en gel SDS-Page

DISTANCIA RECORRIDA Muestras (cm)			y=LOG(PM Muestras)			PM Muestras (kDa)			Promedio PM	SD (±)	#
Muestras <i>Verticillium sp.</i>			Muestras <i>Verticillium sp.</i>			Muestras <i>Verticillium sp.</i>					
1	2	3	1	2	3	1	2	3			
V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3			
1.332	0.932	0.958	1.156	1.064	1.070	14.32	11.60	11.76	12.56	1.5	A
2.29	1.235	1.221	1.375	1.134	1.131	23.71	13.61	13.51	16.94	5.9	B
2.553	2.234	2.248	1.435	1.362	1.365	27.24	23.03	23.20	24.49	2.4	C
2.859	2.512	2.484	1.505	1.426	1.419	32.00	26.66	26.27	28.31	3.2	D
4.288	4.26	4.219	1.832	1.826	1.816	67.91	66.92	65.49	66.78	1.2	E
4.732	4.676	4.621	1.934	1.921	1.908	85.80	83.31	80.93	83.35	2.4	F
5.107	5.065	5.023	2.019	2.010	2.000	104.54	102.25	100.01	102.27	2.3	G

Los resultados de la Tabla 22, son comparables con lo reportado por Mandelc & Javornik (2015) (ver Tabla 8) quienes hacen una identificación de las proteínas producidas por las cepas *Verticillium albo-atrum* VaMs. 102 y *Verticillium dahliae* VdLs.17. Con base en esta información, no se contó con células de referencia en cepas *Verticillium* con pesos moleculares cercanos a las bandas de mediana intensidad A (12.56 kDa) y B (16.94 kDa), no obstante, de acuerdo con lo enunciado por Bisaria & Ghose (1981) podrían ser EG. Según los resultados de Huang & Mahoney (1999), la banda de mediana intensidad C (24.49 kDa) podría asociarse a una enzima pectato liasa o xilanasas, teniendo en cuenta que la literatura disponible de

esta cepa destaca la producción de otras proteínas como las xilanasas (PM < 30 kDa) (Bahkali, 1995; Jørgensen, Eriksson, et al., 2003; Wilson, 2011), las cuales crecen excepcionalmente cuando su fuente de carbono es celulosa (Bahkali, 1996). La banda de alta intensidad *D* (28.31 kDa), pueden corresponder a EG acorde con las identificadas por Mandelc & Javornik (2015) de 25.32 kDa (EG I) y 30.37 kDa (EG V). Así mismo, considerando la proteína identificada por los mismos autores con peso molecular de 66.8 kDa, es posible que la banda de alta intensidad *E* (66.78 kDa) sea una β G. Por último, de acuerdo con la EG reportada por Mandelc & Javornik (2015) de 91.37 kDa, las bandas *F* (83.35 kDa) y *G* (102.27 kDa) podrían identificarse como tal, sin embargo, dado lo enunciado por Meyer & Canevascini (1981), así como Wood, T.M. (1975), dado su alto peso molecular, estas bandas podrían ser β G.

De acuerdo con la Figura 13, para el extracto de *Penicillium sp.* se identificaron 5 bandas de alta intensidad (*H, J, K, N* y *P*) y dos de mediana intensidad (*I, L, M, O* y *Q*) en el gel SDS-Page, las cuales corresponden a proteínas con pesos moleculares entre 11,62 y 107,6 kDa, según la Tabla 23.

Figura 13. Gel SDS-Page extractos *Penicillium sp.*

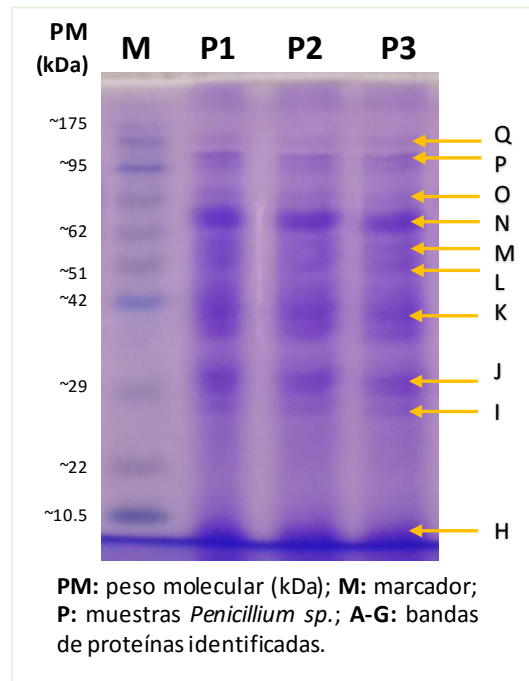


Tabla 23. Estimación pesos de del extracto *Penicillium sp.* en gel SDS-Page

DISTANCIA RECORRIDA Muestras (cm)			y=LOG PM Muestras (kDa)			PM Muestras (kDa)			Promedio PM	SD	#
Muestras <i>Penicillium sp.</i>			Muestras <i>Penicillium sp.</i>			Muestras <i>Penicillium sp.</i>					
1	2	3	1	2	3	1	2	3			
P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3			
0.974	0.928	0.902	1.074	1.064	1.058	11.86	11.58	11.42	11.62	0.2	H
2.401	2.359	2.345	1.400	1.391	1.388	25.14	24.59	24.41	24.72	0.4	I
2.706	2.65	2.651	1.470	1.457	1.458	29.52	28.67	28.68	28.96	0.5	J
3.441	3.428	3.372	1.638	1.635	1.622	43.48	43.18	41.93	42.86	0.8	K
3.969	3.983	3.941	1.759	1.762	1.753	57.41	57.84	56.57	57.27	0.6	L
4.232	4.219	4.177	1.819	1.816	1.807	65.94	65.49	64.06	65.16	1.0	M
4.538	4.468	4.454	1.889	1.873	1.870	77.47	74.67	74.12	75.4	1.8	N
4.76	4.732	4.69	1.940	1.934	1.924	87.08	85.80	83.93	85.6	1.6	O
5.162	5.176	5.148	2.032	2.035	2.029	107.61	108.41	106.82	107.6	0.8	P
5.384	5.329	5.329	2.083	2.070	2.070	120.95	117.50	117.50	118.6	2.0	Q

Los resultados presentados en la Tabla 23, son comparables con la información consignada en la Tabla 8 respecto a las diferentes celulasas producidas por diferentes especies de *Penicillium*, por lo cual, las bandas *H*, *I* y *J* (11 a 29 kDa) se identifican como posibles EG, considerando que autores como Bhat, McCrae & Wood (1989), Jørgensen *et al.* (2003), Picart *et al.* (2007), Sun *et al.* (2008), Morozova *et al.* (2010), Lima *et al.* (2013) y Tishkov *et al.* (2013) reportaron EG en este mismo rango. Las bandas *K*, *L* y *M* (42 a 65 kDa) se identifican como posibles ExG, con base en las reportadas por los autores Wood, McCrae & Macfarlane (1980), Jørgensen *et al.* (2003), Picart *et al.* (2007), Tao *et al.* (2009), Morozova *et al.* (2010), Gao *et al.* (2011) y Liao *et al.* (2015).

Con respecto a las bandas *N* y *O* (75 a 86 kDa), se consideran posibles EG, según Tao *et al.* (2009), Zampieri *et al.* (2013) y Volkov *et al.* (2014). Por último, las bandas *P* y *Q* (107 y 118) se identifican como posibles β G, por su alto peso molecular conforme a lo enunciado por lo cual es sustentado también por su alto peso molecular, conforme a lo enunciado por Meyer & Canevascini (1981) y Wood, T.M. (1975) y las reportadas por Bai *et al.* (2013) (Bai *et al.*, 2013; Bhiri *et al.*, 2008; M. Chen *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2013; Joo *et al.*, 2010; 2013; Ramani *et al.*, 2012; Zampieri *et al.*, 2013).

Si bien existen reportes de hongos filamentosos que producen otro tipo de proteínas como cutinasas e hidrofobinas, y sus pesos moleculares están en el rango descrito en las proteínas identificadas para *Verticillium sp.* y *Penicillium sp.*, no es posible afirmar que las proteínas descritas sean alguna de las mencionadas. De acuerdo a la revisión del estado del arte, no se encontró información disponible respecto

a la producción de cutinasas e hidrofobinas a partir de papel filtro como sustrato. Los estudios identificados, producen estas proteínas a partir de material lignocelulósico con polímeros lipídicos de la pared celular para el caso de las cutinasas, y fuentes de carbono simples como glucosa, lactosa o lignocelulósicos como tabaco, para el caso de las hidrofobinas (Castro, Peña, & Farrés, 2010; Chaudhari & Singhal, 2015; Gomes *et al.*, 2013; Mendez, 2015). Más allá de la posible identificación, sería necesario realizar pruebas de actividad enzimática para este tipo de proteínas con el fin de identificar presencia o ausencia de estas.

5.1.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Para los extractos de *Verticillium sp.* y *Penicillium sp.*, se determinó la actividad total y CMC_{Case} (EG). Los detalles de los ensayos se consolidan en el ANEXO C numeral c.

Se obtuvo una actividad total de 0.054 (± 0.022) FPU/mL para el extracto de *Verticillium sp.*, equivalente a una actividad específica de 0.54 (± 0.2) FPU/g extracto. Para el extracto *Penicillium sp.* la actividad total determinada fue de 0.131 (± 0.022) FPU/mL (2.4 veces superior a la identificada en el extracto de *Verticillium*).

La Tabla 24 resume las diferentes actividades identificadas en celulasas producidas a partir de cepas de las especies *Verticillium* y *Penicillium*. Fueron escasos los estudios encontrados sobre actividad celulolítica en especies *Verticillium*. La mayoría de estudios se centran principalmente en su actividad como patógeno de diferentes plantas, siendo principal la producción de enzimas que degradan pectina, hemicelulosa e incluso lignina (Bahkali, 1995, 1996; J. Chu et al., 2015; Cooper & Wood, 1975; Cooper, 1978; Huang & Mahoney, 1999; Mandelc & Javornik, 2015; Moreno & Vélez, 2010; Saksirirat & Hoppe, 1991; Vázquez, Sellek, & Fernández, 1992; Young & Pegg, 1982).

Tabla 24. Actividades FPA de diferentes extractos enzimáticos

Hongo	Fuentes de carbono	[Sustrato] (g/L)	Tipo de cultivo		Tiempo fermentación (días)	Actividad		Autores
			Sol	Sum		volumétrica (FPU/mL)	Específica (FPU/g Proteína)	
<i>Verticillium sp.</i>	Papel filtro	5	x		8	123.75	N.R.	Pulido (2013)
<i>V. Dahliae</i>	Cellulosa cristalina	50		x	7	N.R.	0.11*	Novo <i>et al.</i> (2006)
<i>Penicillium sp.</i>	Papel filtro	5	x		8	637.7	N.R.	Pulido (2013)
<i>P. pinophilum</i>	Solka-floc	40		x	8	0.28 - 0.8	N.R.	Jørgensen <i>et al.</i> (2005)
<i>P. brasillianum</i>	Paja de trigo	20 ^a		x	7	0.59 2.88 ^b	N.R.	Jørgensen & Olsson (2006)
	Sigmacell	20		x	7	0.36 2.24 ^b	N.R.	
<i>P. oxalicum</i>	Cascarilla de arroz	N.R.		x	N.R.	1.4	N.R.	Liao <i>et al.</i> (2015)
<i>P. brasillianum</i>	Solka-floc	20		x	9	0.02-0.68	0.77	Krogh <i>et al.</i> (2004)
<i>P. echinulatum</i>	Celulosa microcristalina	10		x	8	0.27 ^c	N.R.	Martins <i>et al.</i> (2008)
<i>P. puvillorum</i>	Salvado de trigo	20		x	6	0.62 0.74	N.R.	Marjamaa <i>et al.</i> (2013)
<i>P. simplicissimum</i>	Avicel	13		x	6	0.9	N.R.	
<i>Penicillium sp.</i>	N.R. ^d	N.R.	-	-	-	170*	350	Castellanos <i>et al.</i> (1995a)
<i>P. decumbens</i>	Glucosa	20		x	4	0.04 - 0.11	2.8-4.8	Sun <i>et al.</i> (2008)
	Salvado de trigo	20		x	4	0.83 - 1.96	2.0 - 6.64	

Sol: Cultivo en medio sólido
Sum: Cultivo sumergido
* FPU/g extracto liofilizado
N.R. Valores no reportados
a gramos de celulosa / Litro
b extracto concentrado por ultrafiltración
c Extracto precipitado en etanol
d. Preparaciones suministradas por laboratorios

Según la tabla anterior, los reportes de actividad de la cepa *Verticillium sp.* estimados por Pulido (2013) concuerdan en cuanto a presentar menor actividad que el extracto de *Penicillium sp.* (19.4% de esta cepa), sin embargo, a pesar de realizar la producción del extracto y los ensayos de actividad bajo las mismas condiciones, no coinciden con los resultados del presente estudio, correspondiendo a 0.04% de la actividad descrita por este autor. Por otra parte, la actividad específica es 80% superior a la descrita por Novo *et al.*

(2006). Posiblemente la diferencia se deba a algunas causas: el tipo de fermentación, menor complejidad del sustrato (celulosa cristalina) y/o inhibición de producción de celulasas por la concentración del sustrato.

De igual forma, a partir de la Tabla 24 se identificaron actividades volumétricas cercanas e inferiores a la determinada para *Penicillium sp.*, como en el caso en el que se utilizó glucosa como sustrato. Posiblemente se debe a que este sustrato no es buen inductor para la producción de celulasas.

Además, se encuentran actividades superiores a la determinada en este estudio a partir de cultivos sumergidos y con fuentes de carbono de diferente complejidad, por tal razón, se considera que el tipo de fermentación puede ser un factor que influya en la actividad de las celulasas. Es posible que las actividades específicas sean superiores por esta misma razón.

Por otra parte, se obtuvo una actividad CMC_{Case} 0.120 (± 0.0007) U/mL equivalente a 1.2 (± 0.006) U/g extracto para *Verticillium sp* y una actividad de 0.133 (± 0.012) U/mL para *Penicillium sp.*, expresado como actividad específica de 1.33 U/g de extracto. La Tabla 25 describe la actividad EG estimada en diferentes extractos producidos a partir de cepas de las especies *Verticillium* y *Penicillium*.

Tabla 25. Actividades CMC_{Case} en diferentes extractos enzimáticos

Hongo	Fuentes de carbono	[Sustrato] (g/L)	Tipo de cultivo		Tiempo fermentación (días)	Actividad CMC _{Case}		Autores
			Sol	Sum		Volumétrica (U/mL)	Específica (U/g Proteína)	
<i>Verticillium sp.</i>	Papel filtro	5	x		8	182.8	N.R	Pulido 2013
<i>V. Dahliae</i>	Cellulosa cristalina	50		x	7	0.087	N.R	Novo <i>et al.</i> 2006
<i>V. tricorpus</i>	Xilano	10		x	4	N.R	2	Bahkali 1996
<i>Penicillium sp.</i>	Papel filtro	5	x		8	218.61	N.R	Pulido 2013
<i>P. pinophilum</i>	Solka-floc	40		x	8	0.5	N.R	Jørgensen <i>et al.</i> 2005
<i>P. brasillianum</i>	Paja de trigo	20 ^a		x	7	14	N.R	Jørgensen & Olsson 2006
	Sigmacell	20		x	7	18	N.R	
<i>P. oxalicum</i>	Cascarilla de arroz	N.R		x	N.R	2	N.R	Liao <i>et al.</i> 2015
<i>P. brasillianum</i>	Solka-floc	20		x	9	98	N.R	Krogh <i>et al.</i> 2004
<i>P. echinulatum</i>	Celulosa microcristalina	10		x	8	1.53	N.R	Martins <i>et al.</i> 2008
<i>P. puvillorum</i> <i>P. simplicissimum</i>	Salvado de trigo	20		x	6	2.32 - 2.5	400 - 600 ^b	Marjamaa <i>et al.</i> 2013
	Avicel	13		x	6	10.23 - 11.67		
<i>Penicillium sp.</i>	N.R. ^d	N.R.	-	-	-	1050 ^c	2140	Castellanos <i>et al.</i> 1995 comparative

<i>P. decumbens</i>	Glucosa	20		x	4	0.14 - 1.91	1.17 - 12.6	Sun <i>et al.</i> 2008
	Salvado de trigo	20		x	4	5.4 - 10.6	15 - 20.78	
<i>Penicillium sp.</i>	CMC	10		x	28	5.05	N.R.	Picart <i>et al.</i> 2007
	Cascarilla de arroz	10		x	28	5.45	N.R.	
<p>Sol: Cultivo en medio sólido Sum: Cultivo sumergido. * FPU/g extracto liofilizado N.R. Valores no reportados a gramos de celulosa / Litro b U/ g de proteína parcialmente purificada c U/ g de preparación de celulasas</p>								

Según la Tabla 25, la actividad para la cepa *Verticillium sp.*, corresponde al 90% de la actividad de *Penicillium sp.* Estos resultados también se diferencian de los reportados por Pulido (2013) para las mismas cepas, a pesar de haber sido producidos bajo las mismas condiciones. La actividad de *Verticillium sp.* es 1,500 veces superior al del presente trabajo. Por otra parte, Novo *et al.* (2006) describe una actividad inferior, posiblemente por lo que es en cultivo sumergido. En el caso de Bahkali (1996), la actividad es 40% menor a la estimada en este estudio, se considera que la diferencia sea porque el sustrato (xilano) no induce eficientemente la producción de las celulasas.

Para los resultados del extracto de *Penicillium sp.*, se observó que la actividad estimada para la misma cepa por Pulido (2013), producido bajo las mismas condiciones, es 2,600 veces superior. La diferencia con respecto a las demás actividades descritas en la Tabla 25 puede ser debida al tipo de fermentación en el que se producen.

5.2 ENZIMA COMERCIAL

5.2.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las enzimas comerciales CTec2 y HTec2 mostraron respectivamente concentraciones de 299.7 (± 46.44) y 184.5 (± 21.31) mg/mL.

La concentración de proteína en los complejos enzimáticos de Cellic® (CTec2 y HTec2), resultaron 1.9 y 4.6 veces superiores a los reportados por Chen, Han *et al.* (2014), ya que según estos autores, la concentración de estos productos es 160 mg/mL para CTec2 y 40 mg/mL HTec2. Los resultados coinciden con rango de valores obtenidos en diversos estudios para más de 10 celulasas comerciales de diferentes

fabricantes, las cuales oscilan entre 115 a 490 mg/mL (Castellanos, Sinitsyn, & Vlasenko, 1995b; Nieves *et al.*, 1998).

Se determinó la actividad total para la enzima CTec2 y para el complejo CTec2:HTec2 (70:30), formulación empleada en los ensayos de hidrólisis. Los detalles de estas pruebas se consolidan en el ANEXO C numerales b y d. La actividad total de CTec2 fué 7.35 FPU/mL y 3.69 FPU/mL para el complejo CTec2:HTec2. La actividad reportada por Hui Chen, Han *et al.* (2014), dista considerablemente pues es 18.4 veces mayor (136 FPU), aún cuando este autor refiere el mismo método de ensayo.

5.3 CARACTERIZACIÓN DEL LODO PAPELERO

El lodo empleado en el presente estudio, proviene de un proceso de producción de papeles suaves (paper tissue) que emplea aproximadamente 85% de materia prima reciclada y solo 15% de fibra virgen. Las etapas a destacar en el tratamiento de las fibras recicladas son: pulpeo, destintado y blanqueo. La Tabla 26 muestra los resultados de la caracterización del lodo.

Tabla 26. Resultados caracterización del lodo papelerero

Método	Componente		%	SD (±)	Composición individual
	Carbohidratos		32.99		
T 203	Celulosa	Alfa celulosa	32.82	1,65	50,72%
		Beta celulosa		1,64	48,77%
T 203	Hemicelulosa	Gama celulosa	0.17	0.05	0.51%
T 236	Lignina		2.94	0.52	
	Extractivos		4.15		
T 204	En diclorometano		0.05	0.0001	
T 204	En etanol:benceno		4.10	0.01	
T 211		525 °C	59.9	0.04	
T 413	Cenizas	900 °C	39	0.03	

El contenido de celulosa del lodo papelerero empleado, es similar a los reportados por Lynd *et al.* (2001), Yamashita *et al.* (2008) y Marques *et al.* (2008). Así mismo, el contenido de carbohidratos y el alto contenido de cenizas es coherente con los valores reportados por Chen y colaboradores (2014) para un lodo

que proviene de materia prima reciclada, con proceso de destintado y blanqueo de pulpa (Tabla 3), de hecho, el lodo caracterizado por Silva *et al.* (2011) presenta el mismo contenido de cenizas. Cabe resaltar que la proporción de la composición de celulosa – hemicelulosa – lignina concuerda con los porcentajes indicados por Sun & Cheng (2002) para este tipo de residuos (ver Tabla 2).

De los resultados anteriores se destacan los bajos contenidos de lignina y hemicelulosa como ventaja para el proceso de bioconversión, comparados respecto a la composición de diferentes lodos de la Tabla 3, toda vez que estos dos compuestos son considerados una barrera y por ende, inhibidores de las celulasas según lo descrito en 2.1.2.1.1. Así mismo, el contenido de alfa celulosa es similar al de beta celulosa, lo que indica que existe tanto celulosa resistente a soluciones alcalinas como celulosa parcialmente degradada, indicando que el 50% de la celulosa presente es de menor cristalinidad y por ende, de mayor accesibilidad para las celulasas.

En cuanto al contenido de cenizas, se destaca su valor (59.9%) comparado con lodos de papel provenientes de otros procesos y/o materias primas tales como los señalados en la Tabla 3.

Esta condición indica como posibles interferencias en el bioproceso: un posible efecto buffer del medio (Chen *et al.*, 2012), así como una posible adsorción de la enzima y/o formación de complejos enzima-arcilla por cuenta de los carbonatos y arcillas (Chen *et al.*, 2014; L Kang *et al.*, 2011). Los resultados de este numeral se consignan en el ANEXO B.

- **Adsorción de celulasas**

La concentración del blanco de proteína en el ensayo tuvo un valor de 0.716 (± 0.364) mg proteína /mL de ensayo. Partiendo de la cantidad inicial agregada, la concentración de la enzima comercial Cellic® (315.16 μ L), la concentración de la formulación pura es de 226.8 mg/mL. Chen, Han *et al.* (2014), determina como contenido de proteína para CTec2 y HTec2, concentraciones de 160 mg/mL y 40 mg/mL respectivamente, por lo tanto, en la formulación 70:30, como la empleada en el presente estudio, corresponde a 124 mg/mL, es decir, 54% menor que la concentración estimada en este ensayo.

Se estimó una adsorción específica de 2.26 mg proteína /g cenizas, valor inferior a los rangos descritos por Chen, Venditti, *et al.* (2014) (3 – 5 mg / g arcilla insoluble y 1.5 – 2.5 mg / g carbonatos solubles en ácido). Es posible que la diferencia en los resultados en mención respecto a los del presente estudio, sea debido a la fuente de carbonatos y arcillas empleada por Chen, Venditti *et al.* (2014), dado que estos autores emplean un sustrato ideal mientras que el presente ensayo emplea las cenizas propias de la muestra.

Así mismo, se obtuvo una adsorción de 2.6 mg proteína / g lodo seco, lo que corresponde a una adsorción específica de 37.7 μ g de proteína / g carbohidratos, es decir, 5.3% de la proteína inicial. Estos resultados son coherentes con las afirmaciones de Hui Chen *et al.* (2012) y Chen, Han *et al.* (2014), en cuanto a la

mayor afinidad de las celulasas a los carbonatos de calcio y arcillas que la existente a las fibras del sustrato lignocelulósico.

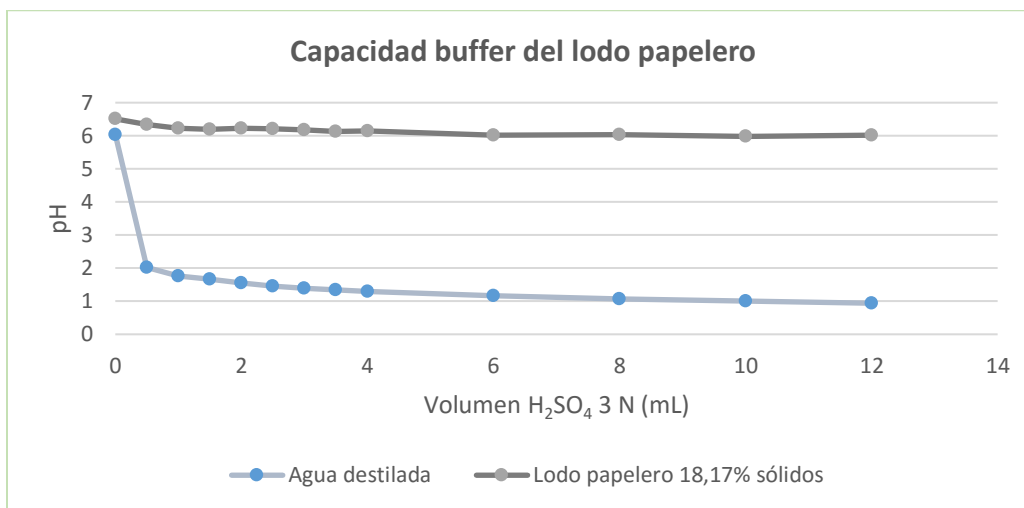
Así mismo, este valor es considerablemente menor al reportado por Jørgensen & Olsson (2006), quienes encontraron una adsorción en sustratos lignocelulósicos pretratados correspondiente al 60 - 80% de la proteína adicionada, la cual fue adsorbida en las 16 horas iniciales de hidrólisis y desorbida posterior a este tiempo.

Los resultados del ensayo de adsorción del presente trabajo, no son concluyentes, con base en las afirmaciones de Jørgensen & Olsson (2006) respecto al tiempo de adsorción de las enzimas, se considera que el tiempo de contacto propuesto por Chen *et al.* (2014) no es representativo para el proceso. Así mismo, el efecto descrito por Lozzi *et al.* (2008), referente a la interferencia que causan las arcillas en el análisis de proteínas por diferentes métodos, también se excluye como factor de error, considerando que el tamaño de partícula en la kaolinita empleada como principal recubrimiento del papel de escritura se encuentra entre 0.7 - 2 μm (Biermann, 1996; Hui Chen et al., 2012), razón por la cual se filtraron las muestras con membrana de 0.2 μm .

- **Capacidad Buffer del lodo**

La Figura 14, presenta el comportamiento del pH en una muestra de lodo con una carga de sólidos de 18.17% en agua destilada. Con la adición de diferentes volúmenes de ácido sulfúrico 3 N, se alcanza una variación de 0.14 unidades de pH, manteniéndose en promedio en 6.16. esta condición, comparada con la disminución drástica del pH en la muestra de agua destilada, refleja el efecto buffer de las cenizas. Resultados similares se observan en los estudios de Li Kang, Wang & Lee (2010) y Lynd *et al.* (2001), de esta observación, puede concluirse que ésta es una condición favorable durante la fermentación, considerando la acidificación del medio que pudiera ocurrir a causa de algunos subproductos del proceso.

Figura 14. Capacidad buffer del lodo papelerero



5.4 HIDRÓLISIS DEL SUSTRATO LIGNOCELULÓSICO

Para el proceso de hidrólisis enzimática, se determinó la cantidad de lodo necesaria para los ensayos de hidrólisis, de acuerdo al contenido de celulosa estimado en la caracterización del lodo papelerero. Con base en estos resultados, se plantearon los tratamientos a considerar en el diseño experimental preliminar con enzima comercial.

Los datos fueron analizados estadísticamente, para identificar el tratamiento con las mejores condiciones para el ensayo de hidrólisis y fermentación simultánea. A partir de dichos resultados, se formuló el diseño experimental con extracto enzimático y la información obtenida se analizó estadísticamente.

5.4.1 HIDRÓLISIS CON ENZIMA COMERCIAL

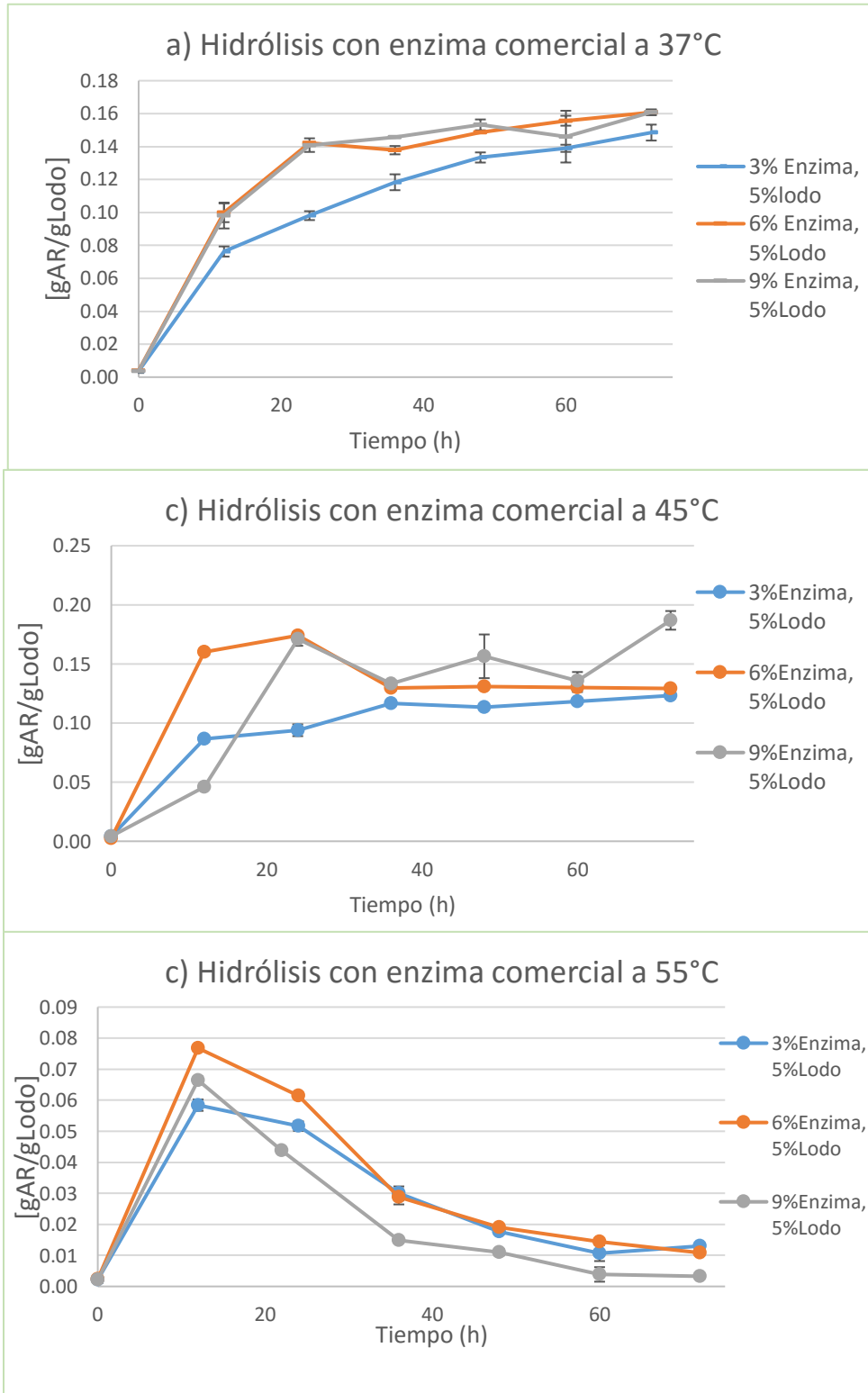
De acuerdo con los resultados de composición del lodo (5.3), las cantidades de enzima comercial a emplear se encuentran especificadas en la Tabla 27. Los azúcares reductores (AR) son considerados la variable de respuesta, a partir de mediciones hechas cada 12 horas, desde la hora 0 hasta la 72. Las condiciones de cada uno de los ensayos y los resultados expresados en diferentes unidades (g AR/L, g AR/g glucano) se detallan en el ANEXO F numeral a.

