



## CONCEPTOS DE BIOCATÁLISIS DE LA LIGNOCELULOSA DESDE UN ENFOQUE DE INGENIERÍA DE PROCESOS Y SISTEMAS: UNA REVISIÓN.

Lignocellulose Biocatalysis Concepts from a Process and Systems Engineering Approach: a review.

	Gabriela Arianna Suárez Matallana
	Sara Rosa Sánchez Atahualpa
	Arnold Lazaro Riquez
	*Ursula Fabiola Rodríguez Zúñiga

Universidad de Ingeniería y Tecnología, Departamento de Ingeniería Química, Lima, Perú.

\*urodriguez@utec.edu.pe

### RESUMEN

La biomasa lignocelulósica es reconocida como materia prima renovable y abundante en el planeta y útil en plataformas de procesamiento para la producción de biocombustibles y/o biomoléculas de alto valor agregado. Este tipo de proceso de producción integrado es llamado "biorrefinería" y es intensamente estudiado debido a que su implementación todavía es obstaculizada por factores como el consumo energético en las etapas de pretratamiento, la carencia de una comprensión profunda de la sinergia de las enzimas celulasas, y la dificultad de estandarización de los procesos de conversión dada la variabilidad de materias primas y escalas de aplicación. Así, este trabajo propone una revisión global de los tópicos anteriormente mencionados asociados a los fundamentos de la composición y características de la lignocelulosa, así como ejemplos de moléculas derivadas significativas por su valor comercial. Desde esta perspectiva se propone hacer una colección de conocimientos necesarios para el entendimiento de las plataformas de procesamiento de la biomasa y la valorización de biomoléculas derivadas mediante herramientas de la Ingeniería de Procesos y Sistemas que permitan la identificación de rutas tecnológicas de base biológica sostenibles, rentables y flexibles.

**Palabras Clave:** Biorrefinería, Biomasa lignocelulósica, enzimas celulasas, Ingeniería de procesos y sistemas (PSE).

### ABSTRACT

Lignocellulosic biomass is recognized as a renewable and abundant raw material on the planet in processing platforms to produce biofuels and/or high value-added biomolecules. This type of integrated production process is called "biorefinery" and is intensively studied because its implementation is still hampered by factors such as energy consumption in the pretreatment stages, the lack of a deep understanding of the synergy of cellulase enzymes, and the difficulty of standardization of conversion processes given the variability of feedstocks and scales of application. Thus, this work proposes a global review of the aforementioned topics associated with the fundamentals of lignocellulose composition and characteristics, as well as examples of important derived molecules for their commercial value. From this perspective, a collection of knowledge necessary for the understanding of biomass processing platforms and the valorization of derived biomolecules is proposed using Process and Systems Engineering tools that allow the identification of sustainable, cost-effective and flexible bio-based technological routes.

**Keywords:** Biorefinery, Lignocellulosic biomass, cellulases enzymes, Biocatalysis, Process and Systems Engineering (PSE).

Fecha de recepción: 30-11-2021

Fecha de aceptación: 27-03-2022

Fecha de publicación: 01-08-2022

## I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la búsqueda de tecnologías limpias y renovables para la producción de combustibles y moléculas derivadas de alto valor agregado a partir de la biomasa lignocelulósica viene en aumento. No obstante, el uso de esta materia prima presenta varios retos, derivados de su composición y de la intrincada conformación estructural. Esto debido a que esta biomasa vegetal está constituida por macromoléculas como la celulosa, hemicelulosa y lignina, las cuales han sido diseñadas por la naturaleza para resistir los ataques físicos, químicos o biológicos y preservar su conservación en los ecosistemas terrestres (1,2).