Tabla 27. Condiciones de carga de sólidos y enzima para hidrólisis enzimática

Volumen de trabajo: 100 mL		Agitación: 150 rpm
Glucano:	0.329 g/glodo	Carga de sólidos (SI)
Lodo base seca (g)		5
%Sólidos		5.00%
Glucano o celulosa (gramos)		1.6
% Enzima		Cantidad de enzima o extracto (g)
(g Enzima/ 100g celulosa)	E1: 3%	0.0494
	E2: 6%	0.0987
	E3: 9%	0.1481
S: Carga de lodo base seca		
E: Concentración de enzima comercial		

Las Figura 15 a, b y c, muestran la producción de AR expresados como gramos de AR/ gramo de lodo a partir de una carga de sólidos de 5% y 150 rpm, en tres temperaturas (37°C, 45°C y 50°C) y con tres niveles de enzima comercial Cellic® (3%, 6% y 9%).

Figura 15. Hidrólisis con enzima Cellic® a 150 rpm en 37, 45 Y 55 °C durante 72 horas



En la Figura 15a (37°C), se identifica la máxima producción de azúcares a las 72 horas con 6% y 9% de enzima, un valor de 0.16 (± 0.001) gAR/gLodo, seguido de 0.15 (± 0.003) gAR/gLodo en 60 horas con 6% de enzima. Adicionalmente, la menor producción de azúcares desde la hora 12 hasta la 72, ocurre con 3% de enzima. De igual forma, los azúcares producidos con 6 y 9% de enzima a esta temperatura, son valores similares para 12 y 24 horas, con una diferencia de 0.042 gAR/gLodo.

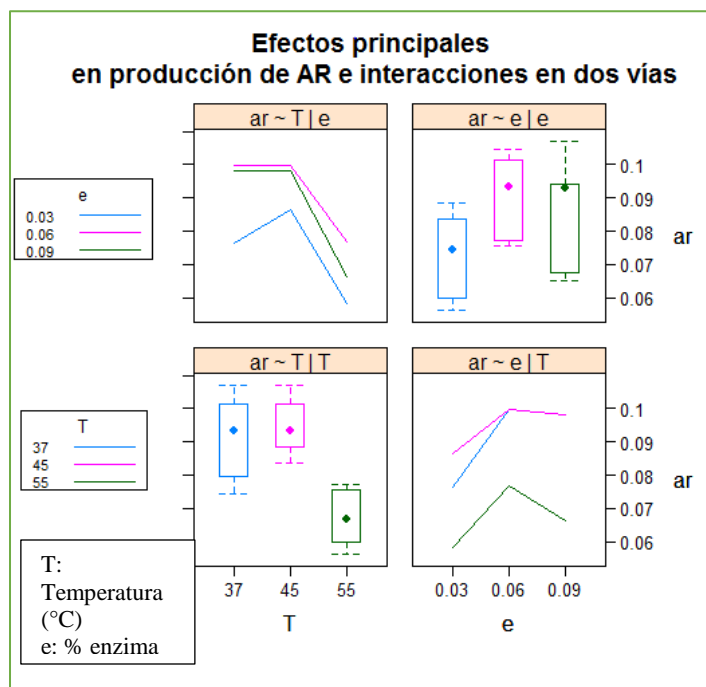
La Figura 15b (45°C) presenta la producción de AR, donde la máxima concentración se observó con 9% de enzima, con un valor de 0.187 (± 0.007) gAR/gLodo a la hora 72, no obstante, dentro de las primeras 24 horas de hidrólisis se identifica una producción cercana a la máxima concentración, con 6% de enzima (0.174 ± 0.002 gAR/gLodo), adicionalmente, en 12 horas se han producido el 92% de estos azúcares (0.16 ± 0.002 g/L). Al igual que a 37°C, se observa las menores concentraciones de AR con 3% de enzima desde las 12 hasta 72 horas. Así mismo, la producción de azúcares con 6% y 9% de enzima presentó valores similares en 24, 36 y 60 horas de hidrólisis, con diferencias de 0.002, 0.003 y 0.005 gAR/gLodo respectivamente, mientras que 48 y 72 horas, sobresale la concentración de AR con 9% de enzima respecto a 3 y 6%.

Respecto a los resultados de la hidrólisis representados en la Figura 15c (55°C), se obtuvo 0.077 (± 0.001) gAR/gLodo como máxima producción en 12 horas con 6% de enzima, seguido de 0.066 (± 0.001) y 0.058 (± 0.002) gAR/gLodo obtenidos en el mismo tiempo con 9% y 3% de enzima respectivamente. A diferencia de los menores resultados de hidrólisis en las otras temperaturas evaluadas, se observa que desde las 24 horas hasta 72, la menor producción de azúcares ocurre con 9%. En este sentido, la Figura 15c muestra un efecto desfavorable a 55°C en la actividad de la enzima; de acuerdo con las especificaciones la ficha técnica (ANEXO D), la temperatura óptima de esta enzima se encuentra entre 45 y 50 °C.

Considerando los resultados anteriores para las tres temperaturas en mención, las mejores condiciones de hidrólisis identificadas para dar inicio al proceso de fermentación con 5% de carga de sólidos (1.6% de celulosa), se logran en 12 horas, a 45°C, con 6% de enzima, para una producción de 0.174 ± 0.002 gAR/gLodo.

La Figura 16 representa los valores medios de los AR producidos en 12 horas de hidrólisis según la Temperatura (T) y concentración de enzima (%E) (los efectos principales). En esta gráfica, las líneas no paralelas sugieren la presencia de interacción entre estas dos variables independientes, en otras palabras, el efecto de la concentración de la enzima, puede depender del valor de la temperatura. Para probar esta interacción, se incluye este nuevo factor dentro del ANOVA de dos factores como se describirá a continuación.

Figura 16. Efectos principales e identificación de interacciones en hidrólisis con enzima comercial



El ANOVA de dos factores descrito en la Tabla 28, confirma que no hay evidencia estadística de interacción significativa entre los factores T:%E, mientras que existe una diferencia significativa entre las medias del %E ($P < 0.01$), así como una diferencia altamente significativa para T ($P < 0.001$).

Tabla 28. ANOVA de dos factores para AR producidos en 12 horas

```
> summary(aec12h)
              Df    Sum Sq   Mean Sq  F value    Pr(>F)
T              1  0.0028805  0.0028805  26.690 3.09e-05 ***
e              1  0.0008553  0.0008553   7.925 0.00982 **
T:e           1  0.0001369  0.0001369   1.268 0.27170
Residuals    23  0.0024823  0.0001079
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Teniendo en cuenta que en los dos factores se tienen diferencias significativas en sus medias, se hace la prueba de comparación de medias (*Least Significant Difference - LSD*) para cada variable con el fin de determinar los niveles que son estadísticamente diferentes. Este análisis, además de permitir identificar

cuáles son las medias con diferencia significativa, es una forma de reducir el error estadístico tipo I (falsas diferencias significativas dentro del análisis de varianza) (Walpole, 1999).

La Tabla 29, permite identificar que solo las medias de hidrólisis enzimática a 55°C son significativamente diferentes respecto a las otras dos temperaturas, no existe diferencia significativa entre las medias de 37°C y 45°C.

Tabla 29. Prueba LSD para Temperatura

```
Study: PRUEBA DE COMPARACION - TEMPERATURA
LSD t Test for ar
Mean Square Error: 0.0001091314
T, means and individual ( 95 %) CI
      ar      std r      LCL      UCL      Min      Max
37 0.09140726 0.012444106 9 0.08422035 0.09859416 0.07448406 0.10715676
45 0.09485407 0.007987039 9 0.08766716 0.10204097 0.08357391 0.10715676
55 0.06720645 0.008061876 9 0.06001954 0.07439335 0.05630346 0.07738436

alpha: 0.05 ; Df Error: 24
Critical Value of t: 2.063899

Least Significant Difference 0.01016382
Means with the same letter are not significantly different.

Groups, Treatments and means
a      45      0.09485
a      37      0.09141
b      55      0.06721
> T: Temperatura; e: % enzima Comercial; ar: Azúcares reductores producidos
```

De igual forma, la Tabla 30 demuestra que los AR producidos con 6 y 9% de enzima comercial no son significativamente diferentes entre sí, mientras que los AR producidos con 3% de enzima, son significativamente diferentes respecto a las otras dos concentraciones.

Tabla 30. Prueba LSD para concentración de enzima

```
Study: PRUEBA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS - %Enzima Comercial
Scheffe Test for ar
Mean Square Error : 0.0001079248
e, means
      ar      std r      Min      Max
0.03 0.07377794 0.01256668 9 0.05630346 0.08844131
0.06 0.09212517 0.01221182 9 0.07555824 0.10451024
0.09 0.08756466 0.01679329 9 0.06519235 0.10715676

alpha: 0.05 ; Df Error: 23
Critical Value of F: 3.422132

Minimum Significant Difference: 0.01281202
Means with the same letter are not significantly different.

Groups, Treatments and means
a      0.06      0.09213
a      0.09      0.08756
b      0.03      0.07378
```

En comparación con los resultados de otros estudios, el resultado de hidrólisis logrado con Cellic® en este trabajo, con una carga de glucano de 1.6% (5% lodo) y carga de enzima de 6%, produjo 0.502 gAR/g glucano (0.16 gAR/g lodo) en 72 horas a 37°C y 150 rpm (resultados ANEXO C Tabla 47). Este resultado

es 32% superior al logrado por Kang, Wang & Lee (2010), quienes en el mismo tiempo de hidrólisis, temperatura y agitación, alcanzaron la producción de 0.0273 g AR/g glucano (3.3 gAR/L), con 6% de carga de glucano en lodo papelerero con la enzima Spezyme CP.

Por otra parte, esta producción de AR con Cellic®, corresponde al 20% de los obtenidos por Marques *et al.* (2008), quien con una menor carga de lodo (3%), obtuvo 0.82 g AR/gLodo a 35°C y 150 rpm en el mismo tiempo de hidrólisis. La diferencia pueda deberse al menor contenido de cenizas en el lodo (29.3%).

✓ **Seguimiento del pH**

En el ensayo de hidrólisis con enzima comercial Cellic®, se registró el pH al inicio y al final del ensayo, la información se presenta en la Tabla 31 y corrobora el efecto buffer causado por el carbonato de calcio presente en las cenizas, aumentando de 2 a 3 unidades del pH deseado, condición descrita por Kang, Wang y Lee (2010) y Chen *et al.* (2012), lo que indica que aun ajustando pH al inicio del ensayo y haciendo uso de una solución buffer, el pH aumenta en el transcurso del proceso.

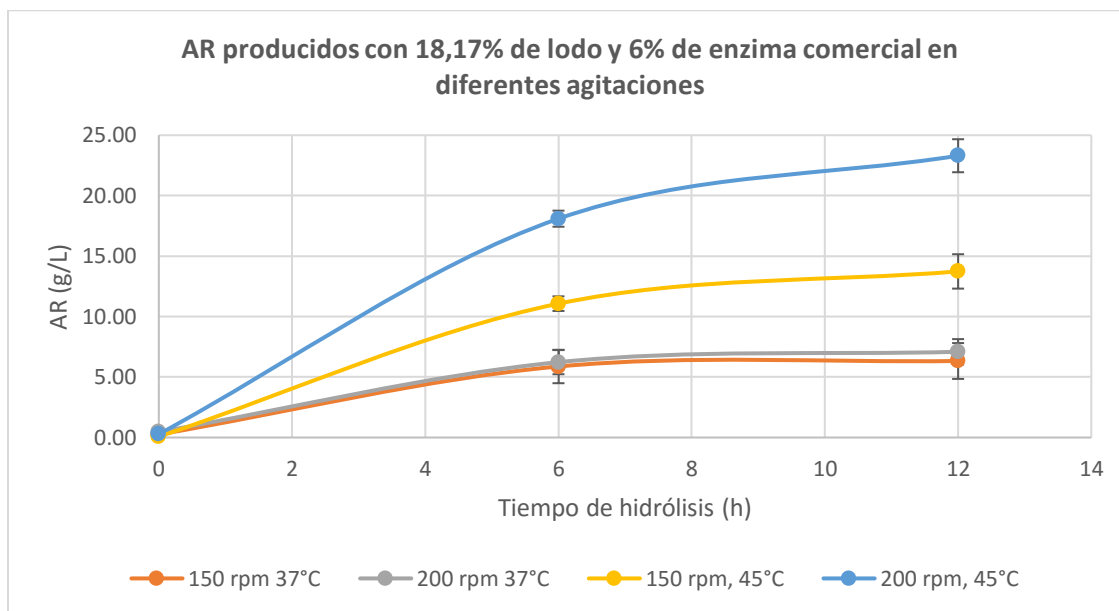
Tabla 31. pH de muestras en hidrólisis con enzima comercial Cellic®

T°C	% E	pH inicial	DS (±)	pH Final (72 h)	DS (±)
37	0.03	3.6	0.1	7.7	0.1
	0.06	3.7	0.3	7.0	0.1
	0.09	3.5	0.1	7.0	0.1
45	0.03	3.7	0.1	7.8	0.1
	0.06	3.7	0.3	7.2	0.2
	0.09	3.8	0.2	6.9	0.2
55	0.03	3.7	0.1	7.8	0.1
	0.06	3.6	0.1	6.8	0.4
	0.09	3.6	0.2	7.2	0.3

5.4.1.1 Evaluación de condiciones de agitación

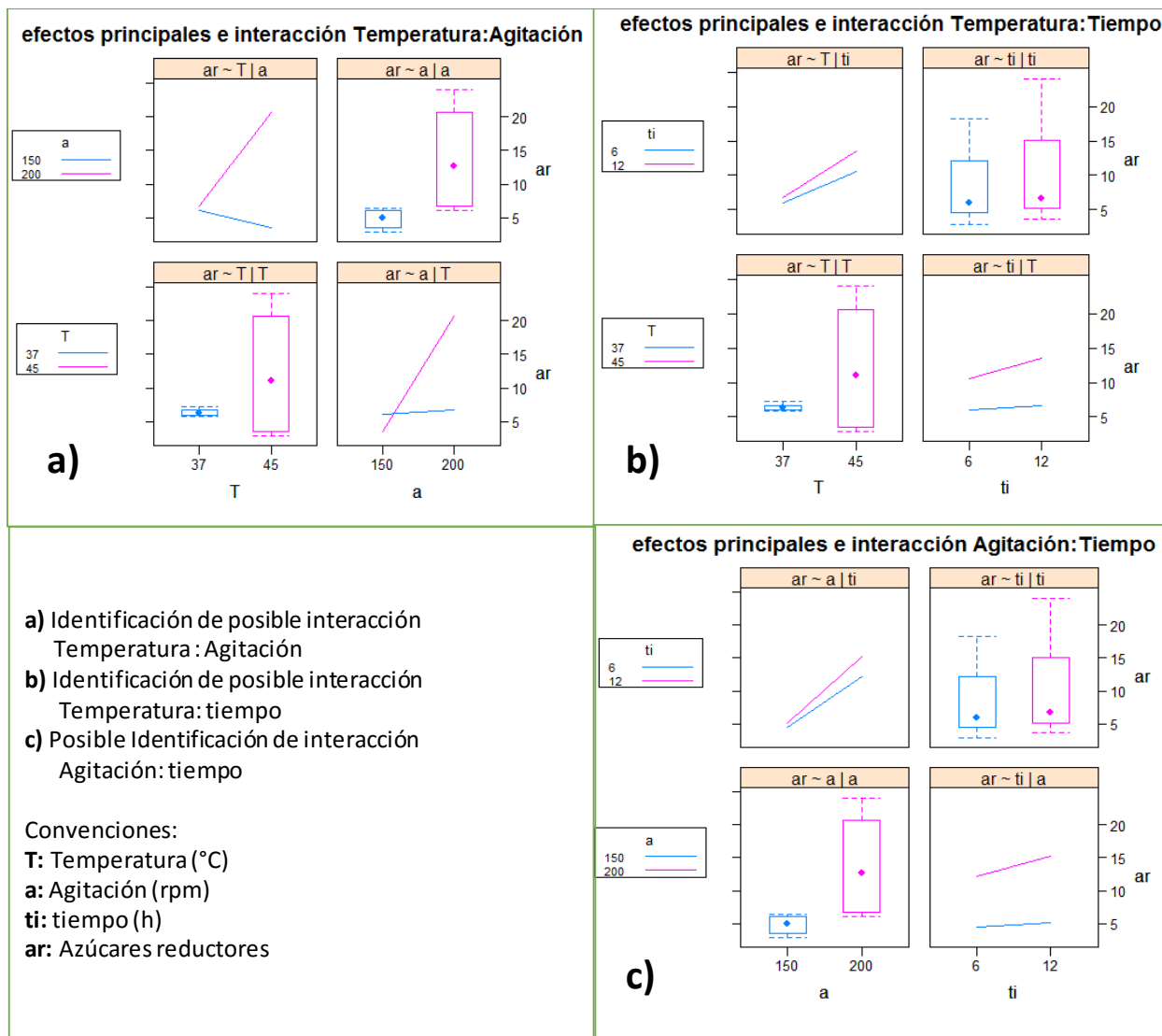
Los AR producidos según las condiciones experimentales descritas se resumen en la Figura 17. Las condiciones de cada hidrólisis, al igual que los resultados de los análisis de DNS se resumen en el ANEXO F numeral b.

Figura 17. Azúcares reductores con 18,17% de sólidos y 6% de enzima en diferentes agitaciones



Los resultados descritos en la figura anterior, muestran un incremento aproximado del 10% en los AR producidos a 200 rpm respecto a los generados a 150 rpm a 37 °C. En el ensayo a 45°C el incremento en AR es alrededor del 40% por el aumento de agitación de 150 a 200 rpm. En el análisis de efectos principales se representa en la Figura 18.

Figura 18. Efectos principales e interacción en ensayo de agitación



De acuerdo a la figura anterior, las líneas no paralelas sugieren la presencia de interacción entre los efectos agitación:Temperatura de manera clara, la interacción entre las otras variables puede también identificarse (tiempo:agitación y Temperatura:tiempo). Por ejemplo, los azúcares producidos en determinada agitación, pueden ser afectados por el efecto que causa la temperatura., es por esto que los resultados de la agitación de 200 rpm a 45°C se destacan notoriamente, considerando que los AR obtenidos en 6 horas es casi tres veces el valor de lo producido a 37°C con la misma agitación. Con base en este análisis gráfico, el análisis de varianza de tres variables independientes se evalúa incluyendo las interacciones para determinar la significancia de estas. El resumen de este ANOVA se presenta en la Tabla 32.

Tabla 32. ANOVA para condiciones de agitación evaluadas

```

> summary(aagit)
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
T           1  195.3    195.3 2625.72 < 2e-16 ***
a           1  474.5    474.5 6378.90 < 2e-16 ***
ti          1   19.8    19.8  266.17 2.15e-11 ***
T:a         1  416.8    416.8 5602.75 < 2e-16 ***
T:ti        1    8.1     8.1  108.62 1.54e-08 ***
a:ti        1    8.9     8.9  119.25 7.96e-09 ***
T:a:ti      1    6.2     6.2   83.02 9.86e-08 ***
Residuals  16    1.2     0.1
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> T:Temperatura, a:agitación, ti:Tiempo
    
```

El análisis de varianza anterior corrobora la fuerte diferencia significativa identificada en todas las medias poblacionales de los tres factores principales evaluados, de hecho, se resalta la fuerte evidencia estadística de las interacciones entre los tres factores evaluados (T*a*ti).

5.4.2 HIDRÓLISIS CON EXTRACTO ENZIMÁTICO

De acuerdo con los resultados de composición del lodo (5.3), se definieron las cargas de lodo para cada nivel evaluado y las respectivas cantidades de extracto enzimático liofilizado a emplear, información detallada en la Tabla 33.

Tabla 33. Cantidades de lodo y extracto empleados en el diseño con extracto enzimático

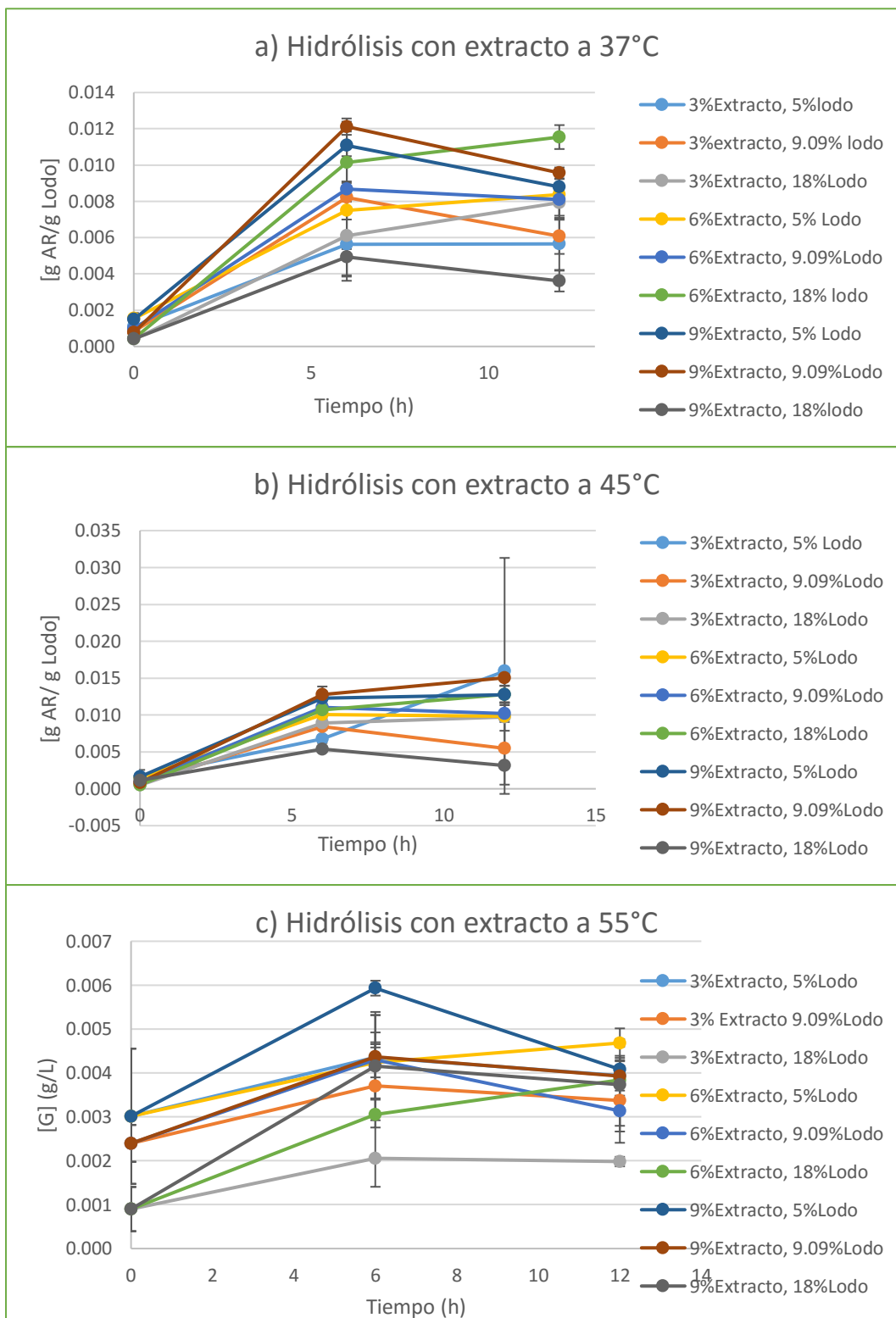
Volumen de trabajo: 100 mL		Agitación: 150 rpm		
		Carga sólidos		
% Celulosa o Glucano: 32.9		S1	S2	S3
Lodo (B.S.)		5	9.09	18.17
%S		5.00%	9.09%	18.17%
g Glucano		1.6	3.0	6.0
%Extracto		Ex1	Ex2	Ex3
(gExtracto/100g cel)	3%	0.0494	0.0897	0.1793
	6%	0.0987	0.1794	0.3587
	9%	0.1481	0.2692	0.5380

Las condiciones de cada uno de los ensayos se detallan en el ANEXO F numerales a, b y c., los resultados de la hidrólisis y análisis de AR se consolidan en el ANEXO F numeral c. Considerando que la actividad del extracto de *Penicillium sp.* es 2.4 veces superior que la de *Verticillium sp.*, se define como formulación

en peso de extracto para las hidrólisis de 70% y 30% respectivamente para cada cepa. La actividad total calculada para esta mezcla fue de 0.118 FPU/g de extracto, con solo un 9.6% de diferencia respecto a la actividad estimada para *Penicillium sp.*. Esta formulación permite también que en el complejo existan posiblemente otras proteínas involucradas en la degradación del material lignocelulósico, según lo discutido en el numeral 5.1.3.

La Figura 19 presenta los resultados del diseño experimental con extracto enzimático. La posible interacción entre las tres variables independientes, se puede identificar en la Figura 20.

Figura 19. Hidrólisis con extracto enzimático a 37, 45 y 55°C

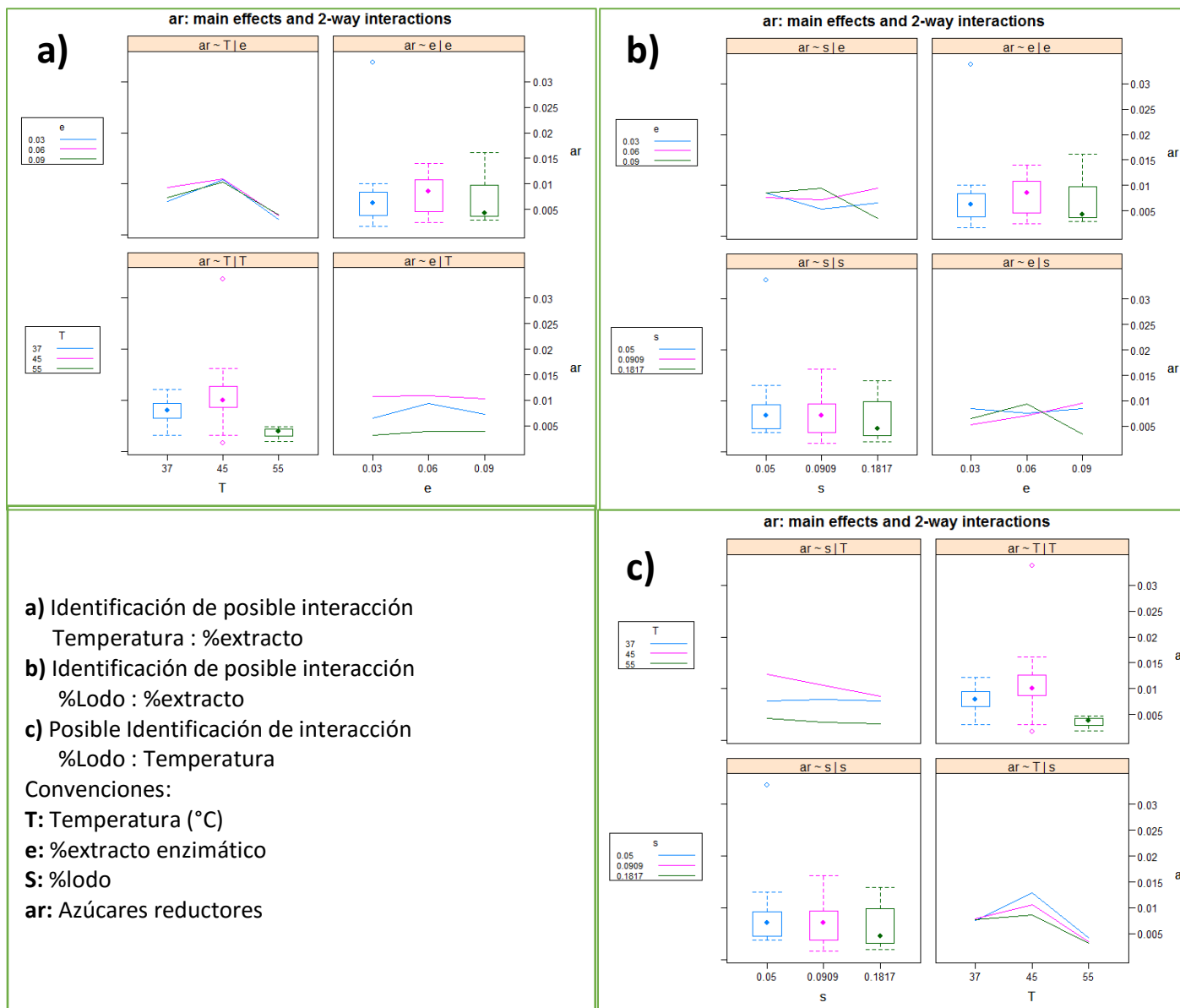


De acuerdo con los resultados expuestos en la Figura 19a (37°C) se obtiene 0.011 (± 0.0006) gAR/gLodo como concentración máxima de AR en 12 horas de hidrólisis con 18,17% de sólidos y 6% de extracto. Por otro lado, la Figura 19b (45°C), muestra que la mayor producción de azúcares se obtiene bajo las mismas condiciones (12 h, 18,17% sólidos y 6% de extracto) con un valor de 0.013 (± 0.0011) gAR/gLodo.

A diferencia de estas dos temperaturas, la máxima producción de AR a 55°C (Figura 19c), ocurre en 6 horas de hidrólisis con 18,17% de sólidos y 9% de extracto, con un valor de 0.004 (± 0.0012) gAR/gLodo. Considerando que el valor máximo producido a 55°C corresponde solo al 32% del valor máximo de AR producidos a 45°C con menor concentración de extracto (6%). Estos resultados demuestran que el extracto enzimático presenta menor actividad a 55°C en comparación con las otras temperaturas evaluadas, resultado que coincide con respecto a los resultados de hidrólisis con enzima comercial Cellic®.

La Figura 20 representa los valores medios de los AR producidos en 12 horas de hidrólisis según los efectos principales, la Figura 20a incorpora las medias de los AR relacionando la temperatura (T) y concentración de extracto (e), la Figura 20b considera los factores de carga de lodo (s) y concentración de extracto (e), y la Figura 20c relaciona las variables carga de lodo (S) con la temperatura (T) (los efectos principales).

Figura 20. Efectos principales e identificación de interacciones en hidrólisis con extracto enzimático



En la Figura 20a sugieren una aparente interacción entre (T) y (e) ya que las líneas de los diferentes factores no son completamente paralelas. Las figuras b y c, describen una posible interacción de los efectos (s) y (e) y (T) y (s). Con base en el ANOVA de 4 factores ilustrado en la Tabla 34, se determina una diferencia significativamente fuerte ($P < 0.001$) para el efecto de la temperatura en la hidrólisis, así mismo, la interacción (e):(s) tiene significancia estadística moderadamente fuerte ($0.001 < P < 0.005$). Los efectos de la temperatura, concentración de enzima y carga de lodo, están descritos por la significancia de su interacción significativa débil ($0.05 < P < 0.01$). Sin embargo, se resalta la diferencia estadísticamente significativa de la temperatura ($P < 0.01$).

Tabla 34. ANOVA de 4 factores principales para AR producidos en 12 h con extracto

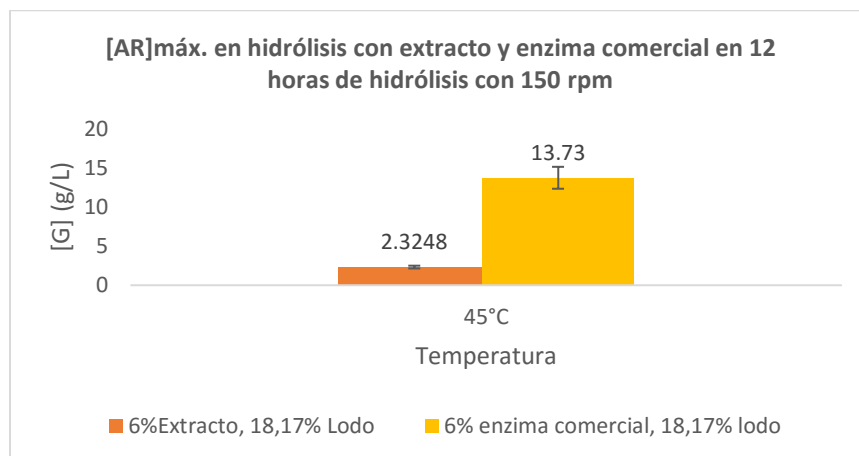
```

> aex6y12=aov(ar~T*e*ti*s,ex6y12)
> summary(aex6y12)
              Df    Sum Sq   Mean Sq  F value    Pr(>F)
T              1 0.0005422 0.0005422   44.897 4.2e-10 ***
e              1 0.0000416 0.0000416    3.445 0.06545 .
ti             1 0.0000001 0.0000001    0.010 0.92234
s              1 0.0000768 0.0000768    6.362 0.01273 *
T:e           1 0.0000015 0.0000015    0.120 0.72915
T:ti          1 0.0000000 0.0000000    0.000 0.98251
e:ti          1 0.0000196 0.0000196    1.626 0.20425
T:s           1 0.0000010 0.0000010    0.085 0.77148
e:s           1 0.0001057 0.0001057    8.753 0.00361 **
ti:s          1 0.0000000 0.0000000    0.000 0.98403
T:e:ti        1 0.0000023 0.0000023    0.187 0.66611
T:e:s         1 0.0000633 0.0000633    5.242 0.02348 *
T:ti:s        1 0.0000002 0.0000002    0.021 0.88618
e:ti:s        1 0.0000008 0.0000008    0.069 0.79350
T:e:ti:s      1 0.0000008 0.0000008    0.063 0.80282
Residuals    146 0.0017632 0.0000121
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> T:Temperatura;e:%extracto;ti:Tiempo;s:carga de lodo
Error: objeto 'Temperatura' no encontrado

```

La Figura 21 representa, la comparación de los resultados de hidrólisis con extracto enzimático obtenidos en una hidrólisis de 12 horas con una carga de lodos de 18,17%, 45 °C y 6% de extracto, y los producidos con 6% de enzima comercial bajo las mismas condiciones de hidrólisis. Los AR producidos con el extracto, corresponden al 17% de lo producido con 6% de enzima comercial en las mismas condiciones de carga de sólidos, tiempo de hidrólisis y temperatura (datos consignados en Anexo F, numeral a, Tabla 47).

Figura 21. Comparación de producción de AR con extracto y enzima comercial en 12 horas de hidrólisis



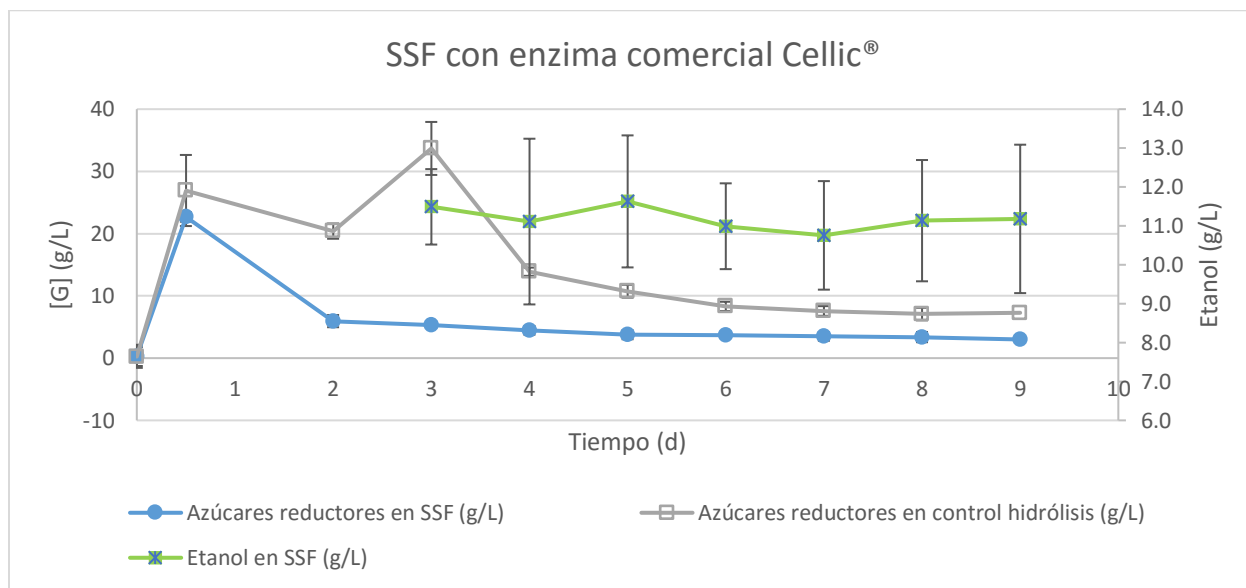
Esta información se destaca dentro de los resultados descritos hasta este numeral, considerando que si bien la adición de la enzima no es comparable en cuanto a su actividad celulolítica (3.69 FPU/mL de Cellic® vs 0.118 FPU/g de extracto), la comparación en peso, permite establecer una unidad de referencia base, en la que puede resaltar la producción del 17% de los AR obtenidos con enzima comercial bajo iguales condiciones, con un extracto que no ha sido purificado aún. Tal análisis permite mostrar los extractos enzimáticos producidos a partir de estos dos hongos filamentosos (*Verticillium sp.* y *Penicillium sp.*), tienen gran potencial biotecnológico, considerando que son cepas nativas y poco estudiadas en comparación con otras especies. Especialmente la cepa *Verticillium sp.*, sobre la cual se aporta nueva información respecto a su capacidad celulolítica, debido a que esta propiedad ha sido poco explorada, tal como se demostró en el estado del arte.

5.5 PRODUCCIÓN DE BIOETANOL POR HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA

Los resultados de los ensayos de hidrólisis y fermentación simultánea realizados, se consolidan en el ANEXO F, numeral d.

La Figura 22 muestra la producción de azúcares reductores durante 9 días en una SSF y en la hidrólisis enzimática realizadas con enzima comercial Cellic®.

Figura 22. SSF con enzima comercial Cellic®



En ella se aprecia tanto en la SSF como en la hidrólisis con enzima comercial, una reducción drástica de la concentración de AR entre 12 horas y dos días de proceso (disminución del 73% de la concentración inicial en SSF y 25% en la hidrólisis) tanto en la SSF como en la hidrólisis. Se considera que esta condición posiblemente se debe a algunos factores:

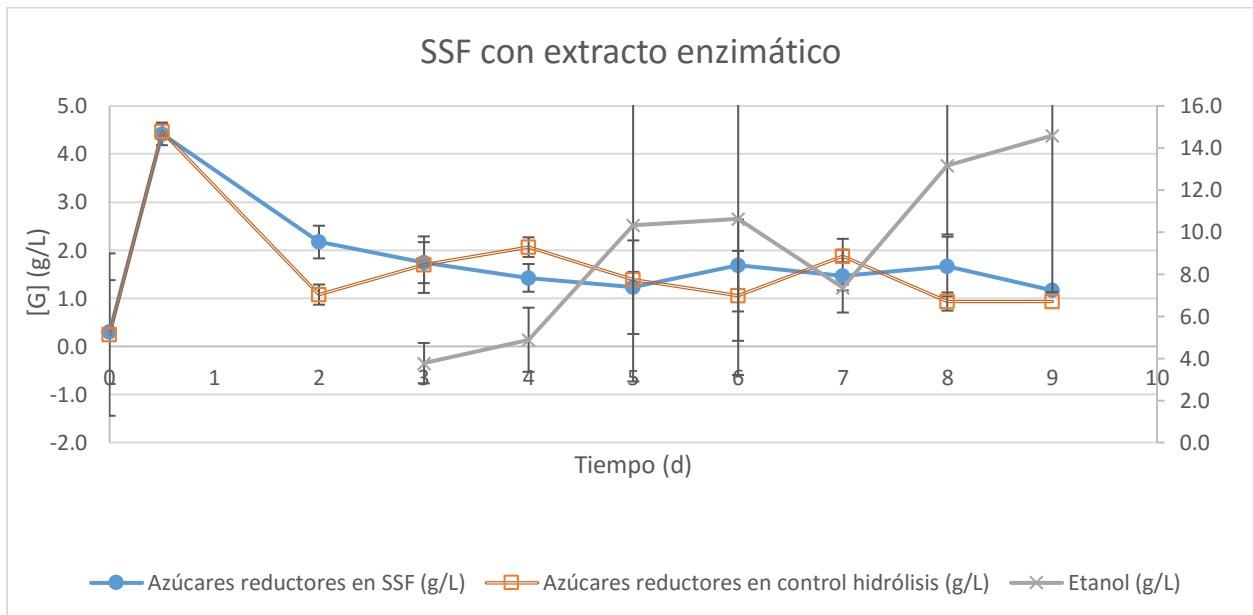
- Cambio de temperatura: (de 45 a 37°C), lo cual afecta la velocidad de reacción de las enzimas (Castellanos et al., 1995b; Doran, 1995; Sakata et al., 1985), efecto reportado por Lu, Reye & Banerjee (2010) en cuanto a que la velocidad de la hidrólisis en las fibras cortas aumenta con el incremento de la temperatura. Si bien los resultados de hidrólisis preliminar con enzima comercial, no presentaron diferencia estadística entre las medias de estas dos temperaturas, las pruebas de agitación determinaron el efecto significativo de la interacción entre temperatura y agitación, con lo cual se corrobora la causa b.
- Disminución de la agitación: este factor influye en la sedimentación de partículas (Doran, 1995), así como en el contacto entre enzima sustrato (Ingesson et al., 2001). Y por último,
- Consumo inicial de azúcares para la levadura. De acuerdo con Doran (1995), el coeficiente de mantenimiento para procesos de fermentación con *S. cerevisiae* en condiciones anaerobias es de 39 g/h (la concentración de azúcares en el momento de adición del inóculo fue 22.67 ± 1.85 g/L).

Entre el segundo y tercer día de proceso, se aprecia un incremento de los AR en la hidrólisis, presentando así el valor más alto de producción (33.692 ± 1.22), mientras que la fermentación se observa una reducción de 0.6 g/L que puede indicar el consumo de glucosa para la producción de etanol, esto coincide con la producción de $11.5 (\pm 0.97)$ g/L de etanol.

A partir del tercer día, se observa la reducción gradual de los AR en la SSF hasta el día 9 del proceso (2.32 g/L, es decir, 20% de la concentración en 12 horas), así como aumentos o disminuciones promedio de 0.4 g/L de etanol, la disminución en la concentración de etanol observada en los días 4, 6 y 7 coincide con la producción estable de AR, ya que en los días intermedios (días 5, 8 y 9) se observa un incremento en la concentración de etanol promedio de 0.31 g/L. Este comportamiento puede deberse a que la velocidad de hidrólisis es menor que la de producción de etanol, por lo cual los azúcares se consumen de manera rápida sin cambios pronunciados diariamente en la concentración de etanol, y posiblemente a una inhibición a causa del etanol en la producción de azúcares (Madrid & Quintero, 2011). La máxima producción de etanol, se observa en el quinto día (11.63 ± 1.7 g/L). Por último, se observa en la hidrólisis enzimática una reducción en los AR desde el tercer día de hidrólisis hasta el final del proceso. Se considera que este comportamiento se debe a algunos de los factores mencionados anteriormente (inhibición por producto y disminución de la velocidad de producción de azúcares por temperatura y agitación). Las barras de error que se presentan en los valores de producción de etanol, indican que no hay diferencias significativas en los valores de etanol estimados desde el día 3 a 9 del proceso.

La Figura 23 describe el proceso SSF con extracto enzimático, en el cual se alcanza una producción de 4.4 g/L de AR en 12 horas de hidrólisis con 200 rpm y 45°C, lo que representa el 19.5% de lo producido con la enzima Cellic® en las mismas condiciones.

Figura 23. SSF con extracto enzimático



Al igual que el proceso con enzima Cellic®, se aprecia una reducción en la concentración de AR igual al 35% de la concentración inicial en SSF y 31% en la hidrólisis. Las razones de este comportamiento se expusieron en el párrafo anterior, de hecho, los resultados estadísticos de hidrólisis enzimática corroboran el efecto de la temperatura. La reducción de AR en los días 3, 4 y 8, coincide con el incremento de la concentración de etanol en los mismos días, lo que indica que en la medida que se produce más AR, aumenta la producción de etanol, y los días de concentración estable de AR (o de pequeños incrementos como en el día 5 y 6 con 0.25 g/L de producción desde el día 4) la concentración de etanol disminuye o no presenta cambios, posiblemente esta estabilidad o reducción de la concentración de etanol, pueda atribuirse al efecto inhibitorio en la producción de azúcares que ocasione el incremento previo. Sin embargo, las barras de error que se presentan en los valores de etanol producido, sugieren que no hay diferencia significativa en la producción de etanol desde el día 3 hasta el día 9 de fermentación.

Respecto a este tipo de inhibición, el estudio de H. Chen & Jin (2006) demostró que el etanol en concentraciones menores a 2% (15.8 g/L), inhibe la hidrólisis enzimática de la celulosa cristalina con celulasas purificadas de *P. decumbens*, sin embargo, este efecto inhibitorio es reversible y no competitivo, de acuerdo al autor, el efecto inhibitorio puede reducirse removiendo el etanol producido en el sistema para recuperar la actividad de las enzimas. De igual forma, Madrid & Quintero (2011) encuentran una inhibición significativa en la hidrólisis debido a concentraciones de etanol igual o superior de 5 g/L. La máxima producción de etanol se observa en el día 9 del proceso (14.59 ± 7.44 g/L).

En cuanto al tamaño de sólidos en los ensayos realizados, se observa un efecto de licuefacción parcial descrito por Lark *et al.* (1997) en las 24 horas iniciales en las muestras con la enzima Cellic®, el cual aumenta a lo largo del proceso de fermentación. Con el extracto enzimático, esta característica se aprecia a partir del 6 día del proceso. La condición de licuefacción se identifica en el momento de toma de muestras, dado que, en las muestras con poca licuefacción se dificultó tomar las alícuotas con la manguera del sistema, ocasionando obstrucción en las líneas. Esta condición se da posiblemente por la viscosidad, al respecto, Kang *et al.* (2011), si bien no reporta valores específicos, indica que el alto contenido de cenizas incrementa la viscosidad afectando la mezcla. Así mismo, la condición es descrita por Doran (1995), quien afirma que cuando las fermentaciones contienen sustratos poliméricos, la viscosidad aparente disminuye a lo largo del proceso de fermentación debido al rompimiento del polímero e incluso puede haber un cambio progresivo de un comportamiento no Newtoniano a Newtoniano. Respecto a esta característica, Roche *et al.* (2009), evaluó la concentración de las partículas sólidas y el límite elástico en procesos de hidrólisis enzimática con 20% de carga de sustratos, encontrando que el sustrato se licua al punto de ser vertible en porcentajes de conversión superior al 40% después de 2 días de hidrólisis con una concentración moderada de enzima

(20mg proteína/g celulosa) con velocidades de mezcla entre 2-20 rpm, lo cual coincide también con lo observado en la hidrólisis enzimática con Cellic®.

Con respecto al pH de los ensayos, el pH medido en el día 9 del proceso fue 7.5 (± 0.1), 7.3 (± 0.2), 6.4 (± 0.3) y 6.2 (± 0.4) para las muestras de control de hidrólisis enzimática con extracto y enzima Cellic® y en las SSF con extracto enzimático y con enzima Cellic® respectivamente. Se hizo un análisis de varianza ANOVA con el cual se concluye que no existe diferencia significativa entre el pH de los controles de hidrólisis con extracto y con enzima Cellic®, al igual que en el pH entre las diferentes fermentaciones. Se encuentra diferencia estadísticamente significativa entre los valores de pH en las hidrólisis enzimática con respecto al pH de las fermentaciones con un nivel de significancia $P < 0.01$. Esto puede deberse a un efecto de acidificación en las muestras a causa del CO_2 producido por la levadura en el proceso de producción de etanol, al igual que la presencia de algunos ácidos orgánicos como subproductos del proceso, el efecto en mención, también es considerado por Li Kang, Wang & Lee (2010). La condición de acidificación es solo favorable en el proceso SSF, considerando que acerca el pH al rango ideal para la levadura y las enzimas (3-6 unidades) (Li Kang et al., 2010), sin que la generación de estos subproductos afecten el proceso.

5.5.1 PARÁMETROS DE EFICIENCIA DEL PROCESO

La Tabla 35 presenta los resultados de los parámetros cinéticos estimados en los bioprocesos de porcentaje de digestibilidad, rendimiento de etanol respecto al máximo teórico a partir de hexosas y rendimiento aparente, al igual que la Tabla 36, la cual resume las productividades observadas para los bioprocesos.

Tabla 35. Parámetros cinéticos estimados

Parámetro		Bioproceso	
En hidrólisis enzimática		Hidrólisis con enzima comercial	Hidrólisis con extracto enzimático
% Digestibilidad (45°C)	%D _{45°C}	40.6%	6.7%
	Tiempo evaluado (d)	12 h	12 h
% Digestibilidad (37°C)	%D _{37°C}	10.9%	1.4%
	Tiempo evaluado (d)	9 d	9 d
En SSF		SSF con enzima comercial	SSF con extracto enzimático
$\Delta\text{Ce}/\text{hex}$		3384.11	3384.11

Parámetro		Bioproceso	
Rendimiento teórico de etanol a partir de hexosas	$Y_{E/hex}$ (g etanol/g glucosa)	33.03%	43.12%
	Tiempo evaluado (d)	9	9
Rendimiento observado	S (g glucano)	20.468	25.682
	Yobs (g etanol/g glucano)	56.82%	56.82%

Tabla 36. Productividad observada en procesos de hidrólisis y SSF

Productividad observada (g glucosa/L*d ; g etanol/L*d)				
Tiempo (d)	Hidrólisis con enzima Cellic®	Hidrólisis con extracto	SSF con Cellic®	SSF con extracto
0.5	53.36	8.44		
2	-4.35	-2.26		
3	13.29	0.62	4.60	0.38
4	-19.81	0.36	-0.38	0.56
5	-3.13	-0.68	0.52	5.91
6	-2.44	-0.33	-0.64	-0.02
7	-0.74	0.83	-0.24	-7.28
8	-0.50	-0.95	0.38	3.13
9	0.19	-0.00	0.05	4.17

Se estimó una digestibilidad del lodo en las hidrólisis enzimáticas (45°C y 200 rpm) de 40.6% en 12 horas de hidrólisis con el uso de la enzima Cellic® y 6.7% en el mismo tiempo de proceso con el extracto. La digestibilidad obtenida en 9 días de hidrólisis (37°C y 150 rpm) fue 10.9% con el uso de la enzima Cellic® y 1.4% con el extracto enzimático, es decir, el 27% y 21% de la digestibilidad obtenida respectivamente con mayor temperatura y agitación.

Se considera que la diferencia de digestibilidad entre las dos hidrólisis está dada por la menor actividad enzimática del extracto, ya que este no es un producto purificado y por tanto es más susceptible a la modificación de las variables del proceso tales como agitación y temperatura (como lo es el caso de la evidencia de las interacciones identificadas y en especial la temperatura, la cual se demostró por el análisis de varianza la diferencia significativa entre 37 y 45°C). Marques *et al.* (2008) reporta igual porcentaje de digestibilidad a partir de una carga de sólidos similar a la del presente estudio (178.6 g/L de lodo base seca). El resultado de Silva *et al.* (2011) para un lodo papelerero con el mismo contenido de cenizas que el de este trabajo, es coherente con la digestibilidad estimada en la hidrólisis con enzima Cellic®, considerando que si bien es 20% superior (69.5% en 1 día), las condiciones empleadas con Cellic® no son las ideales que se

identificaron en el numeral 5.4, mientras que Silva desarrolla la hidrólisis en las condiciones ideales de la celulasa comercial Cellulase® (50°C y 250 rpm).

Por otra parte, la digestibilidad promedio de lodos papeleros reportada por Lynd *et al.* (2001) para provenientes de diferentes fuentes fue 70.9%, es decir, 16% superior a la digestibilidad con enzima Cellic® en el presente estudio y 71% superior a la estimada con el extracto enzimático. En la revisión de estudios, no se encuentra disponible información con respecto a digestibilidad de lodo a partir de extractos enzimáticos.

En cuanto al rendimiento de etanol respecto al máximo teórico a partir de hexosas, para las fermentaciones con enzima Cellic® y extracto enzimático fueron de 0.34 y 0.43, evaluados en el día 5 y 9 respectivamente, ya que estos días presentan la mayor cantidad de etanol en el proceso de fermentación. El rendimiento descrito para la fermentación con enzima comercial, es coherente con el rango reportado por Lark *et al.* (1997) para un lodo paplero (0.43 – 0.48 g etanol/g glucosa), así como 14% y 23% superior al rendimiento de etanol reportado por Prasetyo *et al.* (2011) (23%), con 40 g/L de etanol producido a partir de 161 g/L de contenido de glucano en lodo paplero, 15 FPU/mL, 20% de inóculo de levadura y 80 horas de proceso. Así mismo, el resultado de rendimiento teórico con el uso de Cellic® es 15% superior y con el uso del extracto enzimático es 32% superior, con respecto al reportado por Marques *et al.* (2008) (0.29 g etanol/g azúcares). Por otra parte, los rendimientos de producción de etanol, respecto al máximo teórico reportados por diferentes autores, oscilan entre 72-80% (Li Kang *et al.*, 2010; Lynd *et al.*, 2001; Wei Wang *et al.*, 2010), por lo cual los rendimientos del presente estudio son de 37 a 38 % menores. El mayor rendimiento de etanol identificado en el extracto enzimático, puede entenderse con base en lo enunciado por Krogh *et al.* (2004), en cuanto a las propiedades potenciales de los extractos celulósicos con baja actividad, tales como una actividad específica alta o una baja inhibición por producto.

Respecto a la Tabla 36, máxima productividad observada para la hidrólisis enzimática con Cellic® fue de 53.36 g glucosa/L*d en las primeras 12 horas, seguido 13.29 g glucosa/L*d en el tercer día de proceso, en el día 2 no se presenta productividad observada (debido al cambio de condiciones del proceso), al igual que desde el día 4 hasta el día 9, cuando se observa una productividad de 0.19 g glucosa/L*d.

Para la hidrólisis enzimática con extracto, la productividad observada en las 12 horas iniciales de hidrólisis es de 8.44 g glucosa/L*d, es decir el 15% de la obtenida con la enzima comercial Cellic® en el mismo tiempo de proceso, no obstante, a diferencia de la hidrólisis con enzima comercial, se observa productividad de azúcares en los días 3, 4 y 7, encontrando el valor máximo en el día 7 (0.83 g glucosa/L*d), el cual es 4.33 veces superior al encontrado con enzima comercial Cellic® en el día 9 del proceso.

En cuanto a las productividades observadas en el proceso SSF con enzima comercial Cellic®, la mayor productividad de azúcares se logra en el tercer día del proceso (4.6 g etanol/L*d), seguido de una productividad de 0.52 g etanol/L*d en el día 5 de la fermentación. No se observan productividades de etanol durante los días 4, 6 y 7, lo cual es coherente con el comportamiento representado en la Figura 22. La menor productividad se observa en el día 9, dado que las concentraciones de azúcares son estables, y por tanto, no se producen cantidades de etanol similares a las presentadas en días de mayor productividad.

Para el bioproceso SSF con extracto enzimático, se observan más días con productividad, siendo la mayor igual a 5.91 g etanol/L*d en el día 5 de fermentación, seguido de 4.17 g etanol/L*d en el día 9 del proceso de bioconversión, la menor productividad observada se presenta en el cuarto día (0.56 g etanol/L*d), la cual corresponde al 9% de la máxima observada, mientras que para los días 6 y 7 no se observa productividad.

5.5.2 DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD TÉCNICA DEL EXTRACTO

La producción de bioetanol a nivel industrial tiene varios retos, entre ellos, los asociados al costo de enzimas celulósicas (Hui Chen, *et al.*, 2014; Juturu & Wu, 2014; Merino & Cherry, 2007; Teeri *et al.*, 1992). Los valores de reducción del costo de enzimas proyectados por el Laboratorio de Energías Renovables de los Estados Unidos, están orientados a alcanzar reducciones significativas en el costo de las enzimas requeridas en los procesos de biorefinación. Este objetivo, parte de la consideración que el rango de costo proyectado se basa en eliminar los costos de producción de las enzimas asociados al transporte y formulación de productos (D. Humbird *et al.*, 2011), es decir, se considera que a futuro, las enzimas serán producidas en el sitio o cerca de las biorefinerías y por tanto no necesitarán fórmulas de estabilidad para su almacenamiento por tiempos extensos.

A continuación, se presenta la determinación de viabilidad técnica del extracto.

- **Determinación de costos asociados a la producción del extracto y comparación con el costo de la enzima comercial:**

Para 2011, el 57% de los costos asociados a la producción de enzimas comerciales estaba relacionado directamente con la fuente de carbono, es decir, con un costo de U\$0.34/gal de etanol, \$0.19 /gal están asociados a glucosa requerida en la producción de las enzimas y son equivalentes a \$4.24/g de proteína (Velson, 2014).

De acuerdo con la consulta realizada directamente a Novozymes (fabricantes del complejo Cellic®), los costos estimados de la enzima con respecto a la eficiencia del proceso de hidrólisis y fermentación

simultánea, es de 0.34 USD/galón de etanol producido. Las condiciones de referencia para dicho valor, son el uso de forraje de maíz como sustrato, con una carga de celulosa de 2% en el proceso SSF, una carga baja de enzima (3% de enzima), logrando 90% de eficiencia en la hidrólisis enzimática y 95% de eficiencia en la producción de etanol.