Por esta razón, su procesamiento industrial de manera sostenible e integral aún representa un desafío en nuestros días por lo que, se proponen tanto vías termoquímicas como vías de base biológica para su aprovechamiento (1). La principal finalidad y ventaja de un enfoque biotecnológico es la valorización de cada molécula componente de la biomasa, más allá de la producción exclusiva de biocombustibles, mediante una descomposición selectiva de las macromoléculas en condiciones suaves elevando la viabilidad industrial de los proyectos asociados. Así es que surge el concepto de biorefinerías, debido a la necesidad de integración de varios procesos unitarios (pirólisis, gasificación, licuefacción, hidrólisis, etc.) asociados para producir una amplia gama de productos de base biológica. Como ventajas de este sistema integrado se pueden mencionar: la mejora de los rendimientos globales del proceso y la posibilidad de aplicación de la economía circular al promover una completa valorización de las fracciones resultantes de los procesos de fragmentación de la matriz vegetal (2,3). El concepto es análogo a una refinería de petróleo y conduce a largo plazo al incremento de la rentabilidad mediante la flexibilización de los tipos de productos.

En este contexto, la primera etapa de desconstrucción de la pared vegetal está representada por los métodos de pretratamiento cuyo principal objetivo es la separación de los componentes principales, los cuales son la celulosa, hemicelulosa y lignina (3, 4). La segunda etapa para la obtención de biocombustibles y/o aprovechamiento de moléculas contenidas en las corrientes generadas por estos pretratamientos, es la hidrólisis enzimática de la celulosa mediante el uso de complejos celulolíticos específicos que contienen mayoritariamente las enzimas

celulasas, complementadas con las llamadas enzimas accesorias (3). Además de la conocida sacarificación de la celulosa, hoy los complejos celulolíticos permiten también la degradación de fracciones de hemicelulosa y el uso de compuestos aromáticos de la lignina remanentes del procesamiento precedente. (4, 5).

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### BIOMASA LIGNOCELULOSICA

En términos generales, la biomasa es un material derivado de la reacción entre CO<sub>2</sub> en el aire, agua y luz solar y una de las fuentes de energía renovable más extendida y prometedora en la actualidad (6). Esta puede clasificarse en tres categorías en función a su procedencia como se muestra en la Tabla 1.

Tipo de biomasa lignocelulósica	Ejemplos
Residuos agrícolas	El rastrojo de maíz, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, cáscara de arroz.
Residuos forestales	Residuos de recolección de madera como ramas, follaje, raíces, aserrín.
Cultivos energéticos herbáceos o leñosos	Forraje perenne como <i>Miscanthus</i> , pasto varilla, pasto de pradera y especies forestales de rotación corta (eucalipto, álamo, robinia, sauce).

Tabla 1. Tipos de biomasa lignocelulósica y ejemplos. Fuente: (1), (7)

El valor de cada tipo de biomasa depende de sus propiedades físicas y químicas, además del tamaño de sus moléculas componentes y de la facilidad de extracción de su energía almacenada.

Estructuralmente, el material lignocelulósico está compuesto por especies denominadas macromoléculas como lo son lignina, hemicelulosa y celulosa, responsables de sus propiedades físico-químicas y de su conformación tridimensional, cuya representación puede ser visualizada en la Figura 1.

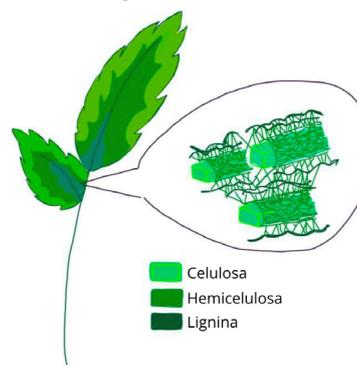


Figura 1. Representación esquemática de los componentes de la biomasa lignocelulósica. Fuente: Elaboración propia basado en (9)

Además, como componentes menores se mencionan las especies de baja masa molar, que pueden ser orgánicas (materia extractiva como taninos, estilbenos, lignanos, flavonoides, ácidos alifáticos, ésteres, terpenos; alcoholes) o inorgánicas (cenizas compuestas por minerales como potasio, calcio, magnesio, silicio) (8). Algunos conceptos relacionados con las propiedades y funcionalidades de los macrocomponentes importantes para la producción de moléculas derivadas se presentan en las siguientes secciones.

### A. Celulosa

La celulosa es uno de los biomateriales más abundantes en el planeta, representa alrededor de 40 a 50% de la biomasa en peso siendo considerado la fracción mayoritaria (10). Estructuralmente es un polímero polisacárido compuesto exclusivamente por monómeros β-D-glucopiranososa (glucosa) que forman cadenas lineales unidas mediante enlaces β-1,4-glucosídicos. La estructura de la celulosa, y los enlaces y fuerzas intermoleculares que mantienen unidas las microfibras de celulosa puede observarse en la Figura 2. Debido a su estructura, las cadenas de celulosa se unen por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals intermoleculares formando agregados (microfibrillas). Estos enlaces químicos que unen los átomos de oxígeno e hidrógeno de moléculas de glucosa adyacentes disponen las cadenas de celulosa de forma paralela y, pueden inducir al orden (cristalinidad) o al desorden (amorfismo) en la estructura molecular. En la Tabla 2, se mencionan algunas propiedades características importantes de la celulosa para su procesamiento.

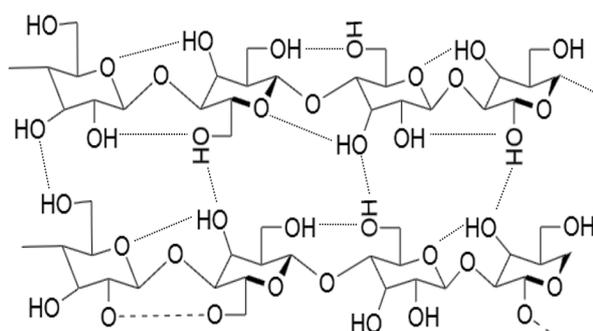


Figura 2. Estructura de la celulosa y enlaces inter e intra cadenas. Fuente: Elaboración propia basado en (9)

Propiedades		Descripción
Grado de polimerización		Desde 10000 hasta 15000 unidades de β-D-glucopiranososa
Regiones	Cristalina	Se encuentra en mayor proporción, es hidrofóbica y necesita tratamiento de mercerización, el cual es un tratamiento alcalino fuerte de hidróxido de sodio, para la obtención de celulosa hidrófila y accesible. Presenta mayor resistencia mecánica.
	Amorfa	Región más susceptible a tratamientos físicos, químicos y biológicos.
Degradación térmica		A partir de los 400°C, se registra la producción de subproductos aromáticos y/o biochar por pirólisis secundaria.

Tabla 2. Características importantes para el procesamiento de la celulosa. Fuente: (6); (11) (12).

### B. Hemicelulosa

Es un biopolímero heteropolisacárido, compuesto por diferentes monómeros: pentosas (xilosa y arabinosa) y hexosas (glucosa, manosa y galactosa). La columna vertebral de la hemicelulosa es una cadena ramificada unida principalmente por enlaces β-1,4-glucosídicos y en menor cantidad enlaces β-1,2 β-1,3; β-1,6-glucosídicos como se puede ver en la Figura 3.

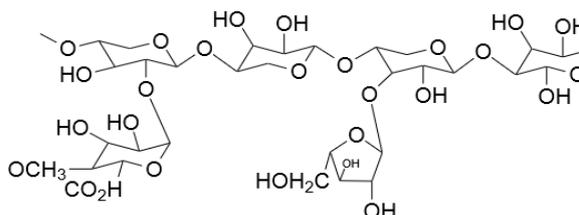


Figura 3. Estructura de la hemicelulosa. Fuente: Elaboración propia basada en (11)

Las hemicelulosas tienen menor masa molar que la celulosa y estructuralmente tienen como función servir de conexión entre la lignina y la celulosa gracias a las uniones no covalentes que forman con la superficie de las microfibrillas de celulosa (9, 10). Además, las hemicelulosas representan el componente más susceptible de sufrir transformaciones desde el punto de vista térmico y químico (11, 13). Para el caso de la celulosa, la remoción de al menos un 50% de la hemicelulosa incrementa de manera significativa su digestibilidad (14). Algunas características notables se observan en la Tabla 3.