Las condiciones basadas en un proceso de alta eficiencia a escala industrial, no pueden ser comparables con los costos directos de la producción del extracto enzimático. Para alcanzar unas condiciones cercanas a las de referencia que permitan hacer la comparación, se requiere desarrollar otros estudios del proceso. Entre los aspectos que podrían considerarse están: estudiar propiedades reológicas, control o reducción de las inhibiciones descritas previamente para la hidrólisis y la fermentación, el uso de herramientas análisis estadístico para optimización de las condiciones del proceso, uso de una levadura termo tolerante, escalamiento la SSF a escala piloto al menos para corroborar la optimización del proceso y el uso de herramientas de simulación de procesos.

Para entender la diferencia en el costo se presenta la Tabla 37, en la cual se describen los costos asociados a la producción del extracto con respecto a la cantidad de etanol producido bajo las condiciones del ensayo descritas.

Tabla 37. Costos asociados a la producción del extracto enzimático

Costos asociados a producción de extracto enzimático			
Extracto producido (mg extracto/50 g de papel)	305	% Conversión	6.70%
Papel filtro	\$ 111,844	Carga de celulosa	1.60%
Membranas de filtración	\$ 8,780	Tiempo de fermentación	9 días
Sales y medios de cultivo	\$ 1,861	Producción de etanol (g/L)	14.59
Total costo (COP)	\$ 122,485	Densidad etanol absoluto (g/mL)	0.79
Costo unitario (COP/mg extracto)	\$ 401.59	TRM promedio Marzo 2016	\$3,118.49
Costo unitario (COP/g proteína)	\$ 2.113,62		
Costo extracto (COP)/galon de etanol		147,458,159.7 COP	
Costo extracto (USD)/galon de etanol		47,285.1 USD	

De acuerdo a los costos descritos, la producción del extracto enzimático bajo las condiciones de laboratorio no comparables con los costos de referencia para escala industrial. Además de los estudios descritos que permitirían alcanzar un nivel de comparación para el uso de las enzimas en el proceso, es importante recalcar que los costos más representativos en la producción del extracto, están dados por el papel filtro y las membranas de nitrocelulosa. En el caso del papel, se debe a que es un sustrato ideal de

referencia para hacer comparables los resultados con los de otros estudios, en cuanto a las membranas, permite la “limpieza” del extracto, lo cual brinda también protección a los equipos en los que se manipulan las muestras (ultrafiltración).

- Diseño de una matriz de priorización para toma de decisiones como herramienta para determinar la viabilidad.

Con base en el análisis anterior respecto a los costos de las enzimas y el extracto enzimático con base en la producción de etanol, se definen los aspectos a priorizar para definir un criterio de la viabilidad del uso de la enzima. La Tabla 38, describe en la lista de aspectos a priorizar en la matriz.

Tabla 38. Aspectos a priorizar en matriz de priorización

Aspectos a priorizar	
A	% Digestibilidad
B	Rendimiento teórico de etanol
C	Costo por galón de etanol producido
D	Potencial de sustitución de materias primas para su producción
E	Potencial de aumento del contenido de proteína

Se definieron los valores de ponderación en la tabla de valores categorizando la importancia del aspecto en una escala de 1 a 3. Las categorías se describen en la Tabla 39.

Tabla 39. Tabla de valores para matriz de priorización

Tabla de valores	
1	Importancia semejante
2	Más importante
3	Mucho más importante

Cuando se establecieron los valores para dar el peso a cada aspecto a priorizar, se construyó la tabla de resolución de prioridades (Tabla 40), en ella se hizo la calificación de la importancia de cada uno de los aspectos, respecto a los demás en la matriz diseñada para tal fin.

Una vez resuelta la matriz, se tabularon los resultados de la ponderación en la columna derecha “T” de la misma tabla, con ello se identificó el número de veces que fue escogida una alternativa, y en la última columna “P”, se suma su peso de ponderación.

Tabla 40. Tabla de resolución de prioridades

Tabla de resolución de prioridades

	A	B	C	D	E		T	P
A		B2	1	1	A3	A:	4	7
B			1	D3	A2	B:	2	3
				D3	C2	C:	1	2
					D3	D:	3	9
						E:	0	0

El aspecto más importante de acuerdo a los resultados de la tabla de resolución de prioridades, es D: “Potencial de sustitución de materias primas para su producción”, si bien la tabulación que tuvo A: “%Digestibilidad” fue superior, la ponderación indica que a este aspecto se le da un nivel menor de importancia referente a la viabilidad técnica. En tercer nivel de importancia el aspecto B: “Rendimiento de etanol”. Por último, se calificó el aspecto C: “Costo de extracto por galón de etanol producido”, debido a que el aspecto E: “Potencial de aumento del contenido de proteína” resultó sin calificación y sin ponderación en el proceso de priorización.

De acuerdo con la importancia dada al potencial de sustitución de materias primas para la producción de los extractos, y los aspectos descritos previamente en la estimación de los costos para la obtención del extracto, se considera que los extractos enzimáticos de *Verticillium sp.* y *Penillium sp.* son viables técnicamente para el proceso de producción de bioetanol por SSF.

6 CONCLUSIONES

- Es posible producir bioetanol a partir de lodo papelero como fuente lignocelulósica, haciendo uso de un extracto enzimático obtenido a partir de los hongos filamentosos *Verticillium sp.* y *Penicillium sp.* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, logrando un rendimiento teórico de etanol a partir de glucosa de 43.12% (g etanol/g glucosa) en una hidrólisis y fermentación simultánea de 9 días.
- Los parámetros cinéticos evaluados demuestran un mejor comportamiento del extracto enzimático en el proceso SSF.
- La capacidad buffer del lodo papelero puede favorecer el control de pH en procesos fermentativos dado el efecto de los subproductos generados durante la producción de bioetanol.
- El alto contenido de ceniza, hace que el lodo empleado en este estudio sea menos atractivo para el proceso de hidrólisis y fermentación simultánea.
- Los extractos enzimáticos de *Verticillium sp.* y *Penicillium sp.* son viables técnicamente para el proceso de producción de bioetanol por SSF, si se producen a partir de residuos agroindustriales.

7 RECOMENDACIONES

Con base en los resultados del presente estudio, se consideran pertinentes las siguientes recomendaciones:

- Identificar y caracterizar las proteínas presentes en cada extracto por medio de técnicas de separación como punto isoeléctrico y cromatografía de exclusión por tamaño para corroborar la identificación hecha en este estudio basado en la revisión bibliográfica.
- Dados los numerosos estudios mencionados referentes al contenido de proteína y actividades enzimáticas en extractos crudos, se sugiere evaluar la producción de celulasas en cultivos líquidos o en residuos agroindustriales, que permitan identificar fuentes de carbono con las cuales se optimice la producción de estas proteínas así como sus propiedades.
- Se recomienda incluir la etapa de diálisis de los extractos concentrados con el fin de mejorar sus propiedades hidrolíticas.
- Se sugiere evaluar el efecto de adsorción de proteínas y en fibras a través de ensayos que incluyan la isoterma de Langmuir, así como la adición de surfactantes o proteínas exógenas que disminuyan el efecto de adsorción en cenizas para optimizar el bioproceso.
- Con respecto al proceso SSF, se recomienda implementar un mayor tiempo de hidrólisis previa a SSF, así como mantener las condiciones de agitación inicial para mejorar las propiedades reológicas del proceso, y evaluar si el aumento de agitación afecta la producción de etanol lograda en las condiciones iniciales de referencia.
- En cuanto al tamaño de partícula, se considera pertinente evaluar el proceso con la reducción del tamaño del lodo por un tratamiento mecánico de molido y determinar si tiene un efecto significativo en la digestibilidad del lodo.
- Según Yamashita *et al.* (2008), es posible que los iones metálicos y/o impurezas del lodo papelerero, afecten la producción de etanol, mas no la actividad de las enzimas, esta condición podría evaluarse en futuros proyectos.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Alarcon, A. V. (2010). *Producción de bioetanol con Zymomonas mobilis*. Instituto Politécnico Nacional. Retrieved from <http://tesis.ipn.mx:8080/xmlui/handle/123456789/10599>
- Alaswad, A., Dassisti, M., Prescott, T., & Olabi, A. G. (2015). Technologies and developments of third generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *51*, 1446–1460. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.058>
- American Forest & Paper Association. (1994). *AGENDA 2020*. Retrieved from <http://infohouse.p2ric.org/ref/29/28974.pdf>
- ANDI - Cámara de Pulpa Papel y Cartón. (2014). Reporte anual de consumo aparente papel de desperdicio en Colombia. Bogotá.
- Arantes, V., & Saddler, J. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, *3*, 1–11.
- Area, M., & Popa, V. (2014). *Wood Fibres For Papermaking [e-book]*. Shrewsbury: Smithers Pira.
- Bahkali, A. H. (1995). Production of cellulase, xylanase and polygalacturonase by *Verticillium tricorpus* on different substrates. *Bioresource Technology*, *51*(2-3), 171–174.
- Bahkali, A. H. (1996). Influence of various carbohydrates on xylanase production in *Verticillium tricorpus*. *Bioresource Technology*, *57*, 265–268.
- Bai, H., Wang, H., Sun, J., Irfan, M., Han, M., Huang, Y., ... Yang, Q. (2013). Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in submerged fermentation. *EXCLI Journal*, *12*, 528–540.
- Béguin, P., & Aubert, J.-P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*, *13*, 25–58.
- Bello, D., Carrera, E., & Díaz M, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, *XL*(2), 45–50. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120664006>
- Beltrán, P. A., & Leguizamón, J. L. (2012). *Aislamiento y caracterización de microorganismos celulolíticos provenientes de los desechos sólidos agroindustriales para su utilización en la*

- producción de celulasas*. Universidad de La Sabana.
- Bender, D. A., Datta, S. P., & Smith, A. D. (2000). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* (Revised ed). New York: Oxford University Press.
- Berlin, A., Gilkes, N., Kilburn, D., Maximenko, V., Bura, R., Markov, A., ... Saddler, J. N. (2006). Evaluation of cellulase preparations for hydrolysis of hardwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129-132, 528–545.
- Bernardez, T. D., Lyford, K., Hogsett, D. A., & Lynd, L. R. (1993). Adsorption of Clostridium thermocellum cellulases onto pretreated mixed hardwood avicel and lignin. *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 899–907.
- Bezerra, R. M. F., & Dias, A. a. (2005). Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 126(1), 49–59.
- Bhat, K. M., McCrae, S. I., & Wood, T. M. (1989). The endo-(1→4)-β- d-glucanase system of Penicillium pinophilum cellulase: Isolation, purification, and characterization of five major endoglucanase components. *Carbohydrate Research* 1, 190(2), 279–297.
- Bhat, S. Bhat, K. M. (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15(3/4), 583–620.
- Bhatia, Y., Mishra, S., & Bisaria, V. S. (2002). Microbial β-Glucosidases: Cloning, Properties, and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(4), 375–407.
- Bhiri, F., Chaabouni, S. E., Limam, F., Ghir, R., & Marzouki, N. (2008). Purification and biochemical charaBhiri, F., Chaabouni, S. E., Limam, F., Ghir, R., & Marzouki, N. (2008). Purification and biochemical characterization of extracellular betaglucosidases from the hypercellulolytic Pol6 mutant of Penicillium occitanis. Ap. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 149(2), 169–182.
- Biermann, C. J. (1996). *Handbook of pulping and papermaking* (2nd ed.). San Diego, CA.: Academic Press.
- Bisaria, V. S., & Ghose, T. K. (1981). Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microbial Technology*, 3, 90–104.
- BNDES, CGEE, FAO, & CEPAL. (2008). *Bioetanol de caña de azúcar: energía para el desarrollo sostenible* (1ra Edició). Río de Janeiro: BNDES. Retrieved from http://www.bioetanoldecanadeazucar.org/es/download/resumo_executivo.pdf
- Brown, J. A., Collin, S. A., & Wood, T. M. (1987a). Development of a medium for high cellulase,

- xylanase and β -glucosidase production by a mutant strain (NTG III/6) of the cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 9(6), 355–360.
- Brown, J. A., Collin, S. A., & Wood, T. M. (1987b). Enhanced enzyme production by the cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum*, mutant strain NTGIII/6. *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 176–180.
- Burkheisser, E. V. (2010). *Biological Barriers to Cellulosic Ethanol*. (E. V. Burkheisser, Ed.) *In Renewable Energy: Research, Development and Policies Series* (1st ed.). New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Cabezas, M. J., Salvador, D., & Sinisterra, J. V. (1991). Stabilization- activation of pancreatic enzymes adsorbed on to a sepiolite clay. *Of Chemical Technology and Biotechnology*, 52(2), 265–274.
- Carder, J. H. (1989). Distinctions between cellulase isoenzyme patterns of five plant-pathogenic *Verticillium* species. *Mycological Research*, 92(3), 297–301. [http://doi.org/10.1016/S0953-7562\(89\)80069-3](http://doi.org/10.1016/S0953-7562(89)80069-3)
- Castellanos, O. F., Sinitsyn, A. P., & Vlasenko Yu., E. (1995a). Comparative evaluation of hydrolytic efficiency toward microcrystalline cellulose of *Penicillium* and *Trichoderma* cellulases. *Bioresource Technology*, 52(2), 119–124.
- Castellanos, O. F., Sinitsyn, A. P., & Vlasenko Yu., E. (1995b). Evaluation of hydrolysis conditions of cellulosic materials by *Penicillium* cellulase. *Bioresource Technology*, 52(2), 109–117.
- Castro, D., Peña, C., & Farrés, A. (2010). Producción y características de cutinasas: una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 13(1), 16–25.
- Cavaco-Paulo, A., & Almeida, L. (1994). Cellulase Hydrolysis of Cotton Cellulose: The Effects of Mechanical Action, Enzyme Concentration and Dyed Substrates. *Biocatalysis and Biotransformation*, 10(1-4), 353–360.
- Cavaco-Paulo, A., & Almeida, L. (1996). Effects of agitation and endocluacanase pretreat on hydrolysis of cotton fabrics by a total cellulase. *Textile Research Journal*, 66(5), 287–294.
- Chaabouni, S. E., Hadj-Taieb, N., Mosrati, R., & Ellouz, R. (1994). Preliminary assessment of *Penicillium occitanis* cellulase: A further useful system. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(6), 538–542.
- Chandra, M., Kalra, A., Sharma, P. K., & Sangwan, R. S. (2009). Cellulase production by six *Trichoderma* spp. fermented on medicinal plant processings. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(4), 605–609.

- Chaudhari, S. A., & Singhal, R. S. (2015). Cutin from watermelon peels: A novel inducer for cutinase production and its physicochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, *79*, 398–404.
- Chen, H., Han, Q., Daniel, K., Venditti, R., & Jameel, H. (2014). Conversion of Industrial Paper Sludge to Ethanol: Fractionation of Sludge and Its Impact. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *174*, 2096–2113.
- Chen, H., & Jin, S. (2006). Effect of ethanol and yeast on cellulase activity and hydrolysis of crystalline cellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(7), 1430–1432.
<http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.03.027>
- Chen, H., Venditti, R., Gonzalez, R., Phillips, R., Jameel, H., & Park, S. (2014). Economic evaluation of the conversion of industrial paper sludge to ethanol. *Energy Economics*, *44*, 281–290.
- Chen, H., Venditti, R., Jameel, H., & Park, S. (2012). Enzymatic Hydrolysis of Recovered Office Printing Paper with Low Enzyme Dosages to Produce Fermentable Sugars. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *166*, 1121–1136. <http://doi.org/10.1007/s12010-011-9498-2>
- Chen, M., Qin, Y., Liu, Z., Liu, K., Wang, F., & Qu, Y. (2010). Isolation and characterization of a β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. *Enzyme and Microbial Technology*, *46*(6), 444–449.
- Cherry, J., & Fidantsef, A. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, *14*(4), 438–443.
- Chu, J., Li, W.-F., Cheng, W., Lu, M., Zhou, K.-H., Zhu, H.-Q., ... Zhou, C.-Z. (2015). Comparative analyses of secreted proteins from the phytopathogenic fungus *Verticillium dahliae* in response to nitrogen starvation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*.
- Chu, K. H., & Feng, X. (2013). Enzymatic conversion of newspaper and office paper to fermentable sugars. *Process Safety and Environmental Protection*, *91*(1-2), 123–130.
<http://doi.org/10.1016/j.psep.2011.12.003>
- Chulkin, A. M., Loginov, D. S., Vavilova, E. A., Abyanova, A. R., Zorov, I. N., Kurzeev, S. A., ... Benevolenskii, S. V. (2009). Enzymological Properties of Endo_(1–4) β _Glucanase Eg12p of *Penicillium canescens* and Characteristics of Structural Gene *egl2*. *Biokhimiya*, *74*(6), 805 – 813.
- Ciolacu, D., Ciolacu, F., & Popa, V. I. (2008). Supramolecular structure - A key parameter for cellulose biodegradation. *Macromolecular Symposia*, *272*(1), 136–142.
- Ciolacu, D., Ciolacu, F., & Popa, V. I. (2011). Cellulose Allomorphs : Structure and characterization.

- Cellulose Chemistry and Technology*, 45(1-2), 13–21.
- Cooper, R. (1978). Cell wall-degrading enzymes of vascular wilt fungi. II. Properties and modes of action of polysaccharidases of *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological Plant Pathology*, 13, 101–134.
- Cooper, R., & Wood, R. (1975). Regulation of synthesis of cell wall degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological Plant Pathology*, 5, 135–156.
- Coughlan, M. (1992). Enzymic hydrolysis of cellulose: An overview. *Bioresource Technology*, 39(2), 107–115.
- Coughlan, M. P. (1985). The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 3(1), 33–109.
- Cowling, E. (1975). Cellulose as a chemical and energy source. In *Biotechnol. Bioeng. Symp. Conference Proceedings* (p. 163).
- D. Humbird, R. Davis, L., Tao, C., Kinchin, D., Hsu, D., & Aden, A. (2011). *Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol*. Seattle.
- Dashtban, M., Maki, M., Leung, K. T., Mao, C., & Qin, W. (2010). Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(May), 302–309.
- Dies, G., Henrissat, B., Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure Cell Press*, 3(9), 853–859.
- Din, N., Gilkes, N., Tekant, B., Miller, R. J., Warren, R., & Kilburn, D. (1991). Non- hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase. *Nature Biotechnology*, 9, 1096 – 1099.
- Divne, C., Stahlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J., ... Jones, T. (1994). The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science*, 265(5171), 524–528.
- Domke, S. B., Aiello-Mazzarri, C., & Holtzapple, M. T. (2004). Mixed acid fermentation of paper fines and industrial biosludge. *Bioresource Technology*, 91, 41–51.
- Doran, P. M. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. *Bioprocess Engineering Principles*. San Diego, CA.: Academic Press.
- Dowe, N., & Mcmillan, J. (2008). *SSF Experimental Protocols — Lignocellulosic Biomass Hydrolysis*

and Fermentation Laboratory Analytical Procedure (LAP) SSF Experimental Protocols — Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation Laboratory Analytical Procedures. Renewable Energy. Golden, Colorado. Retrieved from www.nrel.gov

- Duff, S. J. B., Moritz, J. W., & Andersen, K. L. (1994). Simultaneous Hydrolysis and Fermentation of Pulp Mill Primary Clarifier Sludge. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 72(6), 1013–1020.
- Duff, S. J. B., Moritz, J. W., & Casavant, T. (1995). Effect of surfactant and particle size reduction on hydrolysis of deinking sludge and nonrecyclable newsprint. *Biotechnology and Bioengineering*, 45(3), 239–244.
- Duff, S. J. B., & Murrayh, W. D. (1996). Bioconversion of forest products industry Waste cellulose to fuel ethanol : A review. *Science And Technology*, 55.
- Espinoza, H. R., & Gómez, C. R. (2015). Abordaje metodológico para formulación participativa de planes de asistencia técnica agropecuaria con enfoque territorial. *Acta Agronómica*, 64(451-62).
- Esterbauer, H., Steinerb, W., Labudovaa, I., Hermanna, A., & Hayna, M. (1991). Production of Trichoderma cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology*, 36(1), 51–65.
- Eveleigh, D. E., Mandels, M., Andreotti, R., & Roche, C. (2009). Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology for Biofuels*, 2, 21.
- Fan, Z., & Lynd, L. R. (2007a). Conversion of paper sludge to ethanol. I: Impact of feeding frequency and mixing energy characterization. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30, 27–34.
- Fan, Z., & Lynd, L. R. (2007b). Conversion of paper sludge to ethanol. II: Process design and economics analysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30, 35–45.