Características	Descripción
Unidades monoméricas	Xilanos, mananos, galactanos y arabinogalactanos
Degradación térmica	Se da a partir de 180 a 350°C. Produce gases no condensables, carbón y una variedad de cetonas, aldehídos, ácidos y furanos.
Naturaleza onformacional	Amorfa, con propiedades adhesivas y tendencia a endurecerse cuando se deshidrata.

Tabla 3. Características principales de la Hemicelulosa. Fuente: (6); (15).

### C. Lignina

Es un heteropolímero no polisacárido presente en la pared celular constituido por compuestos aromáticos como las unidades de fenilpropano que se pueden observar en la Tabla 4. Estructuralmente, tiene las funciones de unir las fibras para mejorar la compacidad y resistencia mecánica de la planta.

Características	Descripción
Unidades monoméricas	Guaiacil propanol (alcohol de coniferilo), p-hidroxifenil propanol (alcohol cumarílico) y alcohol siringílico (alcohol sinapílico).
Degradación térmica	Se da a partir de los 200°C. Se obtienen productos fenólicos, así como también metanol, ácido acético y gases como CO <sub>2</sub> .
Naturaleza conformacional	Amorfa

Tabla 4. Características principales de la Lignina. Fuente: (6); (16).

La Figura 4 muestra la estructura de la lignina, con los tres alcoholes precursores cumarílico, conoferílico y sinapílico, en los cuales se observan grupos metoxilo e hidroxilo, que permiten la formación de los enlaces puente de hidrógeno y fuerzas intermoleculares como enlaces de Van der Waals. (6). La lignina también, es conocida por su efecto incrustante, ya que recubre las fibras vegetales, razón por la cual es identificada como una de las principales barreras al ataque químico y biológico (11, 17). Este componente es principalmente soluble en soluciones alcalinas, sin embargo, según su solubilidad en soluciones ácidas, puede clasificarse como insoluble y soluble. La lignina insoluble es el residuo remanente del tratamiento de las fibras vegetales con una solución de ácido sulfúrico al 72% a temperatura ambiente seguido de una hidrólisis con el mismo ácido al 3% y elevadas temperaturas (18, 19).

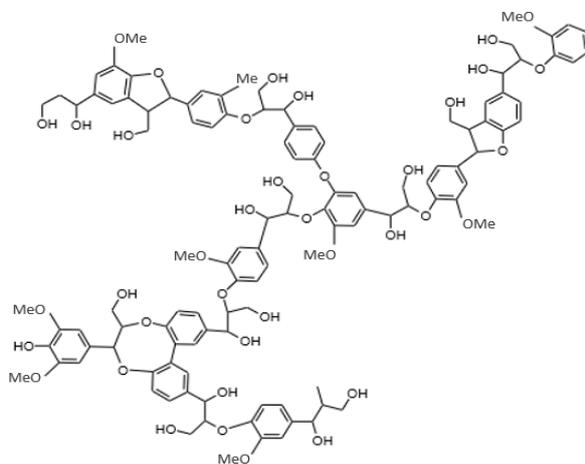


Figura 4. La estructura de la lignina y sus precursores. Fuente: Elaboración propia adaptado de (6).

El contenido de lignina en los diferentes tipos de plantas es variable, en madera es de 20 a 40% mientras que las especies acuáticas y herbáceas que son menos lignificadas, es de 21 a 14% respectivamente (8).