- Fan, Z., South, C., Lyford, K., Munsie, J., Van Walsum, P., & Lynd, L. R. (2003). Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26, 93–101.
- Farid, M. A., El-Enshasy, H. A., & Noor El-Deen, A. M. (2002). Alcohol production from starch by mixed cultures of *Aspergillus awamori* and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* at different agitation speeds. *Journal of Basic Microbiology*, 42(3), 162–171.
- Gao, L., Gao, F., Zhang, D., Zhang, C., Wu, G., & Chen, S. (2013). Purification and characterization of a new β -glucosidase from *Penicillium piceum* and its application in enzymatic degradation of delignified corn stover. *Bioresource Technology*, 147, 658–661.

- Gao, L., Wang, F., Gao, F., Wang, L., Zhao, J., & Qu, Y. (2011). Purification and characterization of a novel cellobiohydrolase (PdCel6A) from *Penicillium decumbens* JU-A10 for bioethanol production. *Bioresource Technology*, *102*(17), 8339–8342.
- Gavrilescu, D. (2008). Energy From Biomass in Pulp and Paper Mills. *Environmental Engineering and Management Journal*, *7*(5), 537–546.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, *59*(2), 257–268.
- Glazer, A., & Nikaido, H. (1998). *MICROBIAL BIOTECHNOLOGY: Fundamentals of applied microbiology* (2nd ed.). New York: W.H. Freeman and Company.
- Gnanou, Y., & Fontanille, M. (2008). *Organic and Physical Chemistry of Polymers*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience.
- Golan, A. E. (2011). Cellulase : Types and Action, Mechanism, and Uses.
- Gomes, D. S., Matamá, T., Cavaco-Paulo, A., Campos-Takaki, G. M., & Salgueiro, A. (2013). Production of heterologous cutinases by *E. coli* and improved enzyme formulation for application on plastic degradation. *Electronic Journal of Biotechnology*, *16*(5), 3–3.
- Goyal, A., Ghosh, B., & Eveleigh, D. (1991). Characteristics of fungal cellulases. *Bioresource Technology*, *36*(1), 37–50.
- Gupta, D. P., & Heale, J. B. (1971). Induction of Cellulase (Cx) in *Verticillium albo-atrum*. *Journal of General Microbiology*, *63*, 163–173.
- Gupta, R., & Lee, Y. (2009). Mechanism of cellulase reaction on pure cellulosic substrates. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *102*, 1570–1581.
- Hamzei, E., & Pflug, W. (2007). Sorption and binding mechanism of polysaccharide cleaving soil enzymes by clay minerals. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *144*(5), 505–513.
- Haskå, G. (1981). Activity of bacteriolytic enzymes adsorbed to clays. *Microbial Ecology*, *7*(4), 331–341.
- Helm, C. V, Magalhães, W. L. E., de Lima, E. a, Silva, P. R., Hoffmann, K., Higa, A., & Mendes, D. (2011). Time influence in the enzymatic saccharification of cellulose pulp samples. *BMC Proceedings*, *5*(Suppl 7), P112. <http://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S7-P112>
- Henriksson, G., Gellerstedt, G., & Ek, M. (2009a). Pulp and Paper Chemistry and Technology. In *Wood Chemistry and Wood Technology*. Berlin: De Gruyter.
- Henriksson, G., Gellerstedt, G., & Ek, M. (2009b). Pulping Chemistry and Technology. In *Pulp and Paper Chemistry and Technology* (p. 474). Berlin: De Gruyter.

- Henriksson, H., Ståhlberg, J., Isaksson, R., & Pettersson, G. (1996). The active sites of cellulases are involved in chiral recognition: A comparison of cellobiohydrolase 1 and endoglucanase 1. *FEBS Letters*, 390(3), 339–344.
- Heredia, A., Jiménez, A., & Guillén, R. (1995). Composition of plant cell walls. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung*, 200(1), 24–31.
- Hildén, L., & Johansson, G. (2004). Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnology Letters*, 26(22), 1683–1693.
- Huang, L. K., & Mahoney, R. R. (1999). Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. *Journal of Applied Microbiology*, 86(1), 145–156.
<http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00645.x>
- Ingesson, H., Zacchi, G., Yang, B., Esteghlalian, A. R., & Saddler, J. N. (2001). The effect of shaking regime on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Journal of Biotechnology*, 88, 177–182.
- Jäger, G., Girfoglio, M., Dollo, F., Rinaldi, R., Bongard, H., Commandeur, U., ... Büchs, J. (2011). How recombinant swollenin from *Kluyveromyces lactis* affects cellulosic substrates and accelerates their hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), 33.
- Jeya, M., Joo, A. R., Lee, K. M., Tiwari, M. K., Lee, K. M., Kim, S. H., & Lee, J. K. (2010). Characterization of beta-glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5), 1473–1484.
- Joo, A.-R., Jeya, M., Lee, K.-M., Lee, K.-M., Moon, H.-J., Kim, Y.-S., & Lee, J.-K. (2010). Production and characterization of β -1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*. *Process Biochemistry*, 45(6), 851–858.
- Jørgensen, H., Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F., & Olsson, L. (2003). Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 851–861.
- Jørgensen, H., Kutter, J. P., & Olsson, L. (2003). Separation and quantification of cellulases and hemicellulases by capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 317, 85–93.
- Jørgensen, H., Mørkeberg, A., Krogh, K. B. R., & Olsson, L. (2004). Growth and enzyme production by three *Penicillium* species on monosaccharides. *Journal of Biotechnology*, 109, 309–313.
- Jørgensen, H., Mørkeberg, A., Krogh, K. B. R., & Olsson, L. (2005). Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: Effect of substrate and evaluation of cellulase

- adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 42–48.
- Jørgensen, H., & Olsson, L. (2006). Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 381–390.
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2012). Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1219–1227.
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, 188–203.
- Kang, K., Wang, S., Lai, G., Liu, G., & Xing, M. (2013). Characterization of a novel swollenin from *Penicillium oxalicum* in facilitating enzymatic saccharification of cellulose. *BMC Biotechnology*, 13(1), 42.
- Kang, L., Wang, W., & Lee, Y. Y. (2010). Bioconversion of kraft paper mill sludges to ethanol by SSF and SSCF. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161(1-8), 53–66.
- Kang, L., Wang, W., Pallapolu, V., & Lee, Y. (2011). Enhanced ethanol production from de-ashed paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation and simultaneous saccharification and co-fermentation. *BioResources*, 6, 3791–3808.
- Karmakar, M., & Ray, R. r. (2011). Current trends in research and application of microbial cellulases. *Journal of Microbiology*, 6(1), 41–53.
- Kaur, A., & Chadha, B. S. (2015). *Penicillium janthinellum* : a Source of Efficient and High Levels of β -Glucosidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(2), 937–949.
- Kemppainen, K., Ranta, L., Sipilä, E., Östman, A., Vehmaanperä, J., Puranen, T., ... von Weymarn, N. (2012). Ethanol and biogas production from waste fibre and fibre sludge – The FibreEtOH concept. *Biomass and Bioenergy*, 46, 60–69.
- Kim, I. J., Lee, H. J., Choi, I. G., & Kim, K. H. (2014). Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 8469–8480.
- Kim, Y. H., Cho, N. C., Choi, W. K., Kim, K. H., Chun, S. B., Lee, Y. K., & Chung, K. C. (1992). *Penicillium verruculosm* Endo- β -1,4-Glucanase 의 정제 및 특성. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, 25(2), 95–100.
- Kirk, O., Torben V., B., & Fuglsang, C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345–351.

- Ko, J.-A., Ryu, Y. B., Kwon, H.-J., Jeong, H. J., Park, S.-J., Kim, C. Y., ... Kim, Y.-M. (2013). Characterization of a novel steviol-producing β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and optimal production of the steviol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(18), 8151–8161.
- Kongruang, S., Han, M. J., Breton, C. I. G., & Penner, M. H. (2004). Quantitative Analysis of Cellulose-Reducing Ends. In M. Finkelstein & B. H. Davison (Eds.), *Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO* (Vol. 113–116, pp. 213–231). Breckenridge, CO: Humana Press.
- Krogh, K. B. R., Mørkeberg, A., Jørgensen, H., Frisvad, J. C., & Olsson, L. (2004). Screening Genus *Penicillium* for Producers of Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes. In M. Finkelstein, J. D. McMillan, B. H. Davison, & B. Evans (Eds.), *Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003* (pp. 389–401). Breckenridge, CO: Humana Press.
- Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*, 2011, 280696.
- Ladisch, M. R., Lin, K. W., Voloch, M., & Tsao, G. T. (1983). Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 5, 82–102.
- Lammirato, C., Miltner, A., Wick, L. Y., & Kästner, M. (2010). Hydrolysis of cellobiose by β -glucosidase in the presence of soil minerals - Interactions at solid-liquid interfaces and effects on enzyme activity levels. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2203–2210.
- Lark, N., Xia, Y., Qin, C. G., Gong, C. S., & Tsao, G. T. (1997). Production of ethanol from recycled paper sludge using cellulase and yeast, *Kluyveromyces marxianus*. *Biomass and Bioenergy*, 12(2), 135–143.
- Lee, K.-M., Jeya, M., Joo, A.-R., Singh, R., Kim, I.-W., & Lee, J.-K. (2010). Purification and characterization of a thermostable endo- β -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(3), 206–211.
- Liao, H., Fan, X., Mei, X., Wei, Z., Raza, W., Shen, Q., & Xu, Y. (2015). Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification. *Biomass and Bioenergy*, 74, 122–134.
- Lin, Y., Wang, D., & Wang, T. (2012). Ethanol production from pulp & paper sludge and monosodium glutamate waste liquor by simultaneous saccharification and fermentation in batch condition. *Chemical Engineering Journal*, 191, 31–37.

- Lozzi, I., Pucci, a., Pantani, O. L., D'Acqui, L. P., & Calamai, L. (2008). Interferences of suspended clay fraction in protein quantitation by several determination methods. *Analytical Biochemistry*, *376*(1), 108–114. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2008.01.040>
- Lu, J., Reye, J., & Banerjee, S. (2010). Temperature dependence of cellulase hydrolysis of paper fiber. *Biomass and Bioenergy*, *34*(12), 1973–1977.
- Luciano S., M. H., Rau, M., Pinto da Silva Bon, E., & Andraus, J. (2012). A simple and fast method for the determination of endo- and exo-cellulase activity in cellulase preparations using filter paper. *Enzyme and Microbial Technology*, *51*(5), 280–285.
- Lynd, L. R., Lyford, K., South, C. R., Walsum, P. Van, & Levenson, K. (2001). Evaluation of paper sludge for amenability to enzymatic hydrolysis and conversion to ethanol. *Tappi Journal Peer Reviewed Paper*, *84*(February), 50–55.
- Ma, T., Kosa, M., & Sun, Q. (2014). Fermentation to bioethanol/biobutanol. In A. J. Ragauskas (Ed.), *Materials for biofuels* (pp. 155–190). Singapore: EBSCO Publishing.
- Madrid, L. M., & Quintero, J. C. (2011). Ethanol production from paper sludge using *Kluyveromyces marxianus* Producción de etanol de lodos papeleros usando *Kluyveromyces marxianus*, 185–191.
- Mahmood, T., & Elliott, A. (2006). A review of secondary sludge reduction technologies for the pulp and paper industry. *Water Research*, *40*, 2093–2112.
- Maki, M., Leung, K., & Qin, W. (2009). The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int J Biol Sci*, *5*, 500–516.
- Mandelc, S., & Javornik, B. (2015). The secretome of vascular wilt pathogen *Verticillium albo-atrum* in simulated xylem fluid. *Proteomics*, *15*(4), 787–797.
- Marjamaa, K., Toth, K., Bromann, P. A., Szakacs, G., & Kruus, K. (2013). Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics. *Enzyme and Microbial Technology*, *52*(6-7), 358–369.
- Marques, S., Alves, L., Roseiro, J. C., & Gírio, F. M. (2008). Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. *Biomass and Bioenergy*, *32*(5), 400–406.
- Martins, L. F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, a. J. P., & Ramos, L. P. (2008). Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource Technology*, *99*, 1417–1424.
- McQueen, S., Durachko, D., & Cosgrove, D. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell Online*, *4*(11), 1425–1433.

- Mendez, L. M. (2015). *Obtención de hidrofobinas a partir de hongos filamentosos aislados de residuos agroindustriales de plátano (Musa AAB Simmonds). Proyecto de investigación*. Universidad de La Sabana.
- Merino, S. T., & Cherry, J. (2007). Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108(June), 95–120.
- Meyer, M. P., & Canevascini, G. (1981). Separation and some properties of two intracellular b-glucosidase of *Sporotrichum thermophile*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 924–931.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(III), 426–428. <http://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Ministerio de protección social. (2006). Matrices de priorización. Retrieved from [http://mps1.minproteccionsocial.gov.co/evtmedica/linea 3.1/2.4matrices.html](http://mps1.minproteccionsocial.gov.co/evtmedica/linea%203.1/2.4matrices.html)
- Mohagheghi, A., Tucker, M., Grohmann, K., & Wyman, C. (1992). High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 33(2), 67–81.
- Monte, M. C., Fuente, E., Blanco, A., & Negro, C. (2009). Waste management from pulp and paper production in the European Union. *Waste Management (New York, N.Y.)*, 29(1), 293–308.
- Mora, S., & Banerjee, S. (2013). Economics of the hydrolysis of cellulosic sludge to glucose. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(8), 1039–42.
- Moreno, M. L. O., & Vélez, D. U. (2010). Determinación De La Actividad Lignocelulolítica En Sustrato Natural De Aislamientos Fúngicos Obtenidos De Sabana De Pastoreo Y De Bosque Secundario De Sabana Inundable Tropical. *Ciencia Del Suelo*, 28(2), 169–180.
- Morozova, V. V., Gusakov, A. V., Andrianov, R. M., Pravilnikov, A. G., Osipov, D. O., & Sinitsyn, A. P. (2010). Cellulases of *Penicillium verruculosum*. *Biotechnology Journal*, 5(8), 871–880.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. D. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673–686.
- Nevalainen, H., & Penttilä, M. (1995). Molecular Biology of Cellulolytic Fungi. In P. A. Lemke & K. Esser (Eds.), *Genetics and Biotechnology* (pp. 303–319). Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH.
- Nieves, R. a, Ehrman, C. I., Adney, W. S., Elander, R. T., & Himmel, M. E. (1998). Technical Communication: survey and analysis of commercial cellulase preparation suitable for biomass

- conversion to ethanol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *14*, 301–304.
- Nobel, P. S. (2005). *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. (D. Dreibelbis & K. Sonnack, Eds.) (3rd ed.). Amsterdam: Elsevier. Academic Press.
- Novo, M., Pomar, F., Gayoso, C., & Merino, F. (2006). Cellulase Activity in Isolates of *Verticillium dahliae* Differing in Aggressiveness. *Plant Disease*, *90*(2), 155–160.
- Novozymes. (2010). *Cellic CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials*. Denmark.
- Pallardy, S. G., & Kozlowski, T. T. (2008). *Physiology of Woody Plants* (3rd ed.). Amsterdam: Elsevier.
- Pan, X., Xie, D., Gilkes, N., Gregg, D., & Saddler, J. (2005). Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *1*, 1069–1079.
- Peng, L., & Chen, Y. (2011). Conversion of paper sludge to ethanol by separate hydrolysis and fermentation (SHF) using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*, *35*(4), 1600–1606.
- Philippidis, G. P., Smith, T. K., & Wyman, C. E. (1993). Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Biotechnology and Bioengineering*, *41*(9), 846–853.
- Philippidis, G. P., Spindler, D. D., & Wyman, C. W. (1992). Mathematical modeling of cellulose conversion to ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *34/35*, 543–556.
- Phitsuwan, P., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., Kyu, K., & Ratanakhanokchai, K. (2013). Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. *Folia Microbiologica*, *58*(2), 163–176.
- Picart, P., Diaz, P., & Pastor, F. I. J. (2007). Cellulases from two *Penicillium* sp. strains isolated from subtropical forest soil: Production and characterization. *Letters in Applied Microbiology*, *45*(1), 108–113.
- Pol, D., Laxman, R. S., & Rao, M. (2012). Purification and biochemical characterization of endoglucanase from *Penicillium pinophilum* MS 20. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, *49*, 189–194.
- Prasetyo, J., Naruse, K., Kato, T., Boonchird, C., Harashima, S., & Park, E. Y. (2011). Bioconversion of paper sludge to biofuel by simultaneous saccharification and fermentation using a cellulase of paper

- sludge origin and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* TJ14. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), 35.
- Pulido, C. (2013). *Caracterización bioquímica del extracto de enzimas celulolíticas obtenidas a partir de microorganismos celulolíticos provenientes los desechos sólidos agroindustriales (cáscaras de banana y residuos de madera) para la producción de bioetanol*. Universidad de La Sabana.
- Ragauskas, A. J. (2014). Materials for biofuels. In *Materials and Energy* (p. 340). Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- Ramani, G., Meera, B., Vanitha, C., Rao, M., & Gunasekaran, P. (2012). Production, Purification, and Characterization of a β -Glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(5), 959–972.
- Ramos, L., Breuil, C., & Saddler, J. (1993). The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 19–25.
- Roche, C. M., Dibble, C. J., Knutsen, J. S., Stickel, J. J., & Liberatore, M. W. (2009). Particle concentration and yield stress of biomass slurries during enzymatic hydrolysis at high-solids loadings. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(2), 290–300.
- Runge, T., & Zhang, C. (2013). Hemicellulose extraction and its effect on pulping and bleaching. *Tappi Journal*, 12(10), 45–52.
- Sakata, M., Ooshima, H., & Harano, Y. (1985). Effects of agitation on enzymatic saccharification of cellulose. *Biotechnology Letters*, 7(9), 689–694.
- Saksirirat, W., & Hoppe, H. H. (1991). Secretion of Extracellular Enzymes By *Verticillium-Psalliotae* Treschow and *Verticillium-Lecanii* (Zimm) Viegas During Growth on Uredospores of the Soybean Rust Fungus (*Phakopsora-Pachyrhizi* Syd) in Liquid Cultures. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift*, 131(2), 161–173.
- Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyysönen, E., ... Penttilä, M. (2002). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry*, 269(17), 4202–4211.
- Samaniuk, J. R., Tim Scott, C., Root, T. W., & Klingenberg, D. J. (2011). The effect of high intensity mixing on the enzymatic hydrolysis of concentrated cellulose fiber suspensions. *Bioresource Technology*, 102(6), 4489–4494.
- Santos, J. R. A., Lucena, M. S., Gusmão, N. B., & Gouveia, E. R. (2012). Optimization of ethanol

- production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 in simultaneous saccharification and fermentation of delignified sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, 36, 584–588.
- Schwarz, W. H. (2012). The cellulases and their application in degrading agro- industrial waste. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4(1), 6–13.
- Selby, K., & Maitland, G. C. (1965). Protein expression and purification. *Biochemical Journal*, 94, 578.
- Shi, Y., Xu, X., & Zhu, Y. (2009). Optimization of *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(5), 921–7.
- Shuangqi, T., Zhenyu, W., Ziluan, F., Lili, Z., & Jichang, W. (2011). Determination methods of cellulase activity. *African Journal of Biotechnology*, 10(37), 7122–7125.
- Silva, P., Magalhães, W., Helm, C., Lima, E., Mendes, D., & Lima, T. (2011). *Evaluation of the enzymatic digestibility of paper industry byproducts*. *BMC Proceedings* (Vol. 5). BioMed Central Ltd.
- Sims, R. E. H., Mabeeb, W., Saddler, J. N., & Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, 101(6), 1570–1580.
- Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2007). Improved Cellulase Production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF Through Process Optimization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142(1), 60–70.
- Skomarovskii, a a, Markov, a V, Gusakov, a V, Kondrat'eva, E. G., Okunev, O. N., Bekkerevich, a O., ... Sinitsyn, a P. (2006). New cellulases efficiently hydrolyzing lignocellulose pulp. *Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiia*, 42(6), 674–680.
- Skomarovsky, a. a., Gusakov, a. V., Okunev, O. N., Solov'eva, I. V., Bubnova, T. V., Kondrat'eva, E. G., & Sinitsyn, a. P. (2005). Studies of hydrolytic activity of enzyme preparations of *Penicillium* and *Trychoderma* fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(2), 182–184.
- Soucy, J., Koubaa, A., Migneault, S., & Riedl, B. (2014). The potential of paper mill sludge for wood–plastic composites. *Industrial Crops and Products*, 54, 248–256.
- Souza, A. L. de, Pimentel, P. S. S. R., Andrade, E. V. de, Astolfi-Filho, S., & Nunes-Silva, C. G. (2013). Purification of endoglucanase produced by *Penicillium citrinum* isolated from Amazon. Florianópolis, Brazil.
- Stålbrand, H., Mansfield, S. D., Saddler, J. N., Kilburn, D. G., Warren, R. a, & Gilkes, N. R. (1998). Analysis of molecular size distributions of cellulose molecules during hydrolysis of cellulose by

- recombinant *Cellulomonas fimi* beta-1,4-glucanases. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2374–2379.
- Stirling, D. (2000). Biometric CAST e-book. Retrieved March 10, 2016, from http://cast.massey.ac.nz/collection_public.html
- Sun, Q. (2014). Enzymatic deconstruction of lignocellulose to fermentable sugars. In A. J. Ragauskas (Ed.), *Materials for biofuels* (pp. 127–154). Singapore: World Scientific Publishing Company.
- Sun, X., Liu, Z., Zheng, K., Song, X., & Qu, Y. (2008). The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 560–567.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83, 1–11.
- Taiz, L., Zeiger, E., Blat Egea, B., García Agustín, P., & González Nebauer, SergioFlors Herrero, V. (2006). *Fisiología vegetal. Vol. 2*. Castellón de la Plana: Universitat Jaume I.
- Teeri, T. T. (1997). Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, 15(5), 160–167.
- Teeri, T. T., Reinikainen, T., Ruohonena, L., Jonesb, T. A., & Knowlesa, J. (1992). Domain function in *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases. *Journal of Biotechnology*, 24(2), 169–176.
- Tishkov, V. I., Gusakov, A. V., Cherkashina, A. S., & Sinitsyn, A. P. (2013). Engineering the pH-optimum of activity of the GH12 family endoglucanase by site-directed mutagenesis. *Biochimie*, 95, 1704–1710.
- Varga, E., Szengyel, Z., & Réczey, K. (2002). Chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98-100(1), 73–87.
- Vázquez, C., Sellek, R., & Fernández, N. (1992). Enzimas que degradan paredes vegetales en *Fusarium oxysporum*. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 18, 693–698.
- Velson, J. (2014). Biofuels. Retrieved November 15, 2015, from www.quora.com
- Villadsen, J., Nielsen, J., & Lidén, G. (2011). *Bioreaction Engineering Principles* (Third Edit). New York.
- Volkov, P. V., Rozhkova, A. M., Gusakov, A. V., & Sinitsyn, A. P. (2014). Homologous cloning, purification and characterization of highly active cellobiohydrolase I (Cel7A) from *Penicillium canescens*. *Protein Expression and Purification*, 103, 1–7.

- Wajima, T., Haga, M., Kuzawa, K., Ishimoto, H., Tamada, O., Ito, K., ... Rakovan, J. F. (2006). Zeolite synthesis from paper sludge ash at low temperature (90 degrees C) with addition of diatomite. *Journal of Hazardous Materials*, 132(2-3), 244–52.
- Walpole, R. (1999). *Probabilidad y Estadística para ingenieros* (6th ed.). Mexico: Prentice-Hall Hispanoamericana S.A.
- Wang, W., Kang, L., & Lee, Y. Y. (2010). Production of cellulase from kraft paper mill sludge by *Trichoderma reesei* rut C-30. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161(1-8), 382–94.
- Wang, W., Liu, J., Chen, G., Zhang, Y., & P., G. (2003). Function of a low molecular weight peptide from *Trichoderma pseudokoningii* S38 during cellulose biodegradation. *Current Microbiology*, 46(5), 0371–0379.
- Weitz, D. A., & Feldman, S. . (2012). Energías renovables para el desarrollo sostenible: Producción de Bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica en ambiente rural. *Revista Virtual Pro*, 122(3), 19.
- Wilson, D. B. (2009). Cellulases and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3), 295–299.
- Wilson, D. B. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 259–263. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.004>
- Wingren, A., Galbe, M., & Zacchi, G. (2003). Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of Bottlenecks. *Biotechnology Progress*, 19, 1109–1117.
- Wood, T. ., McCrae, S. I., & Macfarlane, C. C. (1980). The isolation, purification and properties of the cellobiohydrolase component of *Penicillium funiculosum* cellulase. *Biochemical Journal*, 189, 51–65.
- Wood, T. M. (1975). Properties and mode of action of cellulases. *Biotechnol Bioeng Symp*, 5, 111–133.
- Wu, Z., & Lee, Y. Y. (1997). Inhibition of the enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol. *Biotechnology Letters*, 19(10), 977–979.
- Yamashita, Y., Kurosumi, A., Sasaki, C., & Nakamura, Y. (2008). Ethanol production from paper sludge by immobilized *Zymomonas mobilis*. *Biochemical Engineering Journal*, 42(3), 314–319.
- Yang, T., Liu, J., Lin, Q., & Jiang, X. (2009). *Penicillium expansum* YT01: A Lignocellulose-Degrading Fungal Strain Isolated from China Gaoligong Mountain Humus Soil. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 3(4), 348–353.
- Young, D., & Pegg, G. (1982). The action of tomato and *Verticillium albo-atrum* glycosidases on the

- hyphal wall of *V. albo-atrum*. *Physiological Plant Pathology*, 21(3), 411–423.
- Yu, Z., Jameel, H., Chang, H.-M., & Park, S. (2011). The effect of delignification of forest biomass on enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 102(19), 9083–9.
- Zampieri, D., Guerra, L., Camassola, M., & Dillon, A. J. P. (2013). Secretion of endoglucanases and β -glucosidases by *Penicillium echinulatum* 9A02S1 in presence of different carbon sources. *Industrial Crops and Products*, 50, 882–886.
- Zhang, Y., Himmel, M., & Mielenz, J. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24(5), 452–481.
- Zhang, Y., Hong, J., & Ye, X. (2009). Cellulase Assays. In J. Mielenz (Ed.), *Methods in molecular biology* (Vol. 581, pp. 213–231). Clifton, N.J.: Humana Press.
- Zhang, Y., & Lynd, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(7), 797–824.
- Zhang, Y., & Lynd, L. R. (2005). Determination of the Number-Average Degree of Polymerization of Cellodextrins and Cellulose with Application to Enzymatic Hydrolysis. *Biomacromolecules*, 6(3), 1510–1515.
- Zhou, Q., Lv, X., Zhang, X., Meng, X., Chen, G., & Liu, W. (2011). Evaluation of swollenin from *Trichoderma pseudokoningii* as a potential synergistic factor in the enzymatic hydrolysis of cellulose with low cellulase loadings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1905–1910.
- Zor, T., & Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry*, 236(236), 302–308.

9 ANEXO A

a) Composición Medios de Cultivo y Solución salina para la producción del extracto enzimático por fermentación en medio sólido

Medio Mandel	
Reactivo	% p/v
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,14
KH ₂ PO ₄	0,2
CaCl ₂	0,03
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,02
Peptona	0,5
Extracto de Levadura	0,1
Urea	0,03
Tween 80	0,1
Solución salina	0,1

Solución salina	
Reactivo	mg/L
FeSO ₄ *7H ₂ O	5
MnSO ₄ *H ₂ O	1,6
ZnSO ₄ *7H ₂ O	1,4
CoCl ₂	2

AGAR CMC 1% (p/v)	
Reactivo	g/L
Carboximetilcelulosa (CMC)	10
Extracto de levadura	2,5
Peptona Universal	2,5
Sulfato de Amonio	0,5
Cloruro de calcio	0,5
Fosfato monobásico de potasio	0,1
Fosfato dibásico de potasio	0,1
Agar-agar	15

b) Composición medio de reacción para la hidrólisis y fermentación simultánea

Medio YP para SSF	
Extracto de levadura	1% (p/v)
Peptona (p/v)	2%
Buffer citrato de sodio 0.05M pH 4.0	
Fosfato diamónico	18mg/100 mL

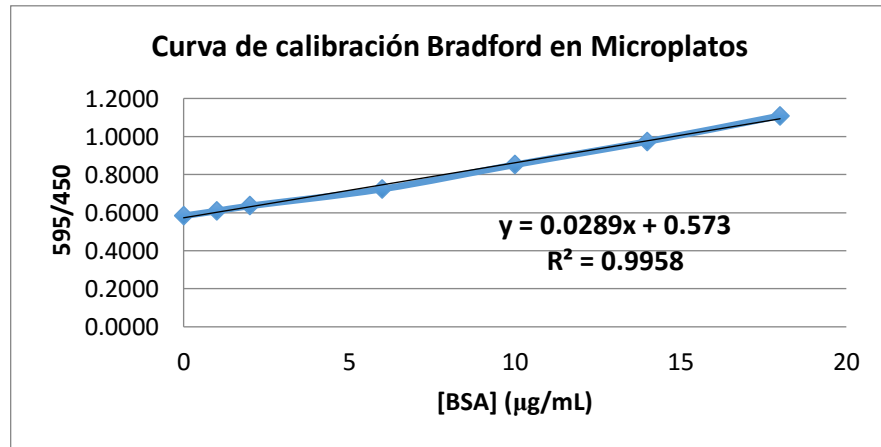
c) Curva de calibración para determinación de proteínas método Bradford modificado (Zor & Selinger, 1996)

EQUIPO:	iMark Microplate - Reader
Marca:	Biorad
Tiempo de reacción:	10 minutos
Patron:	Albúmina de suero bovino (BSA)

[BSA] (µg/mL)	λ = 595 nm			Abs prom	Abs-B
B	0.033	0.035	0.035	0.034	
0	0.211	0.192	0.195	0.199	0.165
1	0.202	0.192	0.191	0.195	0.161
2	0.197	0.191	0.203	0.197	0.163
6	0.23	0.216	0.216	0.221	0.186
10	0.251	0.242	0.247	0.247	0.212
14	0.255	0.259	0.259	0.258	0.223
18	0.287	0.292	0.278	0.286	0.251
20	0.319	0.297	0.287	0.301	0.267

[BSA] (µg/mL)	λ = 450 nm			Abs prom	Abs-B
B	0.044	0.036	0.043	0.044	
0	0.349	0.313	0.319	0.327	0.283
1	0.325	0.302	0.297	0.308	0.264
2	0.302	0.292	0.306	0.300	0.256
6	0.305	0.3	0.299	0.301	0.257
10	0.293	0.288	0.299	0.293	0.249
14	0.275	0.267	0.278	0.273	0.229
18	0.267	0.275	0.27	0.271	0.227
20	0.298	0.277	0.29	0.288	0.244

[BSA] (µg/mL)	595/450
0	0.5830
1	0.6086
2	0.6354
6	0.7241
10	0.8516
14	0.9738
18	1.1088
20	1.0914

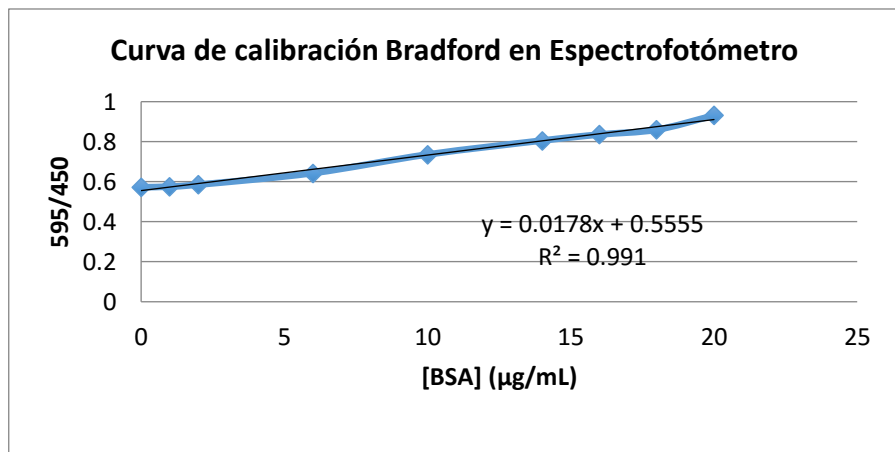


EQUIPO: Espectrofotómetro UV/VIS Lambda 35
Marca: Perkin Elmer
Tiempo de reacción: 30 minutos
 Albúmina de suero bovino
Patrón: (BSA)

[BSA] (µg/mL)	595 nm			Abs prom	Abs-B
B	0.000			0	
0	0.32	0.318	0.315	0.3177	0.3177
1	0.331	0.328	0.288	0.3157	0.3157
2	0.344	0.347	0.345	0.3453	0.3453
6	0.389	0.39	0.325	0.368	0.368
10	0.424	0.418	0.416	0.4193	0.4193
14	0.454	0.449	0.399	0.434	0.434
16	0.46	0.469	0.47	0.4663	0.4663
18	0.483	0.482	0.429	0.4647	0.4647
20	0.495	0.479	0.474	0.4827	0.4827

[BSA] (µg/mL)	450 nm			Abs prom	Abs-B
B	0.000			0	
0	0.562	0.554	0.549	0.555	0.555
1	0.546	0.553	0.547	0.5487	0.5487
2	0.582	0.593	0.595	0.59	0.59
6	0.596	0.591	0.53	0.5723	0.5723
10	0.562	0.576	0.571	0.5697	0.5697
14	0.564	0.549	0.503	0.5387	0.5387
16	0.564	0.563	0.547	0.558	0.558
18	0.566	0.556	0.499	0.5403	0.5403
20	0.554	0.493	0.508	0.5183	0.5183

[BSA] (µg/mL)	595/450
0	0.5724
1	0.5753
2	0.5853
6	0.643
10	0.7361
14	0.8057
16	0.8357
18	0.86
20	0.9312



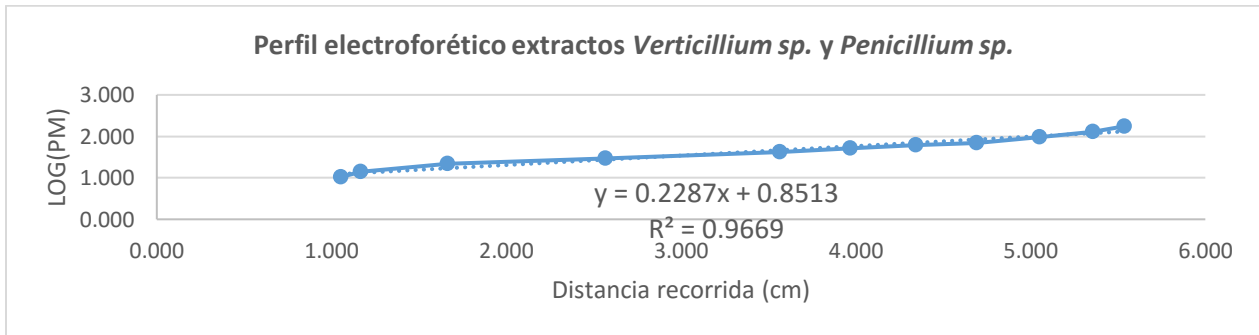
d) Perfiles electroforéticos SDS-PAGE de extractos enzimáticos

ELECTROFORESIS EXTRACTOS *Verticillium sp.* Y *Penicillium sp.*

Tabla 41. Distancias marcador para electroforesis de extractos *Verticillium sp.* y *Penicillium sp.*

Log10 PM	1.021	1.146	1.342	1.462	1.623	1.708	1.792	1.845	1.978	2.114	2.243
PM Marcador	10.5	14	22	29	42	51	62	70	95	130	175
Distancia marcador (cm)	1.055	1.166	1.665	2.567	3.566	3.969	4.344	4.690	5.051	5.356	5.537
PM: peso molecular											

Figura 24. Perfil electroforético (extracto *Verticillium sp.* y *Penicillium sp.*)



e) Curva de calibración para determinación de azúcares reductores por el método DNS

EQUIPO:	Espectrofotómetro UV/VIS Lambda 35
Marca:	Perkin Elmer
Tiempo de reacción:	5 minutos

Tabla 42. Datos de absorbancia de patrones - método de azúcares reductores

Muestra	[G] patron (mg/0.5mL)	[G] (g/L)	Abs.	(Abs - Blanco)
Sample216.Blank			0.0479	
0.05.Standard Replicate1	0.05	0.1	0.0845	0.0366
0.05.Standard Replicate2	0.05	0.1	0.0851	0.0372
0.05.Standard Replicate3	0.05	0.1	0.0847	0.0368
0.1.Standard Replicate1	0.1	0.2	0.1374	0.0895
0.1.Standard Replicate2	0.1	0.2	0.1366	0.0887
0.1.Standard Replicate3	0.1	0.2	0.1395	0.0916
0.5.Standard Replicate1	0.5	1	0.4433	0.3954
0.5.Standard Replicate2	0.5	1	0.4475	0.3996
0.5.Standard Replicate3	0.5	1	0.4408	0.3929
1.Standard Replicate1	1	2	1.0178	0.9699
1.Standard Replicate2	1	2	1.0563	1.0084
1.Standard Replicate3	1	2	1.0351	0.9872
1.5.Standard Replicate1	1.5	3	1.5696	1.5217
1.5.Standard Replicate2	1.5	3	1.5752	1.5273
1.5.Standard Replicate3	1.5	3	1.5619	1.514
2.Standard Replicate1	2	4	2.0497	2.0018
2.Standard Replicate2	2	4	2.0424	1.9945
2.Standard Replicate3	2	4	2.0395	1.9916
2.5.Standard Replicate1	2.5	5	2.4718	2.4239
2.5.Standard Replicate2	2.5	5	2.4231	2.3752
2.5.Standard Replicate3	2.5	5	2.473	2.4251

Figura 25. Curva de calibración azúcares reductores DNS

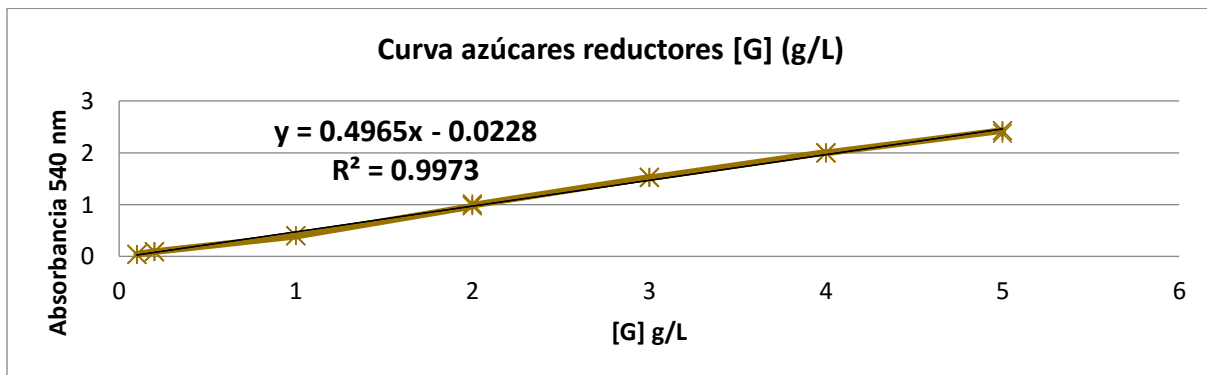
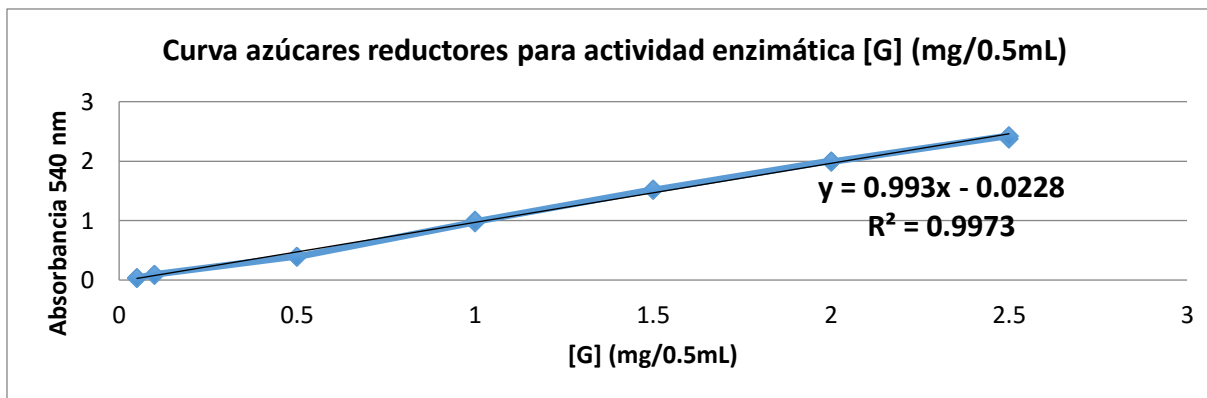
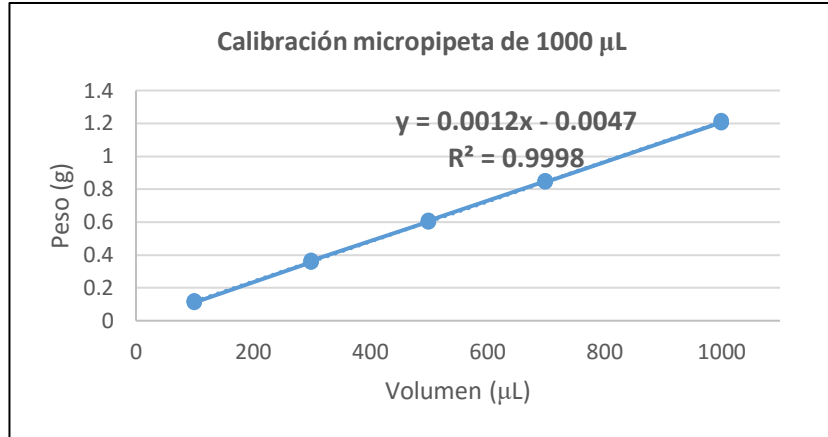


Figura 26. Curva de calibración azúcares reductores para actividad enzimática

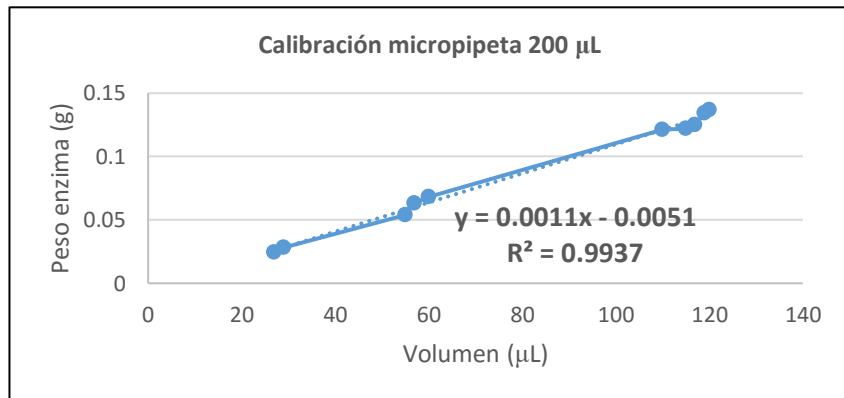


f) Calibración de micropipetas para adición de enzima comercial Cellic®

Micropipeta 1000 µL	
Vol Enzima	Peso (g)
100	0.1197
100	0.1178
100	0.1108
300	0.3553
300	0.3554
300	0.3666
500	0.6014
500	0.5988
500	0.6095
700	0.8491
700	0.8481
700	0.8434
1000	1.2058
1000	1.2021
1000	1.2167



Micropipeta 200 µL	
Volumen enzima (µL)	Peso (g)
27	0.0243
29	0.0283
55	0.0538
57	0.063
60	0.0682
110	0.1212
115	0.1221
117	0.1251
119	0.1344
120	0.1368

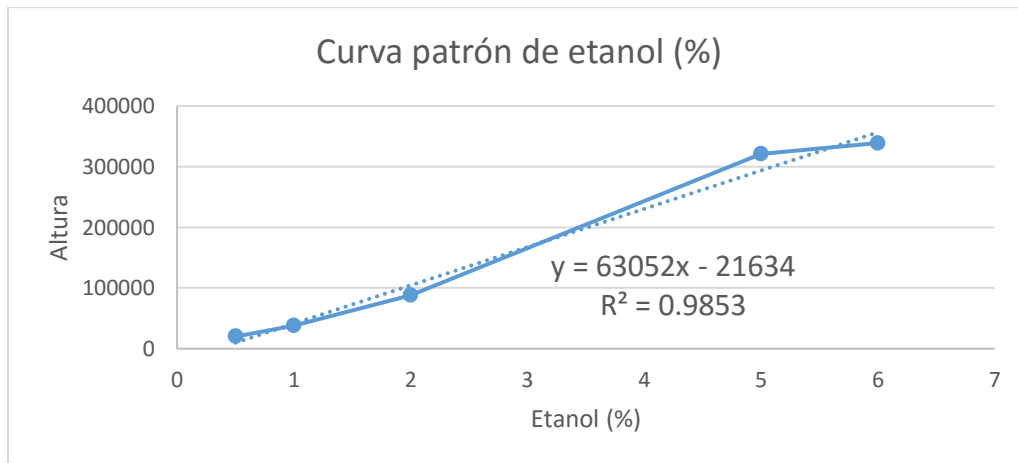


g) Curva patrón para determinación de etanol por cromatografía de gases

Tabla 43. Relación concentración de etanol y alturas para curva patrón

% ETOH (v/v)	Altura
0.5	20006.59
1	37639.96
2	88448.97
5	320970.297
6	339019.067

Figura 27. Curva patrón de etanol



10 ANEXO B

MÉTODOS Y RESULTADOS DE CARACTERIZACIÓN DEL SUSTRATO

a) T 203 Alfa, beta y gama celulosa en pulpa

- **Resultados T203**

Alfa, beta y gama celulosa

Estandarización FAS.

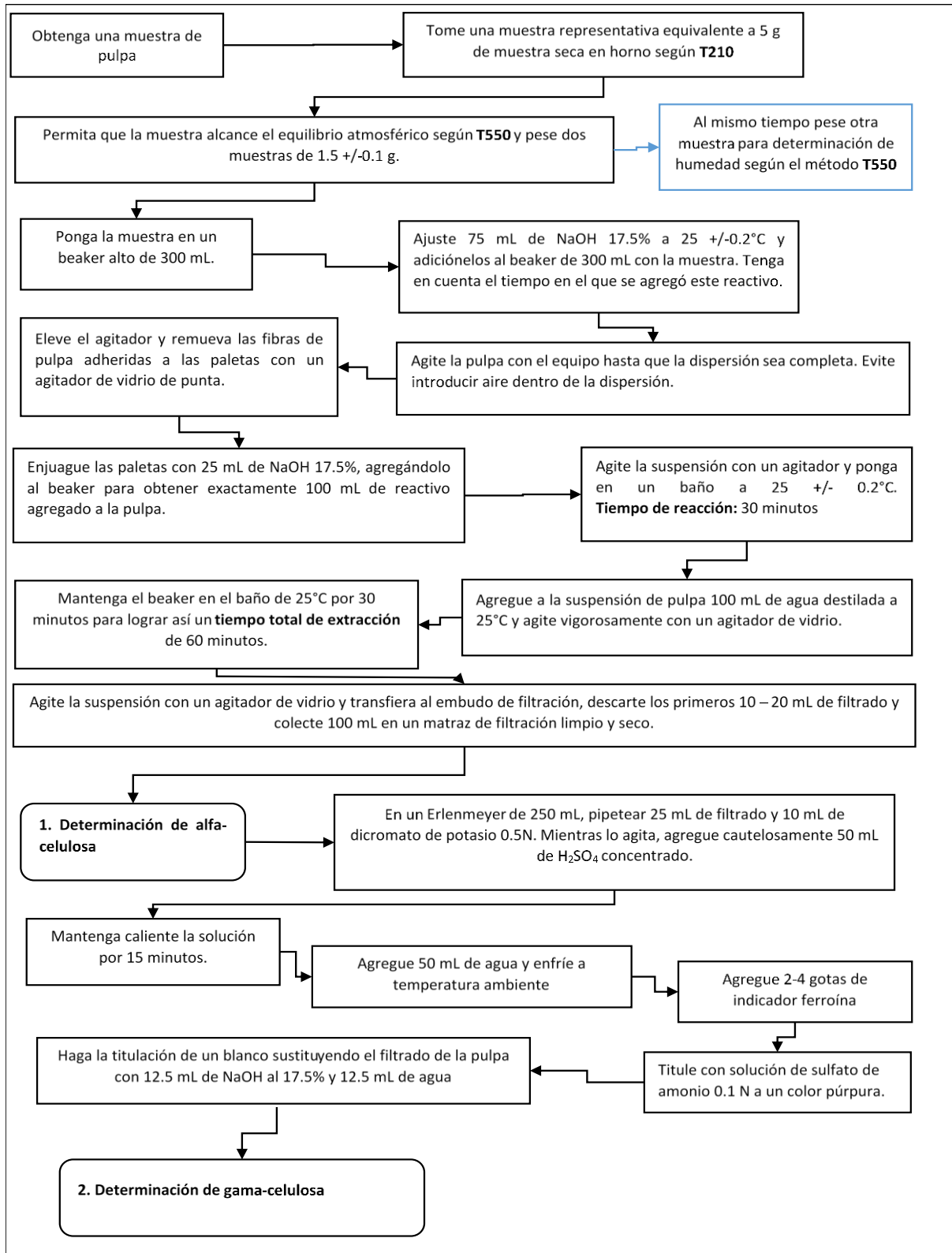
Cfas:	0.03452	N
-------	---------	---

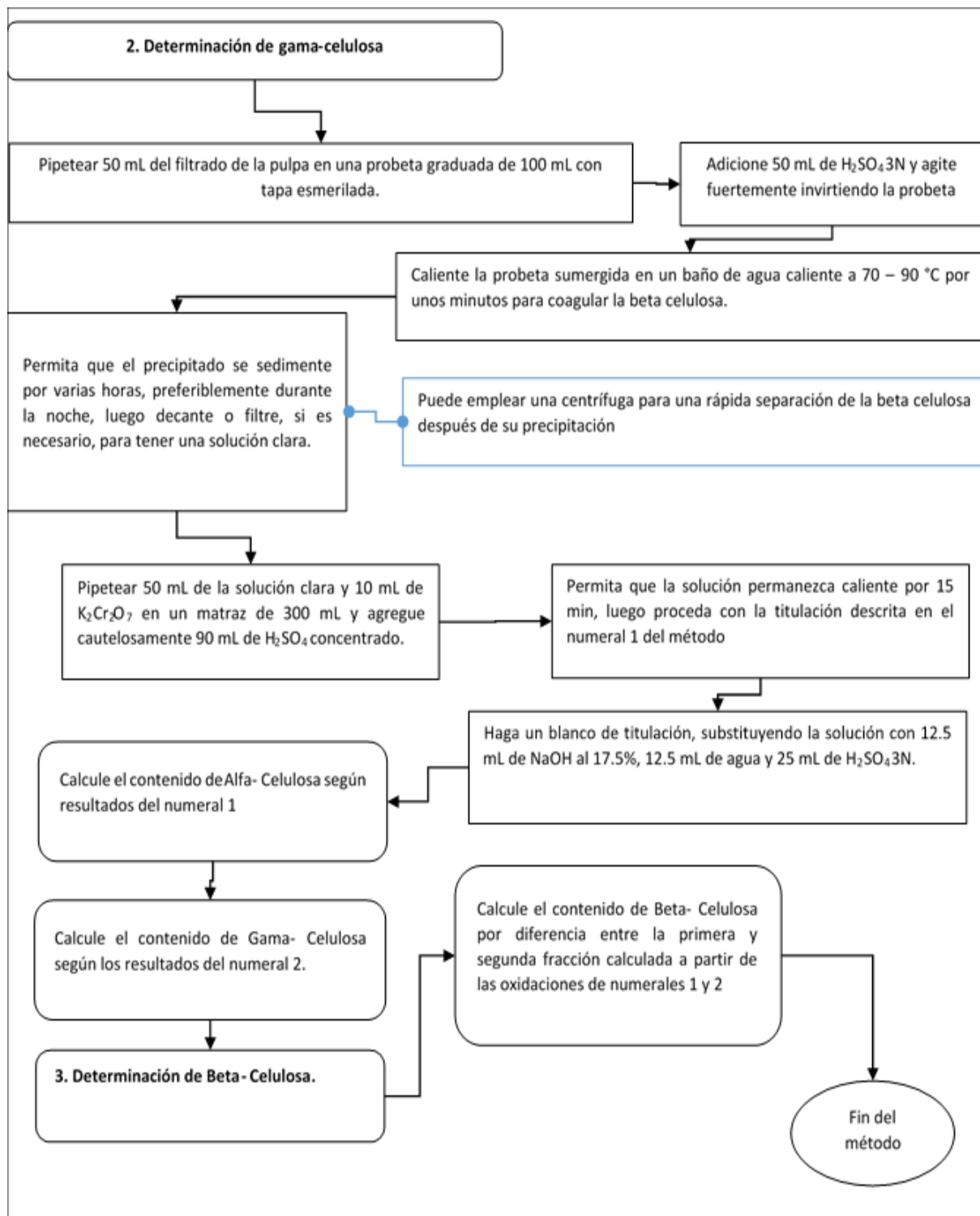
%H muestra

Wo:	30.1746
W1:	31.0844
W2:	30.7841
%H:	33%
A:	25

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Blanco (V2;V4)		
W1:	1.9808	1.6207	1.5798			
Peso seco (g):	1.50	1.23	1.20			
Vfas V1 (mL):	21	26.4	25.6	47.6	Promedio:	SD
%alfa-celulosa	51.63	51.71	48.81		50.72	1.65
V3	19.95	21.4	21.05	24.35	Promedio:	SD
%gama-celulosa	0.55	0.45	0.52		0.51	0.05
%beta-celulosa	47.81	47.84	50.67		48.77	1.64

FLUJOGRAMA T203



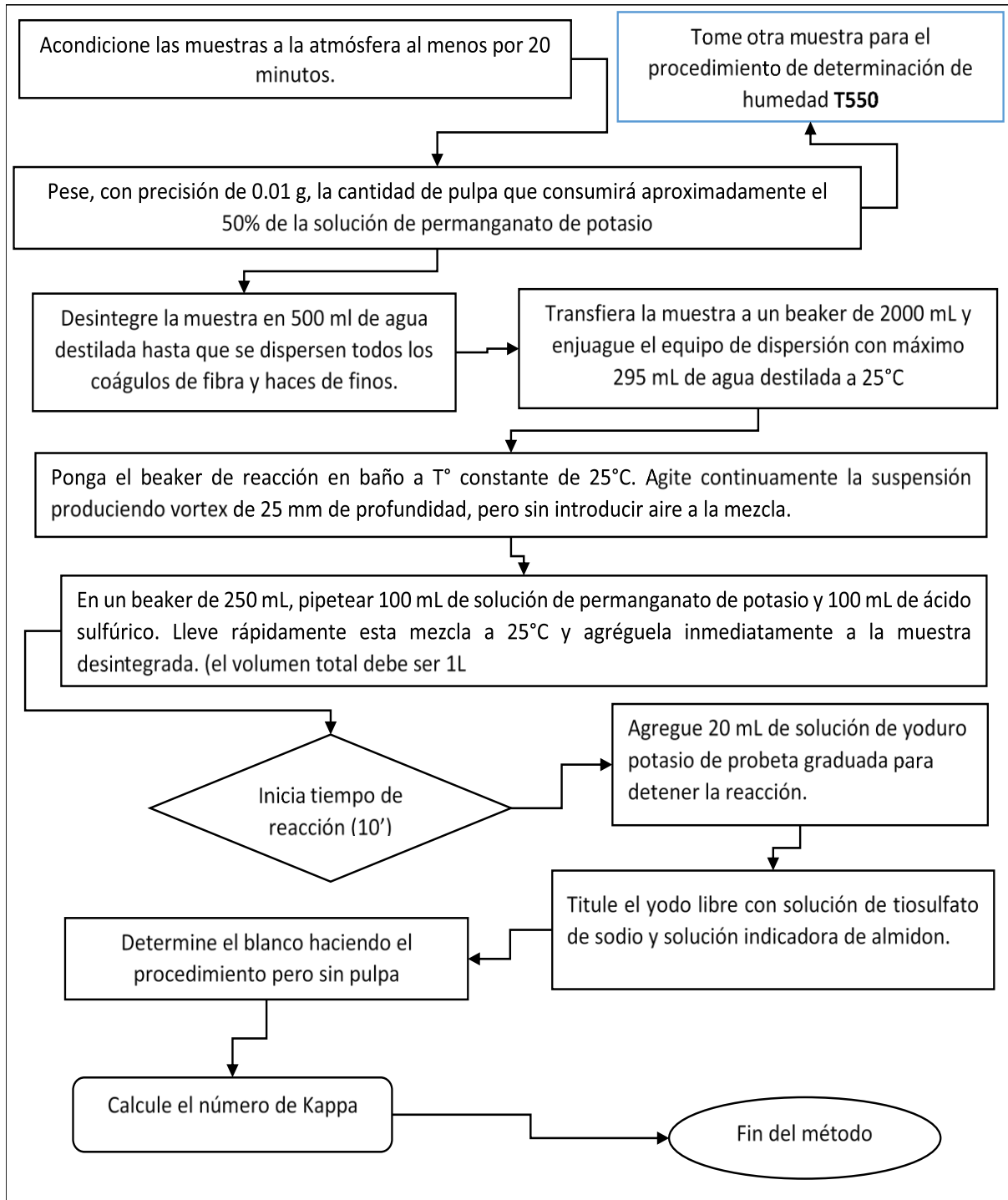


b) T236 Número Kappa de pulpa – Contenido de lignina

• **Resultados T236**

Muestra	1	2	3	Determinación de humedad	
				W0:	
Peso (g):	4.526	4.5216	4.5079		30.1749
Peso seco (g) w:	3.1382	3.1351	3.1256	W1:	31.1813
T° (°C)	25.8	25.3	25.0	W2:	30.8727
K:	25.1	24.7	18.2		
f:	1.044	1.044	1.023409	%H=	30.66%
p:	76.357422	74.384362	55.640292		
b:	79.1	79.1	79.1		
a:	40.4	41.4	50.9		
N:	0.197306	0.197306	0.197306	Promedio:	SD
% Lignina:	3.27	3.21	2.37	2.95	0.50287

FLUJOGRAMA T236



c) T204 Extractivos en solventes de pulpa y madera

• **Resultados T204**

Humedad de la muestras

W0:	30.1745
W1:	31.377
W2:	31.368

%H=	0.75%
-----	-------

Peso seco de muestras en dedales

Muestra	1	2	3
Dedal+muestra	12.4355	12.8816	12.7555
Tara dedal	2.7388	2.4668	2.35
Peso húmedo	9.6967	10.4148	10.4055
Peso seco (Wp)	9.6241	10.3369	10.3276

Extractivos en Etanol : Benceno

Muestra	1	2	3
Wp (g):	9.6241	10.3369	10.3276
W(ext+Plato) (g):	2.721	2.8155	2.879
Wplato (g):	2.2635	2.3259	2.3826
We (g):	0.4575	0.4896	0.4964
Wb (g):	0.1823		

Blanco E:B

W0:	121.9346	g
W1:	122.1169	g
Wb:	0.1823	g

				Promedio:	SD
Extractivos (E:B)	2.9%	4.7%	4.8%	4.1%	0.011

Extractivos en diclorometano

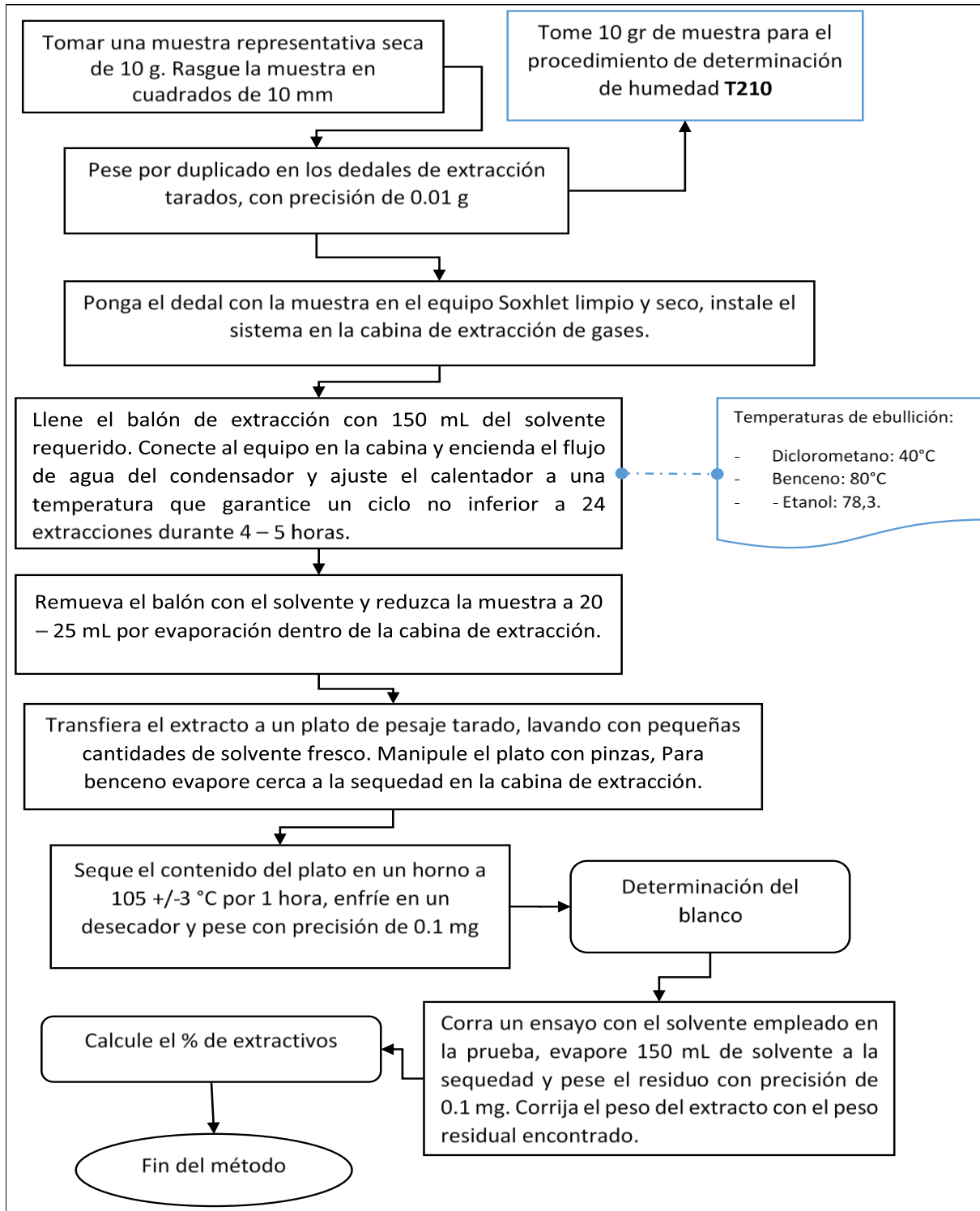
Muestra	1	2	3
Wp (g):	9.6241	10.3369	10.3276
W(ext+Plato) (g):	2.3885	2.389	2.2665
Wplato (g):	2.3828	2.3826	2.2618
We (g):	0.0057	0.0064	0.0047
Wb (g):	0.0016		

Blanco diclorometano

W0:	2.2613	g
W1:	2.2629	g
Wb:	0.0016	g

				Promedio:	SD
Extractivos (Dicl)	0.04%	0.06%	0.05%	0.05%	0.00010

FLUJOGRAMA T204



**d) T211. Determinación de cenizas en madera, pulpa, papel y cartón:
combustión a 525°C**

e) Resultados T211

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
W0	74.6272	69.0842	17.1150	17.6960	17.1149	17.6959	18.2635	18.2630
W1	78.7882	76.7830	19.8821	19.8891	20.7856	20.5289	21.8373	26.4119
W2	77.0197							
W3(525)	75.9073	71.5330	18.0618	18.4610	18.2524	18.5771	19.3762	21.1210

Peso humedo	4.1610	7.6988	2.7671	2.1931	3.6707	2.8330	3.5738	8.1489
Peso seco	2.3925	4.4474	1.4510	1.1500	1.9247	1.4855	1.8739	4.6671
Peso cenizas (525)	1.2801	2.4488	0.9468	0.7650	1.1375	0.8812	1.1127	2.8580
%H	42.50%	42.23%	47.56%	47.56%	47.57%	47.57%	47.57%	42.73%
%cenizas (525)	53.50%	55.06%	65.25%	66.52%	59.10%	59.32%	59.38%	61.24%

Cálculos humedad	PS 1	PS2	PS2	PS3	PS3	PS3	PS4
W0	30.1747	30.1743	30.1743	30.1742	30.1742	30.1742	30.4749
W1	33.9291	35.1083	35.1083	32.6722	32.6722	32.6722	33.6183
W2	32.3435	32.7616	32.7616	31.484	31.484	31.484	32.2752

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
%cenizas (525)	53.50%	55.06%	65.25%	66.52%	59.10%	59.32%	59.38%	61.24%

	Promedio	DS
% Cenizas 525	59.92%	0.04

M: Muestra

W0: Peso crisol tarado

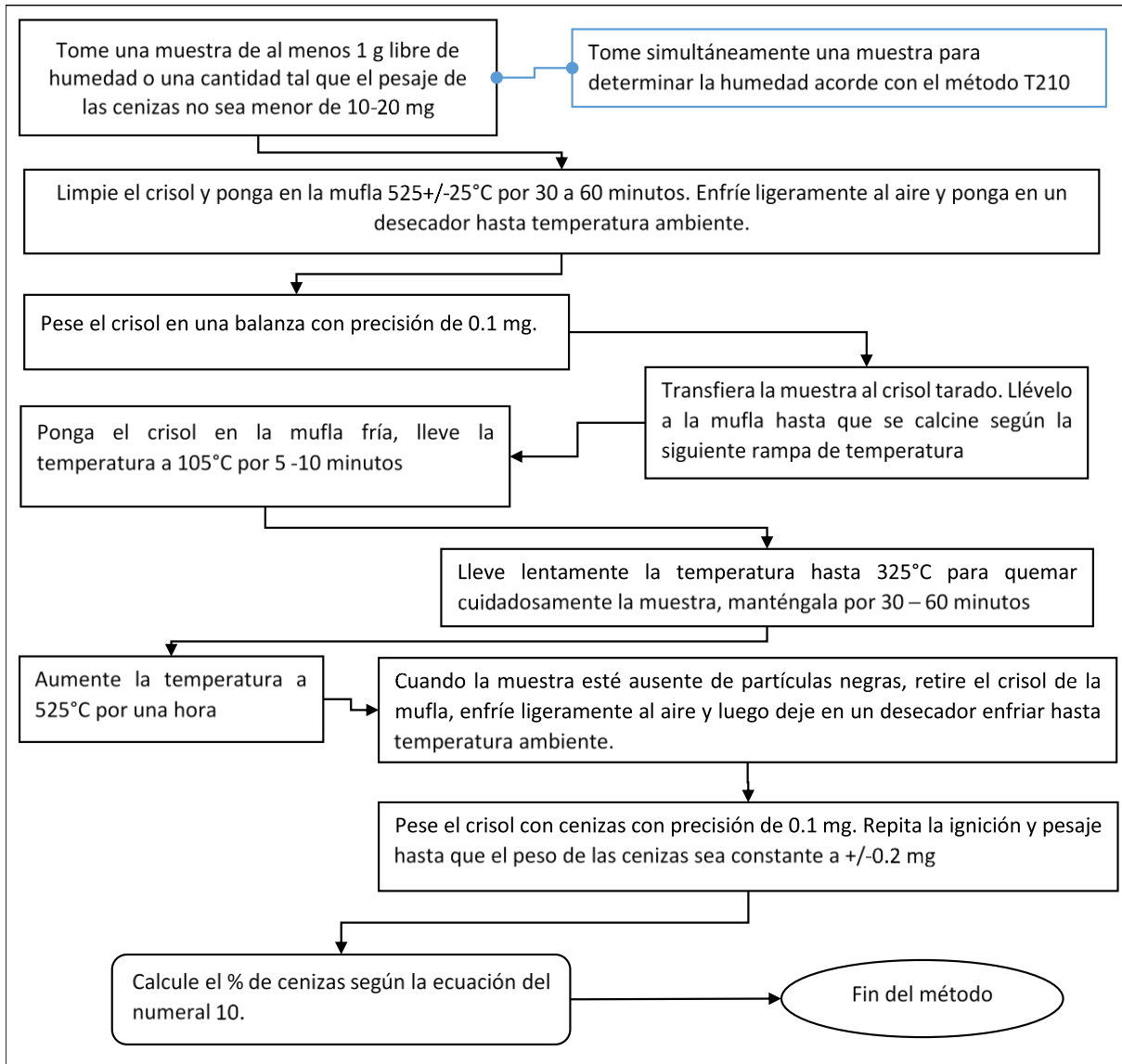
W1: Peso crisol con muestra húmeda

W2: Peso crisol con muestra seca a 105°C

W3: Peso cenizas a 525°C

PS: Pesa sustancias

FLUJOGRAMA T211



f) **T413. Determinación de cenizas en madera, pulpa, papel y cartón:
combustión a 900°C**

• **Resultados T413**

	M1	M2	M4	M6	M7	M8
W0	74.6272	69.0842	17.6960	17.1149	17.6959	18.2635
W1	78.7882	76.7830	19.8891	20.7856	20.5289	21.8373
W4(900)	75.4961	70.6992	18.2032	17.8580	18.2721	18.9894

Peso humedo	4.1610	7.6988	2.1931	3.6707	2.8330	3.5738
Peso seco	2.3925	4.4474	1.1500	1.9247	1.4855	1.8739
Peso cenizas (900)	0.8689	1.6150	0.5072	0.7431	0.5762	0.7259
%H	42.50%	42.23%	47.56%	47.57%	47.57%	47.57%
%cenizas (900)	36.32%	36.31%	44.10%	38.61%	38.79%	38.74%
Relacion cenizas (900/525)	68%	66%	66%	65%	65%	65%

Cálculos humedad	PS1	PS2	PS3	PS3	PS3
W0	30.1747	30.1743	30.1742	30.1742	30.1742
W1	33.9291	35.1083	32.6722	32.6722	32.6722
W2	32.3435	32.7616	31.484	31.484	31.484

M: Muestra

W0: Peso crisol tarado

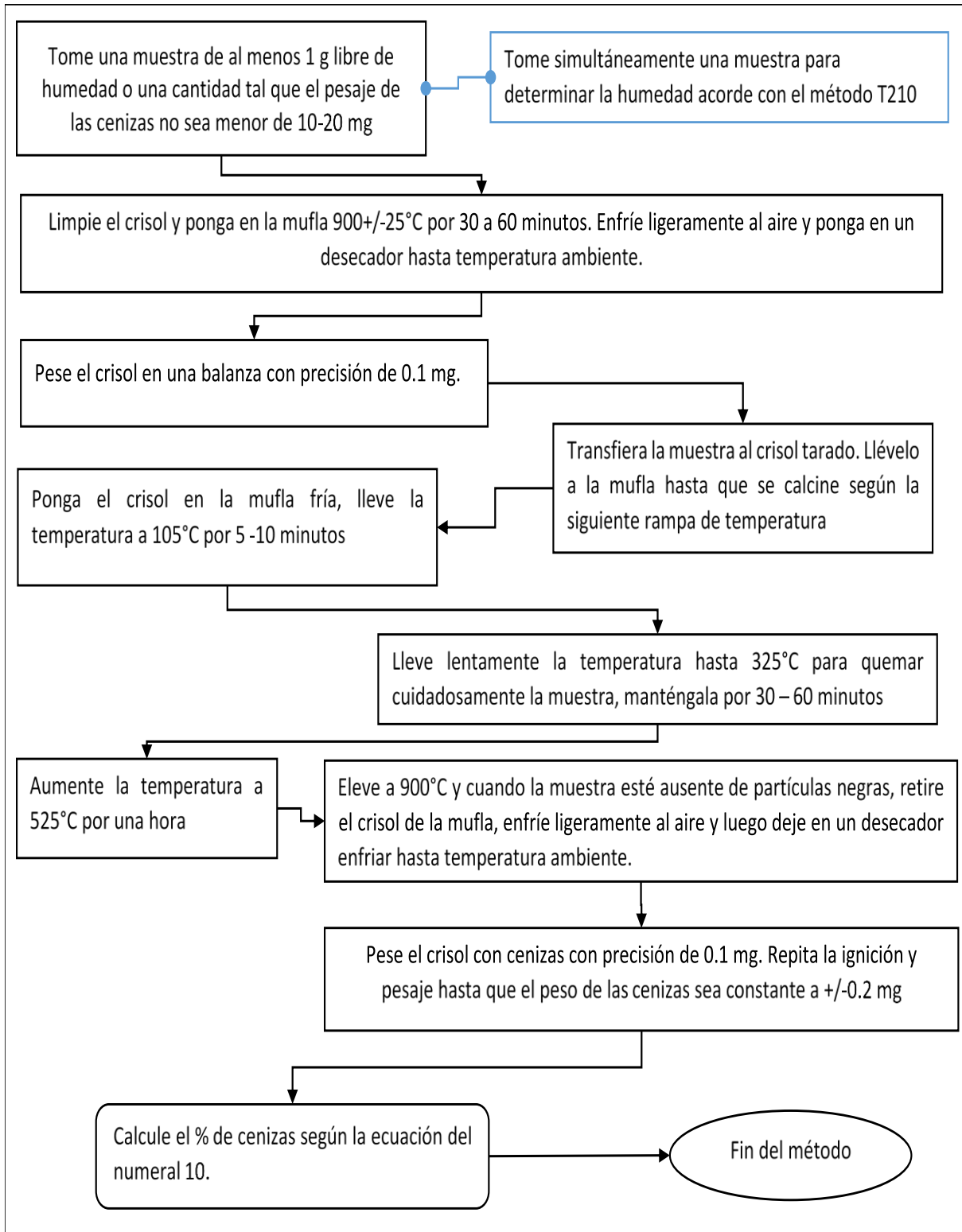
W1: Peso crisol con muestra húmeda

W2: Peso crisol con muestra seca a 105°C

W4: Peso cenizas a 900°C

PS: Pesa sustancias

FLUJOGRAMA T413



g) Ensayo de adsorción en cenizas y lodo

# M	Muestra	Peso seco (g)	Peso húmedo (g)
1	Blanco proteína	0	0
2	Blanco proteína	0	0
3	Blanco proteína	0	0
4	Cenizas	10.8869	31.3835
5	Cenizas	10.8895	31.3910
6	Cenizas	10.8922	31.3988
7	Lodo	18.1757	52.3948
8	Lodo	18.1747	52.3919
9	Lodo	18.1762	52.3962

Absorbancia 595					Absorbancia 450					595/450			[Proteína] (µg/mL)			Factor de dilución
# M	B	R1	R2	R3	# M	B	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
1	0.034	0.13	0.13	0.133	1	0.044	0.211	0.211	0.216	0.5749	0.5749	0.5756	0.0640	0.0640	0.0893	0.0001
2	0.035	0.128	0.131	0.129	2	0.043	0.205	0.21	0.206	0.5741	0.5749	0.5767	0.0372	0.0640	0.1276	0.0001
3	0.035	0.128	0.132	0.129	3	0.045	0.207	0.214	0.208	0.5741	0.5740	0.5767	0.0372	0.0334	0.1276	0.0001
4	0.033	0.13	0.129	0.13	4	0.042	0.211	0.209	0.211	0.5740	0.5749	0.5740	0.0334	0.0640	0.0334	0.0001
5	0.035	0.132	0.131	0.131	5	0.041	0.21	0.208	0.208	0.5740	0.5749	0.5749	0.0334	0.0640	0.0640	0.0001
6	0.034	0.131	0.13	0.131	6	0.045	0.214	0.212	0.214	0.5740	0.5749	0.5740	0.0334	0.0640	0.0334	0.0001
7	0.034	0.135	0.132	0.135	7	0.044	0.22	0.215	0.22	0.5739	0.5731	0.5739	0.0299	0.0034	0.0299	0.0001
8	0.035	0.129	0.129	0.13	8	0.043	0.207	0.207	0.208	0.5732	0.5732	0.5758	0.0059	0.0059	0.0954	0.0001
9	0.033	0.127	0.22	0.22	9	0.044	0.208	0.37	0.37	0.5732	0.5736	0.5736	0.0059	0.0214	0.0214	0.0001

# M	[Proteína] real (mg/mL)			[Proteína] Promedio (mg/mL)	DS (±)
	R1	R2	R3		
1	0.6402	0.6402	0.8932	0.716	0.364
2	0.3717	0.6402	1.2758		
3	0.3717	0.3337	1.2758		
4	0.3337	0.6402	0.3337	0.470	0.162
5	0.3337	0.6402	0.6402		
6	0.3337	0.6402	0.3337		
7	0.2988	0.0344	0.2988		
8	0.0591	0.0591	0.9542	0.244	0.287
9	0.0591	0.2144	0.2144		

[Proteína] adsorbida (mg/mL)	Adsorción específica	
Cenizas: 0.246	2.26	mg proteína / g Ceniza
Lodo: 0.472	2.60	mg proteína / g lodo seco
Carbohidratos: 0.226	37.76	µg de proteína / g carbohidratos

11 ANEXO C

a) RESULTADOS CANTIDAD DE EXTRACTO PRODUCIDO POR CEPA

<i>Fermentaciones Verticillium sp.</i>			<i>Fermentaciones Penicillium sp.</i>		
Cantidad de papel (g)	Cantidad de extracto (mg)	mg Extracto / g papel	Cantidad de papel (g)	Cantidad de extracto (mg)	mg Extracto / g papel
50	163.2	3.26	71	603.7	8.50
50	522	10.44	74	364.3	4.92
80	398.4	4.98	82.5	459.3	5.57
160	1316.2	8.23	100	414.2	4.14
225	1543	6.86	120	755.5	6.30
			127	586.2	4.62
			148	728.5	4.92
			190	887.2	4.67

b) RESULTADOS CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Contenido de proteína en enzima comercial Cellic®																				
# M	Muestra	Absorbancia 595			Absorbancia 450			595/450			[P] medida (µg/mL)			FD	[P] real (mg/mL)			[P] prom (mg/mL)	DS (±)	
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3		R1	R2	R3			
Blanco	Blanco	0.033	0.045	0.035	0.04	0.059	0.04													
1	CTec2	0.188	0.186	0.184	0.274	0.269	0.271	0.6624	0.6714	0.6450	3.0932	3.4058	2.4921	0.00001	309.32	340.58	249.21	299.70	46.44	
2	HTec2	0.179	0.178	0.178	0.274	0.269	0.27	0.6239	0.6333	0.6217	1.7623	2.0877	1.6865	0.00001	176.23	208.77	168.65	184.55	21.31	

[P]: concentración proteína; R: réplica; FD: factor de dilución; DS: desviación estandar

Extractos concentrados por ultrafiltración																			
# M	Muestra	Absorbancia 595			Absorbancia 450			595/450			[Proteína] medida (µg/mL)			FD	[Proteína] real (mg/mL)			[P] prom (mg/mL UF)	DS (±)
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3		R1	R2	R3		
Blanco	Blanco	0.034	0.047	0.034	0.063	0.055	0.039												
3	CV1	0.183	0.181	0.179	0.284	0.282	0.274	0.6742	0.6170	0.6170	3.5020	1.5225	1.5232	0.001	3.50	1.52	1.52	2.18	1.14
4	CV2	0.181	0.189	0.175	0.282	0.27	0.271	0.6712	0.6605	0.6078	3.3991	3.0265	1.2027	0.001	3.40	3.03	1.20	2.54	1.18
5	CV3	0.177	0.19	0.18	0.279	0.27	0.261	0.6620	0.6651	0.6577	3.0809	3.1874	2.9293	0.001	3.08	3.19	2.93	3.07	0.13
6	CV4	0.177	0.186	0.171	0.283	0.284	0.26	0.6500	0.6070	0.6199	2.6644	1.1760	1.6232	0.001	2.66	1.18	1.62	1.82	0.76
7	CV5	0.187	0.189	0.178	0.267	0.26	0.25	0.7500	0.6927	0.6825	6.1246	4.1413	3.7877	0.001	6.12	4.14	3.79	4.68	1.26
8	CV6	0.191	0.193	0.186	0.262	0.256	0.249	0.7889	0.7264	0.7238	7.4721	5.3069	5.2183	0.001	7.47	5.31	5.22	6.00	1.28
Blanco	Blanco	0.033	0.045	0.035	0.063	0.055	0.039												
9	CV7	0.179	0.181	0.179	0.271	0.264	0.276	0.7019	0.6507	0.6076	4.4610	2.6892	1.1971	0.001	4.46	2.69	1.20	2.78	1.63
10	CV8	0.179	0.172	0.175	0.272	0.264	0.276	0.6986	0.6077	0.5907	4.3448	1.1992	0.6131	0.001	4.34	1.20	0.61	2.05	2.01
11	CP1	0.173	0.176	0.179	0.274	0.269	0.274	0.6588	0.6028	0.6170	2.9677	1.0313	1.5232	0.001	2.97	1.03	1.52	1.84	1.01
12	CP2	0.178	0.173	0.179	0.271	0.264	0.276	0.6923	0.6029	0.6118	4.1283	1.0336	1.3431	0.001	4.13	1.03	1.34	2.17	1.70
13	CP3	0.178	0.174	0.18	0.272	0.264	0.276	0.6890	0.6077	0.6160	4.0137	1.1992	1.4891	0.001	4.01	1.20	1.49	2.23	1.55
14	CP4	0.177	0.175	0.177	0.274	0.27	0.272	0.6777	0.5953	0.6137	3.6237	0.7733	1.4095	0.001	3.62	0.77	1.41	1.94	1.50
15	CP6	0.187	0.185	0.184	0.262	0.251	0.256	0.7688	0.7041	0.6912	6.7766	4.5357	4.0915	0.001	6.78	4.54	4.09	5.13	1.44
16	CP7	0.173	0.18	0.17	0.273	0.249	0.246	0.6619	0.6856	0.6570	3.0763	3.8951	2.9067	0.001	3.08	3.90	2.91	3.29	0.53
17	CP8	0.184	0.181	0.184	0.274	0.269	0.26	0.7156	0.6355	0.6742	4.9356	2.1631	3.5020	0.001	4.94	2.16	3.50	3.53	1.39

CV: Extracto *Verticillium sp.* concentrado por Ultrafiltración; CP: Extracto *Penicillium sp.* concentrado por Ultrafiltración; FD: factor de dilución; UF: Ultrafiltración; R: réplica; DS: desviación estándar

Resuspensión de extractos enzimáticos liofilizados																				
# M	Muestra	Absorbancia 595			Absorbancia 450			595/450			[Proteína] medida (µg/mL)			FD	[Proteína] real (mg/mL)			[P] prom (mg/mL)	DS (±)	[P] prom (mg P/mg extracto)
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3		R1	R2	R3			
Blanco	Blanco	0.033	0.045	0.035	0.063	0.055	0.039													
18	LV 100 mg/mL	0.182	0.186	0.181	0.278	0.281	0.274	0.6261	0.6351	0.6239	1.8357	2.1500	1.7623	0.0001	18.36	21.50	17.62	19.16	2.06	0.192
19	LV60 mg/mL	0.192	0.196	0.195	0.256	0.253	0.251	0.8238	0.7626	0.7547	8.6794	6.5615	6.2878	0.001	8.68	6.56	6.29	7.18	1.31	0.120
20	LV 20 mg/mL	0.170	0.181	0.174	0.262	0.270	0.265	0.6884	0.6326	0.6150	3.9945	2.0608	1.4548	0.001	3.99	2.06	1.45	2.50	1.33	0.125
21	LP 100 mg/mL	0.185	0.179	0.163	0.284	0.281	0.238	0.6230	0.6036	0.6465	1.7284	1.0589	2.5420	0.0001	17.28	10.59	25.42	17.76	7.43	0.178
22	LP 60 mg/mL	0.181	0.180	0.178	0.273	0.254	0.246	0.7048	0.6784	0.6908	4.5592	3.6468	4.0769	0.001	4.56	3.65	4.08	4.09	0.46	0.068
23	LP 20 mg/mL	0.160	0.186	0.170	0.200	0.290	0.180	0.9270	0.6000	0.9574	12.2494	0.9343	13.3027	0.001	12.25	0.93	13.30	8.83	6.86	0.441
24	LP 5 mg/mL	0.174	0.176	0.175	0.284	0.282	0.274	0.6380	0.5771	0.5957	2.2494	0.1416	0.7870	0.001	2.25	0.14	0.79	1.06	1.08	0.212

LV: Resuspensión de extracto *Verticillium sp.* liofilizado; LP: Resuspensión de extracto *Penicillium sp.* liofilizado; FD: factor de dilución; UF: Ultrafiltración; R: réplica; DS: desviación estándar

c) ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN EXTRACTOS

- **ACTIVIDAD TOTAL**

Sustrato: Papel filtro Whatman N° 1
 Cantidad sustrato (mg): 50
 Volumen Buffer (mL): 1
 Volumen de extracto (mL): 0.5
 Tiempo de hidrólisis (min): 60
 Temperatura (°C): 50
 Concentración extracto (mg/mL): 100

Muestra <i>Verticillium sp.</i>	Absorbancia	Absorbancia corregida	[G] (g/0.5mL)	FPA (FPU/mL)	FPA (FPU/g extracto)	FPA (FPU/mg Proteína)
B	0.024					
Control sustrato	0.067					
V1 R1	0.562	0.357	0.383	0.076	0.7583	0.0052
V1 R2	0.608	0.403	0.429			
V1 R3	0.597	0.392	0.418			
Control enzima	0.114					
V2 R1	0.336	0.131	0.155	0.031	0.3120	0.0022
V2 R2	0.345	0.14	0.164			
V2 R3	0.368	0.163	0.187			
V3 R1	0.447	0.242	0.267	0.054	0.5393	0.0037
V3 R2	0.468	0.263	0.288			
V3 R3	0.5	0.295	0.320			
Promedio			0.290	0.054	0.537	0.004
	DS (±)		0.11	0.02	0.2	0.002

Muestra <i>Penicillium sp.</i>	Abso.	Abs. corregida	[G] (g/0.5mL)	FPA (FPU/mL)	FPA (FPU/g extracto)	FPA (FPU/mg Proteína)
B	0.024					
Control sustrato	0.067					
1 R1	1.120	0.902	0.931			
1 R2	1.088	0.870	0.899			
1 R3	1.118	0.900	0.930	0.170	1.7018	0.0077
Control 1	0.127					
2 R1	0.655	0.437	0.463			
2 R2	0.767	0.549	0.576			
2 R3	0.817	0.599	0.626	0.103	1.0268	0.0047
3 R1	0.754	0.536	0.563			
3 R2	0.866	0.648	0.676			
3 R3	0.888	0.670	0.698	0.119	1.1938	0.0054
Promedio			0.707	0.131	1.307	0.006
		DS	0.17	0.04	0.4	0.006

Muestra Complejo enzimático	Absorbancia	Absorbancia corregida	[G] (g/0.5mL)	FPA (FPU/mL)	FPA (FPU/mg extracto)
B	0.07				
Control sustrato	0.054				
Control complejo	1.131				
P(70%):V(30%) 1 R1	1.752		0.637	0.664	
P(70%):V(30%) 1 R2	1.908		0.793	0.822	
P(70%):V(30%) 1 R3	1.82		0.705	0.733	0.137
P(70%):V(30%) 2 R1	1.55		0.435	0.461	
P(70%):V(30%) 2 R2	1.703		0.588	0.615	
P(70%):V(30%) 2 R3	1.654		0.539	0.566	0.101
P(70%):V(30%) 3 R1	1.646		0.531	0.558	
P(70%):V(30%) 3 R2	1.779		0.664	0.692	
P(70%):V(30%) 3 R3	1.723		0.608	0.635	0.116
Promedio				0.638	0.118
			DS (±)	0.106	0.018
					1.181
					0.178

- **ACTIVIDAD CMCase**

Sustrato: CMC 0.5 %
 Cantidad sustrato (mL): 0.5
 Volumen de enzima (mL): 0.5
 Tiempo de hidrólisis (min): 30
 Temperatura (°C): 50
 Concentración extracto (mg/mL): 100

<i>Verticillium sp.</i>	Absorbancia	Abs. Corr.	[G] (g/0.5mL)	CMCase (U/mL)	CMCase (U/g extracto)	CMCase (U/mg proteína)
B	0.024					
Control enzima	0.052					
Control sustrato	0.087					
1 R1	0.481	0.318	0.343			
1 R2	0.519	0.356	0.381			
1 R3	0.381	0.218	0.242	0.119	1.1940	0.0082
2 R1	0.492	0.329	0.354			
2 R2	0.536	0.373	0.399			
2 R3	0.351	0.188	0.212	0.119	1.1916	0.0082
3 R1	0.49	0.327	0.352			
3 R2	0.415	0.252	0.277			
3 R3	0.484	0.321	0.346	0.120	1.2040	0.0083
Promedio			0.323	0.120	1.197	0.008
		DS	0.064	0.0007	0.0066	0.00005

Muestra <i>Penicillium sp.</i>	Absorbancia	Absorbancia corregida	[G] (g/0.5mL)	CMCase (U/mL)	CMCase (U/g extracto)	CMCase (U/mg proteína)
B	0.024					
Control enzima	0.127					
Control sustrato	0.087					
1 R1	0.609	0.371	0.397	0.146	1.455	0.0066
1 R2	0.598	0.36	0.385			
1 R3	0.609	0.371	0.397			
2 R1	0.561	0.323	0.348	0.131	1.311	0.0060
2 R2	0.617	0.379	0.405			
2 R3	0.522	0.284	0.309			
3 R1	0.54	0.302	0.327	0.122	1.224	0.0056
3 R2	0.53	0.292	0.317			
3 R3	0.56	0.322	0.347			
Promedio			0.359	0.133	1.330	0.006
		DS	0.037	0.012	0.117	0.001

d) ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN ENZIMA CELLIC®

- **ACTIVIDAD TOTAL**

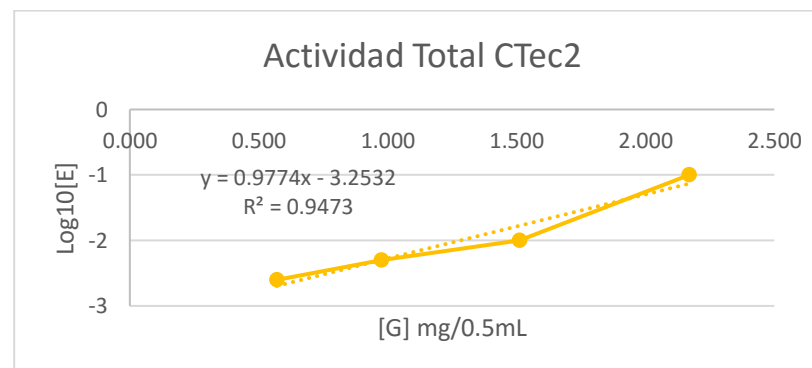
Se determinó la actividad total para la la enzima CTec2 y el complejo CTec2:HTec2 (70:30) la cual es la formulación empleada en los ensayos de hidrólisis.

CTec2			
Muestra	Absorbancia	Abs.C	[G] (mg/0.5mL)
Blanco	0.054		
Control sustrato	0.08		
0.005 R1	1.068	0.916	0.945
0.005 R2	1.149	0.997	1.027
0.005 R3	1.08	0.928	0.958
Control 0.005	0.126		
0.01 R1	1.494	1.262	1.294
0.01 R2	1.798	1.566	1.600
0.01 R3	1.838	1.606	1.640
Control 0.01	0.206		
0.0025 R1	0.693	0.585	0.612
0.0025 R2	0.661	0.553	0.580
0.0025 R3	0.6	0.492	0.518
Control 0.0025	0.082		
Blanco	0.054		
0.1 R1	3.926	2.200	2.238
0.1 R2	3.823	2.097	2.135
0.1 R3	3.825	2.099	2.137
Control 0.1	1.7		

Cálculo de dilución crítica de enzima para CTec2

[E]	Log[E]	[G]
	-	
0.0025	2.60205999	0.570
0.005	-2.30103	0.97663646
0.01	-2	1.51137966
0.1	-1	2.170
0.050303708	-1.2984	2

FPA: 7.35532258 FPU



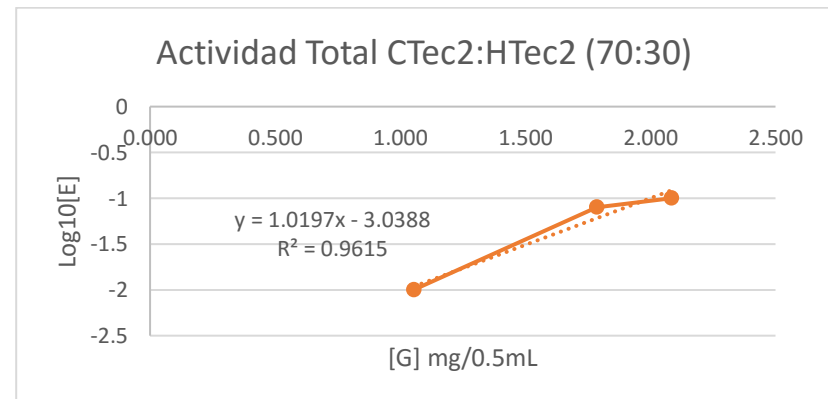
Ctec2:HTec2 (70:30)			
Muestra	Absorbancia	Abs.C	[G] (mg/0.5mL)
Blanco	0.054		
Control sustrato	0.084		
0.08 R1	2.810333333	1.801333	1.837
0.08 R2	2.719	1.71	1.745
0.08 R3	2.747666667	1.738666	1.774
Control 0.08	0.979		
0.01 R1	2.515	0.854	0.883
0.01 R2	2.968	1.307	1.339
0.01 R3	2.569333333	0.90833333	0.938
Control 0.08	1.631		
0.1 R1	3.101	2.316	2.355
0.1 R2	2.697	1.912	1.948
0.1 R3	2.697	1.912	1.948
Control 0.1	0.755		

Cálculo de dilución crítica de enzima para Formulación

Ctec:HTec (70:30)

[E]	Log[E]	[G]
0.01	-2	1.053
0.08	1.09691001	1.785
0.1	-1	2.084
0.100138251	-0.9994	2

FPA: 3.694891791 FPU



12 ANEXO D

FICHA TÉCNICA CELLIC®



Cellic® CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials

Conversion of lignocellulosic biomass to ethanol involves the liberation of sugars from biomass feedstocks. These materials are composed of three major fractions: cellulose, hemicellulose, and lignin. Cellulose and hemicellulose contain sugars in polymeric form that can be converted by enzymes to fermentable monomers for subsequent fermentation.

The lignin component, however, protects the cellulose and hemicellulose against microbial and enzymatic attack. Hence, the use of lignocellulose as a raw material requires a physical or chemical pretreatment in order to render the cellulose and hemicellulose fractions accessible for enzymatic hydrolysis. This pretreatment step is a fine balancing act aimed at opening the fibers to increase water access and enzyme accessibility while minimizing sugar loss and inhibitor generation to ensure high yields and a substrate suitable for enzymatic hydrolysis and fermentation.

Cellic CTec2 and HTec2 are state-of-the-art enzymes that have proven effective on a wide variety of pretreated lignocellulosic materials for the conversion of the carbohydrates in these materials to simple sugars prior to fermentation.

Products

In general, Cellic CTec2 and HTec2 can be described in the following way:

Product	Cellic [®] CTec2	Cellic HTec2
Tech specifications/ description	Cellulase complex for degradation of cellulose to fermentable sugars A blend of - Aggressive cellulases - High level of β -glucosidases - Hemicellulase	- Endoxylanase with high specificity toward soluble hemicellulose - Cellulase background
Features	- High conversion yield - Effective at high solids concentrations - Inhibitor tolerant - Compatible with multiple feedstocks and pretreatments - High concentration and stability	- Can improve cellulose hydrolysis when combined with CTec2 - Helps in case of mild acid or alkaline pretreatment - Converts hemicellulose to fermentable sugars
Benefits	- Up to 50% lower enzyme dosage - Lower operating and capital costs from optimization of process, e.g., higher total solids loading and higher ethanol titer - Enabling low ethanol cost - Increased process flexibility	- 20% lower enzyme usage cost - Enables higher ethanol yields - Provides increased flexibility for pretreatment technology

Table 1. A description of Cellic[®] CTec2 and HTec2 and their features.

Application

CTec2 and HTec2 in application

Novozymes has partnered broadly with different cellulosic ethanol production companies that have worked with the Cellic product family to optimize the cellulosic ethanol production process. We have gathered application information using CTec2 and HTec2 in various process setups using different feedstocks and pretreatments. It is recommended to dose Cellic CTec2 based on the level of cellulose contained in the substrate to allow direct comparisons of enzyme effectiveness on various biomass materials, including those from different feedstocks and pretreatment combinations.

Dosing guidelines

The suggested enzyme trial dosage levels for initial investigation of a substrate are 1.5%, 3.0%, 6.0%, and 30.0% w/w (g enzyme/g cellulose). These data points should be used to generate a dose response curve (enzyme dosage vs. percentage cellulose conversion). The low dosage provides a target for commercially feasible cellulose hydrolysis, while the high dosage provides an indication of maximum enzymatically accessible cellulose content. Additional testing is recommended to refine the dose response curve and determine the effect of time, solids loading, cellulose conversion, and enzyme dosage.

If the pretreated feedstock of interest contains an appreciable amount of hemicellulose, it is advised to combine Cellic CTec2 and HTec2 to boost the cellulose hydrolysis. In some cases, other Novozymes hemicellulases may also be relevant. The enzyme dosage recommendation for Cellic HTec2 is 0.05–0.50% w/w (g enzyme/g cellulose), but the dosage required is heavily dependent on feedstock type, pretreatment technology, and processing conditions. Enzyme dosage requirements may therefore vary significantly. HTec2 is dosed based upon the amount of cellulose in the substrate because it is primarily viewed as a cellulase-boosting enzyme; additionally, dosing in this way simplifies the experimental plan.

Using CTec2 and HTec2 in combination

When pretreatments result in a feedstock that would benefit from additional hemicellulose degradation, one should test whether there is synergy between CTec2 and HTec2. It is recommended to perform a dose response test and a dose response-replacement test where the total dosage of the CTec2 and HTec2 equals the dosages in the CTec2-only dose response test. An example of an initial study design is shown in Table 2.

Treatment	Enzyme dosage % w/w (g enzyme/g cellulose)	
	CTec2	HTec2
Cellulase – low	1.50%	0.00%
Cellulase – mid	3.00%	0.00%
Cellulase – high	6.00%	0.00%
Replacement – low	1.35%	0.15%
Replacement – mid	2.70%	0.30%
Replacement – high	5.4%	0.60%

Table 2. Example of an experimental design to test for synergy between Cellic[®] CTec2 and HTec2 with 10% HTec2 replacement.

Optimal temperature and pH

The optimal temperature and pH for Cellic CTec2 are 45–50 °C and pH 5.0–5.5, as shown in Figures 1 and 2 respectively. The activity profiles were produced using a dilute acid-pretreated corn stover at 5% total solids loading. The temperature was kept constant at 50 °C for the pH profile, and the pH was kept at 5.0 for the temperature profile throughout the 72-hour hydrolysis.

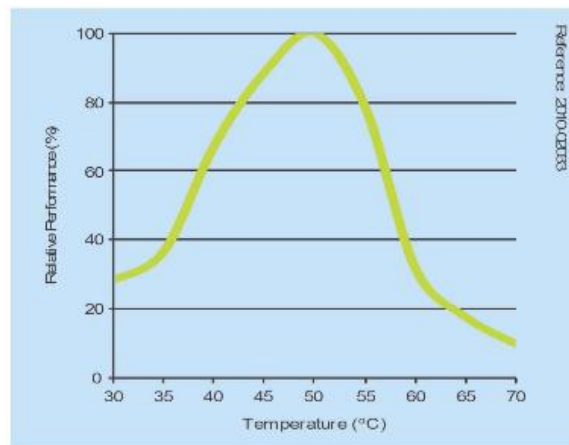


Figure 1: Temperature curve

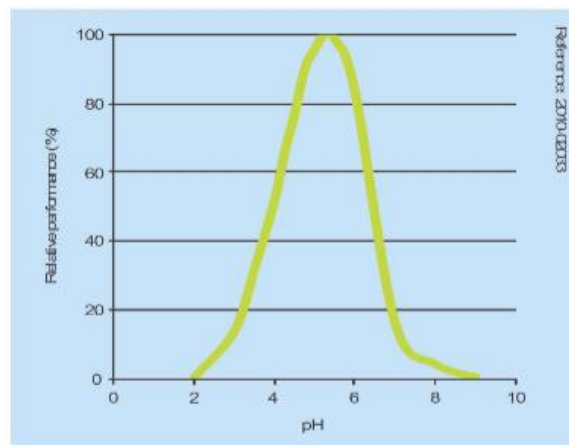


Figure 2: pH curve

The optimal temperature and pH for Cellic HTec2 are 45–50 °C and pH 5.0.

Figures 3 and 4 on the next page illustrate the activity of Cellic HTec2 at different temperatures and pH values using azo-wheat

arbinoxylan as substrate.

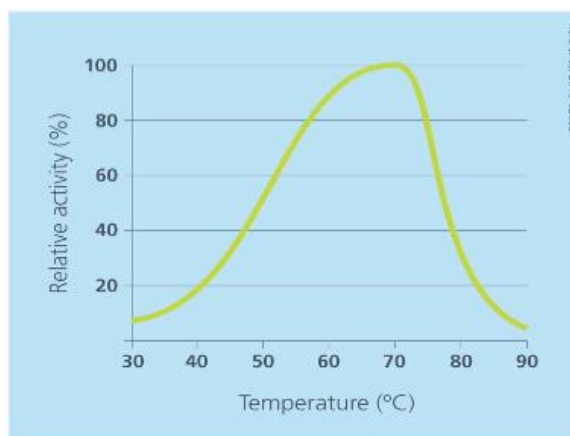


Figure 3: Effect of temperature on the activity of Cellic[®] HTec2

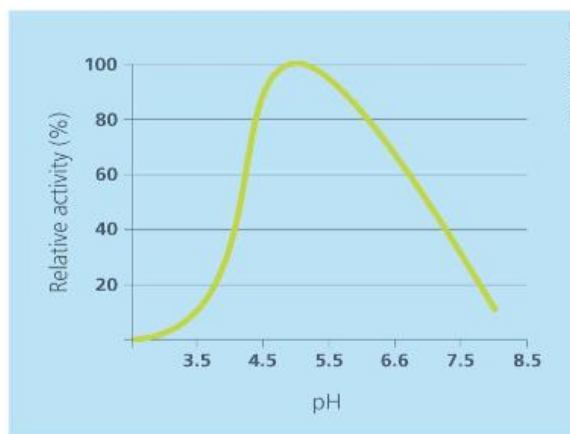


Figure 4: Effect of pH on the activity of Cellic[®] HTec2

Figure 5 on page 6 shows the enzyme dose response of Cellic Ctec2 at 50 °C and pH 5.0 for an unwashed sample of dilute acid-pretreated corn stover at 15% total solids loading.

The enzymes are also effective on other feedstocks such as sugarcane bagasse, corn cob, corn fiber, and wood pulp. The dose response will depend on feedstock, pretreatment, and process conditions.

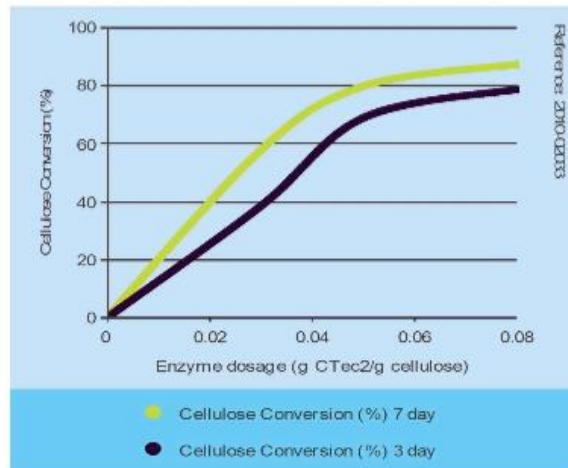


Figure 5: Enzyme dosage (g enzyme/g cellulose)

Storage in application

The recommended storage conditions are 0–25 °C (32–77 °F) in sealed packaging, well-protected from the sun. The product has been formulated for optimal stability. However, enzymes gradually lose activity over time. Extended storage and/or adverse conditions such as higher temperature may lead to a higher dosage requirement.

Safety, handling, and storage

Safety, handling, and storage guidelines are provided with all products.

CELLULOSIC ETHANOL PRIMER

Biofuels are a key to reducing global CO₂ emissions, and cellulosic bioethanol offers the opportunity to reduce CO₂ emissions by up to 90% compared to conventional gasoline. The cellulosic ethanol industry holds a lot of promise for meeting the demand for an alternative global liquid transportation fuel, and at Novozymes we recognize this potential as a worthwhile focus for our company. That is why we started working on developing cellulosic ethanol solutions in 2000 and have continued to grow our research efforts in this area every year since then. Our cellulosic ethanol work has become the largest endeavor in our company's history, with more than 150 people dedicated to this effort. We have learned a lot through our internal research and through our partnerships with leading companies across the globe.

The information in this section has been collected through our efforts over the years and is offered to help you progress in your cellulosic ethanol work.

Cellulosic ethanol production process

The production processes for lignocellulosic ethanol are continuously being optimized at pilot and demonstration-scale plants around the world. Simplified, the process has five steps (see Figure 6):

1. **Feedstock:** Feedstock collection and transport to the cellulosic ethanol plant.
2. **Pretreatment:** A mechanical or thermochemical pretreatment step to break up the lignocellulosic structure so that the enzymes can access cellulose and hemicellulose.
3. **Hydrolysis:** An enzymatic hydrolysis step to convert the cellulose and hemicellulose to monomeric sugars.
4. **Fermentation:** A fermentation step to convert the sugars to ethanol.
5. **Recovery:** A recovery step to separate the ethanol from the remaining fractions so the product can be sold.

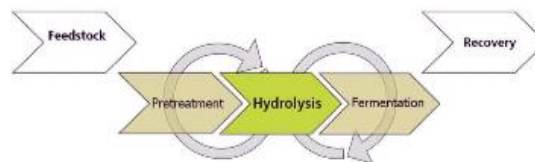


Figure 6: Cellulosic ethanol production process

It is widely believed that pretreatment, hydrolysis, and fermentation should be carried out in an integrated fashion since the three steps are highly interconnected. For example, degradation products generated during pretreatment can adversely affect hydrolysis and fermentation. Additionally, determining the optimal time to proceed from hydrolysis to fermentation can potentially increase the ethanol yield or decrease the overall process cost. Thus, it is important to determine how changes to one process step affect the performance and cost of the subsequent steps.

Hydrolysis

The primary goal of hydrolysis is to convert as much cellulose as possible into monomeric sugars as quickly as possible, which is achieved by adding cellulases and hemicellulases. A good measure of the effectiveness of an enzyme is percentage cellulose conversion, which is defined as the amount of cellulose converted to glucose divided by the total amount of cellulose. A high cellulose conversion can be achieved by

increasing either the enzyme dosage or the hydrolysis time. However, a small fraction of the cellulose in a feedstock is harder to convert than the majority; hence, there can be a diminishing return where it takes a large amount of enzyme to convert a relatively minor fraction of cellulose.

Given this diminishing return, it is not recommended to attempt to reach a predetermined target percentage cellulose conversion without developing a process model, as this could result in a higher process cost. Finding the optimal enzyme loading requires balancing of capital expenses and operational expenses. Modeling these relationships is critical for finding the optimal process setup for a cellulosic ethanol plant.

Table 3 shows a few basic relationships between several hydrolysis factors and CAPEX/OPEX. It is important to note that the benefits and downsides shown below do not necessarily offset one another. For example, if you increase solids, the savings on acid/base and tank costs may not offset the reduction in maximum attainable conversion at higher enzyme cost. Additionally, it should be noted that not all changes will be realized at the same time as there are multiple ways to approach these complex relationships.

Hydrolysis factor	CAPEX	OPEX
Higher enzyme dosage	<ul style="list-style-type: none"> - Quicker reaction results in less installed-tank capacity - Lower agitation cost 	<ul style="list-style-type: none"> - More spent on enzyme - Lower agitation cost - Lower residence time - Higher cellulose conversion
Longer hydrolysis time	<ul style="list-style-type: none"> - Lower enzyme dosage - More installed-tank capacity 	<ul style="list-style-type: none"> - Higher heating/agitation cost - Less spent on enzyme
Higher total solids	<ul style="list-style-type: none"> - More expensive (initial) mixing system - Less installed-tank capacity - More expensive solids transport - Potentially cheaper pretreatment equipment - Smaller distillation unit 	<ul style="list-style-type: none"> - Lower water throughput - More spent on enzyme - Higher agitation power - Lower heating cost - Lower acid/base cost - Lower distillation cost
Higher percentage cellulose conversion	<ul style="list-style-type: none"> - Lower CHP size/cost 	<ul style="list-style-type: none"> - Less material for boiler means less income from electricity - More ethanol generated results in lower distillation costs - More spent on enzyme

Table 3. Some basic relationships between CAPEX and OPEX.

A brief note on fermentation and SSF

It is strongly recommended to identify the optimal time to switch from hydrolysis to fermentation for the specific feedstock. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF), a process design where yeast and enzyme are added together and run at 32–37 °C, is commonly cited as a way of decreasing process costs because it can remove the end-product inhibition on enzymes by fermenting glucose to ethanol.

However, for cellulosic bioethanol, suboptimal conditions during SSF necessitate longer processing time for the enzymes and C5 sugar conversion to reach a specific glucose conversion level. The temperature is not favorable for optimal enzyme performance, and higher inhibitors, due to high solids in hydrolysis, cause the normal yeast dosage to not perform effectively. For cellulases, CTec2 and HTec2 have significantly more activity at hydrolysis temperatures than at fermentation temperatures (Figures 1 and 3), and CTec2 also has an improved β -glucosidase enzyme that has less glucose inhibition.

Additional information

We invite you to explore our bioenergy information site at www.bioenergy.novozymes.com. For additional information on Novozymes' products or other general topics, please contact Novozymes using the contact form on the above website to place your inquiry.

Novozymes is the world leader in bioinnovation. Together with customers across a broad array of industries we create tomorrow's industrial biosolutions, improving our customers' business and the use of our planet's resources.

For more information, or for more office addresses, visit www.novozymes.com

Novozymes A/S - Kroghshøjvej 36 - 2880 Bagsvaerd - Denmark - Tel. +45 4446 0000 - Fax +45 4446 9990

Laws, regulations, and/or third party rights may prevent customers from importing, using, processing, and/or reselling the products described herein in a given manner. Without separate, written agreement between the customer and Novozymes to such effect, this document does not constitute a representation or warranty of any kind and is subject to change without further notice.

13 ANEXO E

13.1 REVISIÓN DE ESTUDIOS DE HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTANEA

Tabla 44. Revisión de estudios SSF

#	Autor (es)	Micro-organismo	Enzimas	[Enzimas]	Levadura	T° (°C)	pH	Carga de solidos	Agitación (rpm)	Volumen ensayo	Medio de cultivo	Tiempo
1	Lynd <i>et al.</i> , 2001	T. Reesei	-Multifect <i>Genencor CL</i> - Novozyme 188	Celulasas: Actividad: 90 FPU/ml 10 - 20 FPU/g glucano β-glucosidasas: 10 - 20 UI/g celulosa 4 UI β glucosidasa /FPU	<i>S. cerevisiae</i> cepa D5A Inoculo 0.2% volumen	37 °C	4.5	Lodo sin secarse. Carga de glucano: 20 g/L	no	100 mL Viales de suero sellados de 150 mL y fase gas nitrógeno	Medio rico: 10 g/L extracto de levadura 20 g/L pepetona Medio pobre: 0.15% v/v licor de maíz macerado 2.5 mM MgSO ₄	7 días
2	Wang, Kang & Lee, 2010	T. reesi Rut30	Producción de celulasas en lodo papelero como sustrato	Celulasas: Actividad: 8 FPU/mL Dosis: 5-15 FPU/g glucano Suplemento de beta-glucosidasa: 2 - 30 CBU/g glucano	<i>S. cerevisiae</i> Inóculo 10 mL de suspensión	36°C	3,5	3 y 6% w/v de glucano	no	100 mL en erlenmeyer de 250	1% extracto de levadura y 2% de pepetona	72 h 96 h

#	Autor(es)	Micro-organismo	Enzimas	[Enzimas]	Levadura	T° (°C)	pH	Carga de solidos	Agitación (rpm)	Volumen ensayo	Medio de cultivo	Tiempo
3	Kang, Wang & Lee (2010)	T. reesei	Comercial Spezyme CP	<p>Celulasas: Actividad: 59 FPU/mL Dosis: 15 FPU/g glucano</p> <p>Suplemento de beta-glucosidasa: Actividad 750 CBU 30 CBU/g glucano</p>	Saccharomyces cerevisiae Inóculo: D.O.= 0.05 a 600 nm. (50 mg peso células secas)	37°C	5.0	Lodo sin pre-tratamiento Fed batch 3% o 6% w/v	150	100 mL en erlenmeyer de 250	Medio YP: 1% extracto de levadura + 2% peptona	72 h
4	Kang <i>et al.</i> (2011)	T. reesei	Comercial Spezyme CP	<p>Celulasas: Actividad: 59 FPU/mL Dosis: 5, 10 y 15 FPU/g glucano</p> <p>Suplemento de beta-glucosidasa: Actividad 750 CBU 2 CBU/FPU</p>	Saccharomyces cerevisiae Inóculo: D.O.= 0.05 por a 600 nm. Equivalente a 50 mg peso células secas	37°C	N.R.	Lodo con 3%; 6% o 9% w/v carga de glucano (6,7%; 13,5% y 20,2% de sólidos)	150	100 mL en erlenmeyer de 250	Medio YP: 1% extracto de levadura + 2% peptona	120 h

5	Dowe <i>et al.</i> (2008)	-	-	-	<i>S. cerevisiae</i> D5A Inoculo: D.O.= 0.5 inocular 10 mL de suspensión	32°C	4.8	6%	130	100 mL en erlenmeyer de 250	Medio YP 10X: 100 g/L (10%) Ext.levadura 200 g/L (20%) peptona Medio YP con 5% dextrosa: Ext. Levad 10g/L Peptona 20g/L Dextrosa 50 g/L	7 días
6	Fan <i>et al.</i> (2003)	N.R.	Cellulase (DP151) y Novozym 188	15 - 20 FPU/ g celulosa Suplemento b-glucosidasas	<i>S. cerevisiae</i>	36°C	4.5	10g/L carga de sólidos feed batch	100	Reactor de 800 mL de Vol. de trabajo	Medio enriquecido: Peptona 20 g/L Extracto de levadura 10g/L Medio pobre: MgSO ₄ 5 mM 0.3% v/v licor de maíz	
7	Madrid & Quintero (2011)	<i>T. reesei</i> / <i>A. niger</i>	Celluclast 1.5 L / Novozym 188	Actividad 70 FPU Celluclast Dosis: 24 FPU/g celulosa Actividad Novozym 750 CBU Dosis 10 % v/v Novozym/ Celluclast	Kluyvero- myces marxianus	50°C hidról. 38°C SHF	4.5	3 %; 6%; y 9 % w/v	200	Hidrólisis Erlenmeyer 250 SHF Erlenmeyer de 500 mL con 190 mL vol de trabajo	2.5 g/L extracto levadura, 5 g/L peptona, 1 g/L KH ₂ PO ₄ , 0.62 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O, y 2.5 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ . Buffer citrato pH 4.5	Hidról: 5 h SSF total: 72 h

8	Lark <i>et al.</i> (1997)	<i>T. reesei</i>	Celulasa comercial de Iogen Corp.	Actividad 154 FPU/mL dosis 8 FPU/g lodo seco	Kluyveromyces marxianus ATCC36907	38°C	4.8	89 g/L base seca para hidrolisis 180 g/L base seca para ssf	200	Erlenmeyer de 250 mL 100 mL vol. trabajo	Buffer fosfato 0.05 M pH 5.0 YMP: 3g/L Ex. Levadura; 3g/L ext. Malta; 5g/L peptona	24-72 h
---	---------------------------	------------------	-----------------------------------	--	-----------------------------------	------	-----	--	-----	---	---	---------

14 ANEXO F

a) RESULTADOS ENSAYOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON ENZIMA COMERCIAL CELLIC®

Tabla 45. Condiciones ensayo hidrólisis con enzima comercial Cellic®

Muestra N°	% E (gE/gCel)	T° (°C)	Peso lodo Hum. (g)	%H	Peso lodo B.S. (g)	Carga Lodo (5%)	Peso enzima (g)	Volumen buffer	pH inicial	pH Final (72 h)
1.1	3%	37	16.5966	69.8%	5.0127	5.01%	0.0495	88.416	3.50	6.74
1.2	3%	37	16.5586	69.8%	5.0012	5.00%	0.0494	88.443	3.67	6.60
1.3	3%	37	16.5580	69.8%	5.0010	5.00%	0.0494	88.443	3.66	6.83
2.1	6%	37	16.5848	69.8%	5.0091	5.01%	0.0989	88.424	3.80	7.00
2.2	6%	37	16.6148	69.8%	5.0182	5.02%	0.0991	88.403	3.43	6.85
2.3	6%	37	16.6190	69.8%	5.0194	5.02%	0.0991	88.400	4.00	7.06
3.1	9%	37	16.5902	69.8%	5.0107	5.01%	0.1484	88.421	3.54	7.86
3.2	9%	37	16.5788	69.8%	5.0073	5.01%	0.1483	88.428	3.40	7.02
3.3	9%	37	16.5560	69.8%	5.0004	5.00%	0.1481	88.444	3.67	7.11
4.1	3%	45	16.5640	69.8%	5.0028	5.00%	0.0494	88.439	3.63	7.83
4.2	3%	45	16.5766	69.8%	5.0066	5.01%	0.0494	88.430	3.80	7.76
4.3	3%	45	16.5618	69.8%	5.0021	5.00%	0.0494	88.440	3.71	7.86
5.1	6%	45	16.6128	69.8%	5.0175	5.02%	0.0990	88.405	3.99	7.32
5.2	6%	45	16.5692	69.8%	5.0044	5.00%	0.0988	88.435	3.51	7.21
5.3	6%	45	16.5938	69.8%	5.0118	5.01%	0.0989	88.418	3.60	7.00
6.1	9%	45	16.5508	69.8%	4.9988	5.00%	0.1480	88.448	3.79	7.79
6.2	9%	45	16.5480	69.8%	4.9980	5.00%	0.1480	88.450	4.03	7.12
6.3	9%	45	16.5914	69.8%	5.0111	5.01%	0.1484	88.420	3.68	7.87
7.1	3%	55	16.5682	69.8%	5.0041	5.00%	0.0494	88.436	3.57	6.88
7.2	3%	55	16.5646	69.8%	5.0030	5.00%	0.0494	88.438	3.81	7.76
7.3	3%	55	16.5642	69.8%	5.0029	5.00%	0.0494	88.439	3.70	7.85
8.1	6%	55	16.5414	69.8%	4.9960	5.00%	0.0986	88.455	3.67	7.58
8.2	6%	55	16.5562	69.8%	5.0005	5.00%	0.0987	88.444	3.69	7.67
8.3	6%	55	16.5588	69.8%	5.0012	5.00%	0.0987	88.442	3.54	7.23
9.1	9%	55	16.5632	69.8%	5.0026	5.00%	0.1481	88.439	3.58	7.39
9.2	9%	55	16.6128	69.8%	5.0175	5.02%	0.1486	88.405	3.41	7.90
9.3	9%	55	16.5752	69.8%	5.0062	5.01%	0.1482	88.431	3.76	7.24

Tabla 46. Resultados hidrólisis con enzima Cellic® con 150 rpm a diferentes temperaturas

T°: 37 °C, 150 rpm				T°: 45 °C, 150 rpm				T°: 55 °C, 150 rpm			
%E %S	t (h)	[G] g/L Prom	DS (±)	%E	t (h)	[G] g/L Prom	DS (±)	%E	t (h)	[G] g/L Prom	DS (±)
3%; S1	0	0.1834	0.06	3%E; S1	0	0.2058	0.05	3%E S1	0	0.1076	0.05
	12	3.8147	0.33		12	4.3317	0.18		12	2.9204	0.39
	24	4.9030	0.15		24	4.6961	0.31		24	2.5815	0.73
	36	5.9164	0.25		36	5.8406	0.36		36	1.4980	0.66
	48	6.6689	0.33		48	5.6647	0.13		48	0.8794	0.35
	60	6.9472	0.32		60	5.9068	0.20		60	0.5375	0.19
	72	7.4248	0.38		72	6.1625	0.18		72	0.6478	0.43
6%; S1	0	0.2030	0.05	6%E; S1	0	0.1312	0.04	6%E S1	0	0.1172	0.05
	12	4.9902	0.44		12	8.0123	0.27		12	3.8383	0.20
	24	7.1126	0.18		24	8.7040	0.28		24	3.0748	0.51
	36	6.8908	0.15		36	6.4868	0.16		36	1.4429	0.61
	48	7.4274	0.21		48	6.5507	0.23		48	0.9522	0.45
	60	7.7850	0.30		60	6.5100	0.35		60	0.7186	0.38
	72	8.0386	0.29		72	6.4705	0.28		72	0.5391	0.31
9%; S1	0	0.1913	0.04	9%E; S1	0	0.2109	0.01	9%E S1	0	0.1056	0.06
	12	4.9062	0.52		12	0.8804	0.19		12	3.3223	0.24
	24	7.0439	0.22		24	8.5583	0.55		24	2.1926	0.28
	36	7.2872	0.23		36	6.6557	0.60		36	0.7406	0.09
	48	7.6593	0.35		48	7.8229	2.27		48	0.5469	0.12
	60	7.3019	1.13		60	6.7808	0.46		60	0.1935	0.19
	72	8.0435	0.16		72	9.3441	1.68		72	0.1649	0.05

Tabla 47. Producción de AR con enzima comercial expresados en g AR/g glucano

T° (°C)	% Enzima	Tiempo (h)	g AR/g glucano	DS	T° (°C)	% Enzima	Tiempo (h)	g AR/g glucano	DS	T° (°C)	% Enzima	Tiempo (h)	g AR/g glucano	DS
37°C	3%	0	0.011	0.003	45°C	3%	0	0.013	0.002	55°C	3%	0	0.007	0.002
		12	0.238	0.010			12	0.271	0.008			12	0.183	0.006
		24	0.306	0.008			24	0.294	0.016			24	0.161	0.005
		36	0.370	0.015			36	0.365	0.006			36	0.094	0.007
		48	0.417	0.010			48	0.354	0.002			48	0.055	0.002
		60	0.434	0.007			60	0.369	0.005			60	0.034	0.008
		72	0.464	0.015			72	0.385	0.007			72	0.040	0.003
	6%	0	0.013	0.002		6%	0	0.008	0.001		6%	0	0.007	0.001
		12	0.312	0.018			12	0.501	0.008			12	0.240	0.003
		24	0.445	0.001			24	0.544	0.008			24	0.192	0.003
		36	0.431	0.008			36	0.405	0.006			36	0.090	0.008
		48	0.464	0.001			48	0.409	0.006			48	0.060	0.003
		60	0.487	0.009			60	0.407	0.012			60	0.045	0.002
		72	0.502	0.005			72	0.404	0.006			72	0.034	0.000
	9%	0	0.012	0.002		9%	0	0.013	0.000		9%	0	0.007	0.003
		12	0.307	0.025			12	0.143	0.002			12	0.208	0.004
		24	0.440	0.013			24	0.535	0.018			22	0.137	0.003
		36	0.455	0.001			36	0.416	0.010			36	0.046	0.001
		48	0.479	0.010			48	0.489	0.058			48	0.034	0.003
		60	0.456	0.049			60	0.424	0.024			60	0.012	0.007
		72	0.503	0.005			72	0.584	0.025			72	0.010	0.002

Tabla 48. Resultados de hidrólisis con enzima Cellic® y diferentes cargas de sólidos en 6 y 12 horas de hidrólisis

T°: 37 °C, 150 rpm				T°: 45 °C, 150 rpm				T°: 55 °C, 150 rpm			
%E %S	t (h)	[G] g/L Prom	DS (±)	%E	t (h)	[G] g/L Prom	DS (±)	%E	t (h)	[G] g/L Prom	DS (±)
6%; S1	6	5.5690	1.07	6%; S1	6	6.1865	0.29	6% S2	0	0.1226	0.05
	12	4.9902	0.44		12	8.0123	0.27		12	5.8475	0.43
6%; S3	0	0.0739	0.02	6%; S3	0	0.0701	0.03		24	4.4627	0.25
	6	5.6612	1.17		6	11.0705	0.60		36	1.3453	0.46
	12	8.1205	1.40		12	13.7368	1.42		48	0.9844	0.21
									60	1.1842	0.52
									72	0.8000	0.28

b) RESULTADOS CONDICIONES DE AGITACIÓN

Tabla 49. Condiciones ensayos de agitación en hidrólisis con 6% de enzima y 18.17% de sólidos

Muestra	Peso lodo húmedo (g)	Peso lodo seco (g)	%S	Agitación (rpm)	Vol. Buffer	% E	T° (°C)
1.1	45.40	18.1509	18.15%	150	72.75	6%	37
1.2	45.43	18.1629	18.16%	150	72.73	6%	37
1.3	45.44	18.1669	18.17%	150	72.73	6%	37
2.1	45.42	18.1589	18.16%	200	72.74	6%	37
2.2	45.46	18.1749	18.17%	200	72.71	6%	37
2.3	45.45	18.1709	18.17%	200	72.72	6%	37
3.1	45.48	18.1829	18.18%	100	72.70	6%	37
3.2	45.46	18.1749	18.17%	100	72.71	6%	37
3.3	45.46	18.1749	18.17%	100	72.71	6%	37
4.1	48.99	18.1704	18.17%	200	70.60	6%	45
4.2	49.00	18.1741	18.17%	200	70.59	6%	45
4.3	49.01	18.1778	18.18%	200	70.58	6%	45

Tabla 50. Resultados de hidrólisis a 37 y 45°C con 6% enzima y carga de sólidos 18,17%, en diferentes agitaciones

T° (°C)	Agitación (rpm)	Tiempo (h)	AR (g/L)	DS (±)
37 °C	150	0	0.2570	0.05
		6	5.8745	1.38
		12	6.3293	1.48
	200	0	0.4651	0.15
		6	6.2317	1.00
		12	7.0893	1.05
45°C	150	0	0.0701	0.03
		6	11.0705	0.60
		12	13.7368	1.42
	200	0	0.2809	0.04
		6	18.0969	0.66
		12	23.3045	1.37

c) RESULTADOS ENSAYOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON EXTRACTO ENZIMÁTICO

Tabla 51. Condiciones ensayo extracto enzimático

# M	T (°C)	% E	Lodo Hum. (g)	%H	Lodo B.S. (g)	%S (5%)	Enzima (g)	Vol.buffer	pH Inicial	pH Final (12h)
1.R1	37	3%	16.6128	69.8%	5.0175	5.02%	0.0494	88.4	3.45	7.08
1.R2	37	3%	16.6042	69.8%	5.0150	5.01%	0.0494	88.4	3.01	7.16
1.R3	37	3%	16.6084	69.8%	5.0162	5.02%	0.0494	88.4	3.2	7.1
2.R1	37	3%	30.0378	69.8%	9.0723	9.07%	0.0897	79.0	3.64	7.44
2.R2	37	3%	30.0594	69.8%	9.0788	9.08%	0.0897	79.0	3.46	7.37
2.R3	37	3%	30.0598	69.8%	9.0789	9.08%	0.0897	79.0	3.45	7.39
3.R1	37	3%	60.1702	69.8%	18.1732	18.17%	0.1793	58.0	3.45	7.21
3.R2	37	3%	60.1824	69.8%	18.1768	18.18%	0.1793	58.0	4.21	7.41
3.R3	37	3%	60.1762	69.8%	18.1750	18.17%	0.1793	58.0	3.7	7.32
4.R1	37	6%	16.55	69.8%	4.9986	5.00%	0.0897	88.4	2.30	7.55
4.R2	37	6%	16.5732	69.8%	5.0056	5.01%	0.0897	88.4	2.85	7.73
4.R3	37	6%	16.5596	69.8%	5.0015	5.00%	0.0897	88.4	2.80	7.61
5.R1	37	6%	30.0944	69.8%	9.0894	9.09%	0.1794	79.0	3.21	7.03
5.R2	37	6%	30.0824	69.8%	9.0858	9.09%	0.1794	79.0	3.52	7.95
5.R3	37	6%	30.09	69.8%	9.0881	9.09%	0.1794	79.0	3.43	7.97
6.R1	37	6%	60.1712	69.8%	18.1735	18.17%	0.3587	58.0	4.38	7.97
6.R2	37	6%	60.1666	69.8%	18.1721	18.17%	0.3587	58.0	4.33	7.98
6.R3	37	6%	60.1742	69.8%	18.1744	18.17%	0.3587	58.0	4.40	7.46
7.R1	37	9%	16.5564	69.8%	5.0005	5.00%	0.1481	88.4	3.91	7.3
7.R2	37	9%	16.5978	69.8%	5.0130	5.01%	0.1481	88.4	3.90	7.48

# M	T (°C)	% E	Lodo Hum. (g)	%H	Lodo B.S. (g)	%S (5%)	Enzima (g)	Vol.buffer	pH Inicial	pH Final (12h)
7.R3	37	9%	16.5536	69.8%	4.9997	5.00%	0.1481	88.4	3.87	7.48
8.R1	37	9%	30.065	69.8%	9.0805	9.08%	0.2692	79.0	3.33	7.32
8.R2	37	9%	30.1004	69.8%	9.0912	9.09%	0.2692	79.0	3.30	7.12
8.R3	37	9%	30.0982	69.8%	9.0905	9.09%	0.2692	79.0	3.30	7.32
9.R1	37	9%	60.188	69.8%	18.1785	18.18%	0.538	58.0	3.91	6.99
9.R2	37	9%	60.1716	69.8%	18.1736	18.17%	0.538	58.0	3.90	7.11
9.R3	37	9%	60.178	69.8%	18.1755	18.18%	0.538	58.0	3.94	7.68
10.R1	45	3%	16.561	69.8%	5.0019	5.00%	0.0494	88.4	3.33	7.67
10.R2	45	3%	16.5664	69.8%	5.0035	5.00%	0.0494	88.4	3.24	7.01
10.R3	45	3%	16.5598	69.8%	5.0015	5.00%	0.0494	88.4	3.70	7.05
11.R1	45	3%	30.0884	69.8%	9.0876	9.09%	0.0897	79.0	3.83	7.42
11.R2	45	3%	30.1068	69.8%	9.0931	9.09%	0.0897	79.0	3.74	7.39
11.R3	45	3%	30.108	69.8%	9.0935	9.09%	0.0897	79.0	3.77	7.42
12.R1	45	3%	60.1534	69.8%	18.1681	18.17%	0.1793	58.0	4.45	7.15
12.R2	45	3%	60.172	69.8%	18.1737	18.17%	0.1793	58.0	3.29	7.14
12.R3	45	3%	60.164	69.8%	18.1713	18.17%	0.1793	58.0	4.00	7.14
13.R1	45	6%	16.6084	69.8%	5.0162	5.02%	0.0897	88.4	3.70	7.92
13.R2	45	6%	16.594	69.8%	5.0119	5.01%	0.0897	88.4	3.14	7.81
13.R3	45	6%	16.562	69.8%	5.0022	5.00%	0.0897	88.4	3.20	7.80
14.R1	45	6%	30.1416	69.8%	9.1036	9.10%	0.1794	79.0	3.01	7.92
14.R2	45	6%	30.1028	69.8%	9.0919	9.09%	0.1794	79.0	3.82	7.06
14.R3	45	6%	30.1416	69.8%	9.1036	9.10%	0.1794	79.0	3.59	7.58
15.R1	45	6%	60.1712	69.8%	18.1735	18.17%	0.3587	58.0	3.57	7.23
15.R2	45	6%	60.1802	69.8%	18.1762	18.18%	0.3587	58.0	3.81	7.82
15.R3	45	6%	60.1632	69.8%	18.1710	18.17%	0.3587	58.0	3.65	7.01
16.R1	45	9%	16.6036	69.8%	5.0148	5.01%	0.1481	88.4	3.61	7.74
16.R2	45	9%	16.5442	69.8%	4.9968	5.00%	0.1481	88.5	3.45	7.75
16.R3	45	9%	16.5600	69.8%	5.0016	5.00%	0.1481	88.4	3.60	7.75
17.R1	45	9%	30.1306	69.8%	9.1003	9.10%	0.2692	79.0	3.42	7.01
17.R2	45	9%	30.1262	69.8%	9.0990	9.10%	0.2692	79.0	3.92	7.03
17.R3	45	9%	30.1270	69.8%	9.0992	9.10%	0.2692	79.0	3.58	7.05
18.R1	45	9%	49.2556	63.1%	18.1753	18.18%	0.5380	68.9	3.80	7.85
18.R2	45	9%	49.2464	63.1%	18.1719	18.17%	0.5380	68.9	3.40	7.73
18.R3	45	9%	49.2499	63.1%	18.1732	18.17%	0.5380	68.9	3.35	7.79
19.R1	55	3%	13.5596	60.0%	5.4211	5.42%	0.0494	91.9	3.21	7.60
19.R2	55	3%	13.5572	60.0%	5.4202	5.42%	0.0494	91.9	3.78	7.25
19.R3	55	3%	13.5578	60.0%	5.4204	5.42%	0.0494	91.9	3.30	7.1
20.R1	55	3%	24.6200	60.0%	9.8431	9.84%	0.0897	85.2	3.56	7.38
20.R2	55	3%	24.6160	60.0%	9.8415	9.84%	0.0897	85.2	3.63	7.44
20.R3	55	3%	24.6198	60.0%	9.8430	9.84%	0.0897	85.2	3.81	7.60

# M	T (°C)	% E	Lodo Hum. (g)	%H	Lodo B.S. (g)	%S (5%)	Enzima (g)	Vol.buffer	pH Inicial	pH Final (12h)
21.R1	55	3%	49.2560	60.0%	19.6925	19.69%	0.1793	70.4	3.78	7.36
21.R2	55	3%	49.2644	60.0%	19.6959	19.70%	0.1793	70.4	3.98	7.43
21.R3	55	3%	49.2646	60.0%	19.6960	19.70%	0.1793	70.4	4.25	7.39
22.R1	55	6%	13.5394	60.0%	5.4131	5.41%	0.0897	91.9	2.67	7.58
22.R2	55	6%	13.5276	60.0%	5.4083	5.41%	0.0897	91.9	2.80	7.57
22.R3	55	6%	13.5380	60.0%	5.4125	5.41%	0.0897	91.9	3.10	7.79
23.R1	55	6%	24.6008	60.0%	9.8354	9.84%	0.1794	85.2	2.95	7.68
23.R2	55	6%	24.6044	60.0%	9.8368	9.84%	0.1794	85.2	3.03	7.90
23.R3	55	6%	24.6032	60.0%	9.8364	9.84%	0.1794	85.2	3.45	7.97
24.R1	55	6%	49.2212	60.0%	19.6786	19.68%	0.3587	70.5	4.01	7.86
24.R2	55	6%	49.2524	60.0%	19.6911	19.69%	0.3587	70.4	4.21	7.30
24.R3	55	6%	49.2520	60.0%	19.6909	19.69%	0.3587	70.4	4.20	7.27
25.R1	55	9%	13.5214	60.0%	5.4059	5.41%	0.1481	91.9	3.85	7.79
25.R2	55	9%	13.5466	60.0%	5.4159	5.42%	0.1481	91.9	3.64	7.69
25.R3	55	9%	13.5401	60.0%	5.4133	5.41%	0.1481	91.9	3.92	7.59
26.R1	55	9%	24.6154	60.0%	9.8412	9.84%	0.2692	85.2	3.42	7.23
26.R2	55	9%	24.6194	60.0%	9.8428	9.84%	0.2692	85.2	3.60	7.41
26.R3	55	9%	24.6165	60.0%	9.8417	9.84%	0.2692	85.2	5.55	7.37
27.R1	55	9%	49.2414	60.0%	19.6867	19.69%	0.538	70.4	3.84	7.79
27.R2	55	9%	49.2538	60.0%	19.6917	19.69%	0.538	70.4	3.91	7.05
27.R3	55	9%	49.2497	60.0%	19.6900	19.69%	0.538	70.4	3.78	7.63

Tabla 52. Resultados hidrólisis con extracto enzimático 6 y 12 horas

37 °C, 150 rpm				45 °C, 150 rpm				55 °C, 150 rpm			
Muestra	T (h)	[G] g/L Prom	DS	Muestra	T (h)	[G] g/L Prom	DS	Muestra	T (h)	[G] g/L Prom	DS
E1 S1	0	0.0542	0.02	E1 S1	0	0.0824	0.07	E1 S1	0	0.1507	0.06
	6	0.2820	0.02		6	0.3371	0.02		6	0.2178	0.08
	12	0.2827	0.06		12	0.7967	0.63		12	0.1968	0.07
E1 S2	0	0.0748	0.02	E1 S2	0	0.0687	0.01	E1 S2	0	0.2178	0.03
	6	0.7464	0.32		6	0.7663	0.03		6	0.3368	0.08
	12	0.5528	0.09		12	0.4971	0.46		12	0.3069	0.09
E1 S3	0	0.0699	0.01	E1 S3	0	0.0889	0.02	E1 S3	0	0.1634	0.07
	6	1.1107	0.38		6	1.6236	0.03		6	0.3735	0.10
	12	1.4410	0.15		12	1.7682	0.08		12	0.3599	0.10
E2 S1	0	0.0766	0.02	E2 S1	0	0.0752	0.03	E2 S1	0	0.1507	0.06
	6	0.3744	0.03		6	0.5033	0.01		6	0.2120	0.10
	12	0.4188	0.05		12	0.4904	0.09		12	0.2341	0.06
E2 S2	0	0.0884	0.02	E2 S2	0	0.0775	0.02	E2 S2	0	0.2178	0.03

37 °C, 150 rpm				45 °C, 150 rpm				55 °C, 150 rpm			
Muestra	T (h)	[G] g/L Prom	DS	Muestra	T (h)	[G] g/L Prom	DS	Muestra	T (h)	[G] g/L Prom	DS
	6	0.7887	0.03		6	1.0035	0.11		6	0.3908	0.08
	12	0.7370	0.10		12	0.9270	0.11		12	0.2854	0.10
E2 S3	0	0.0766	0.02	E2 S3	0	0.0956	0.01	E2 S3	0	0.1634	0.07
	6	1.8436	0.20		6	1.9401	0.10		6	0.5546	0.26
	12	2.0976	0.11		12	2.3248	0.18		12	0.6978	0.24
E3 S1	0	0.0741	0.02	E3 S1	0	0.0817	0.03	E3 S1	0	0.1507	0.06
	6	0.5539	0.03		6	0.6155	0.04		6	0.2966	0.07
	12	0.4400	0.04		12	0.6376	0.03		12	0.2041	0.05
E3 S2	0	0.0696	0.02	E3 S2	0	0.0761	0.02	E3 S2	0	0.2178	0.03
	6	1.1018	0.03		6	1.1595	0.09		6	0.3970	0.14
	12	0.8695	0.03		12	1.3681	0.11		12	0.3574	0.18
E3 S3	0	0.0752	0.02	E3 S3	0	0.2104	0.04	E3 S3	0	0.1634	0.07
	6	0.8965	0.16		6	0.9782	0.06		6	0.7551	0.20
	12	0.6551	0.11		12	0.5741	0.04		12	0.6781	0.18

d) RESULTADOS ENSAYOS DE HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA

Tabla 53. Resultados azúcares reductores y etanol en SSF e hidrólisis de control con Cellic®

Tiempo (d)	Fermentación con Cellic®						Hidrólisis con Cellic®	
	[G] (g/L)	DS(±)	% Etanol (v/v)	DS(±)	Etanol (g/L)	DS(±)	[G] (g/L)	DS(±)
0	0.292	0.02					0.250	0.06
0.5	22.679	1.85					26.932	1.51
2	5.951	0.76					20.405	5.71
3	5.343	0.98	1.45	0.12	11.489	0.97	33.692	1.22
4	4.470	0.48	1.41	0.27	11.111	2.13	13.883	4.26
5	3.758	0.70	1.47	0.21	11.629	1.70	10.755	0.66
6	3.709	0.73	1.39	0.14	10.991	1.10	8.318	1.03
7	3.483	0.31	1.36	0.18	10.756	1.39	7.579	0.74
8	3.384	0.69	1.41	0.20	11.134	1.56	7.079	0.78
9	3.017	0.82	1.42	0.24	11.179	1.91	7.270	1.01

** Densidad de etanol absoluto: 0.79g/mL

Tabla 54. Resultados de azúcares reductores y etanol en SSF e hidrólisis de control con extracto enzimático

Tiempo (d)	Fermentación con Extracto						Hidrólisis con extracto	
	[G] (g/L)	DS(±)	% Etanol (v/v)	DS(±)	Etanol (g/L)	DS(±)	[G] (g/L)	DS(±)
0	0.298	0.03					0.246	0.06
0.5	4.419	1.08					4.466	1.69
2	2.170	0.24					1.077	0.16
3	1.741	0.34	0.48	0.12	3.776	0.96	1.700	0.21
4	1.426	0.43	0.62	0.19	4.888	1.52	2.063	0.59
5	1.231	0.29	1.31	0.94	10.342	7.44	1.386	0.21
6	1.682	0.97	1.35	0.94	10.632	7.42	1.051	0.16
7	1.471	0.96	0.93	0.02	7.373	0.14	1.880	0.94
8	1.661	0.77	1.67	0.41	13.159	3.27	0.932	0.13
9	1.170	0.62	1.85	0.94	14.592	7.44	0.931	0.19

** Densidad de etanol absoluto: 0.79g/mL

Tabla 55. pH final de SSF e hidrólisis (9 días)

Muestra	pH Final	DS(±)
SSF con extracto enzimático	6.4	0.3
SSF con enzima Cellic®	6.2	0.4
Hidrólisis extracto enzimático	7.5	0.1
Hidrólisis enzima Cellic®	7.3	0.2