### PRODUCTO DE LOS DERIVADOS DE LOS COMPONENTES DE LA BIOMASA

#### A. Productos derivados de la celulosa

Varios subproductos derivados de la celulosa pueden ser de gran valor para el mercado. En la Tabla 5, se observan algunos ejemplos de subproductos y sus métodos de obtención, así como las industrias en las que se utilizan.

Subproducto	Fórmula química	Obtención	Industria de aplicación	Referencia
Azúcares (glucosa)	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Hidrólisis enzimática de la lignocelulosa pretratada.	Fermentación alcohólica para la producción de etanol.	(4), (5)
Ácido fórmico	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Reacción hidrotérmica oxidativa.	Agrícola, farmacéutica y de caucho.	(20)
Ácido acético	CH <sub>3</sub> -COOH	Hidrólisis ácida de la biomasa rica en celulosa en ausencia de oxígeno. También se puede obtener por fermentación el organismo Clostridium thermoacetium.	Alimentos (Vinagre), producción de acetato de vinil, ácido tereftálico y en menor cantidad para la producción de ésteres de acetato como aromatizantes.	(21) y (22), (23), (24)
Ácido levulínico	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Hidrólisis ácida de la biomasa.	Farmacéutica, polímeros, plásticos, resinas.	(21), (23), (25)
Hidroximetilfurfural (HMF)	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Deshidratación o degradación hidrotérmica de las hexosas.	Alimentaria. Para la formación de ácido acético o levulínico.	(21)
Ácido láctico	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Se usan 3 etapas: hidrólisis ácida de la celulosa en glucosa, isomerización de la glucosa en fructosa y conversión de fructosa en ácido láctico mediante reacciones de condensación aldólica de cetonas.	Alimentaria como acidificante o potenciador del sabor. Para la producción de ácido poliláctico (biopolímero).	(26)

Tabla 5. Subproductos valiosos derivados de la Celulosa.

Por ejemplo, se puede obtener ácido fórmico en solución mediante la oxidación de la glucosa obtenida a partir de la descomposición de la celulosa (20). Las condiciones de obtención del ácido fórmico son: una temperatura de 160°C y una presión de 3MPa, usando como catalizador el ion vanadilo (VO<sup>2+</sup>) (20). Una de las aplicaciones más prometedoras de este ácido es el almacenamiento energético mediante pilas de combustible usadas para la generación de electricidad y automóviles. Además, el ácido fórmico se usa como conservante con fines alimenticios y para obtención de hidrógeno, una fuente prometedora de energía limpia, ya que puede convertirse eficientemente en dióxido de carbono e hidrógeno mediante su rápida descomposición a través de una reacción hidrotermal o catalítica (27, 28).

### B. Productos derivados de la hemicelulosa

Para el caso de los derivados de la hemicelulosa, se seleccionaron como ejemplos de la Tabla 6, el furfural, xilitol y los xilooligosacáridos, los cuales tienen un impacto significativo en la industria.

Subproducto	Fórmula química	Compuesto	Obtención	Industria	Referencia
Furfural	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Aldehído heterocíclico y aromático compuesto por un anillo de furano con un grupo funcional aldehído lateral	Tratamiento con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Tintes, plástico, antiácidos, adhesivos, fertilizantes y compuestos saborizantes	(29)
Xilitol	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	Polialcohol	Hidrogenación de xilosa	Aditivo para pastas de dientes y chicles, productos para diabéticos y como agente para prevenir la caries.	(30)
Xilooligosacáridos		Carbohidratos no digeribles	Pretratamiento con explosión a vapor	Industria alimentaria en los lácteos como prebióticos y en panadería	(31)

Tabla 5. Subproductos valiosos derivados de la Celulosa.

### C. Productos derivados de la lignina

La división o ruptura de los enlaces tipo C-O predominantes en la estructura de la lignina conduce a su degradación en varias sustancias químicas sub categorizadas como fenoles, aldehídos y ácidos aromáticos (21). Algunos de los derivados de la lignina, así como los tipos de tratamiento aplicados para su obtención se visualizan en la Tabla 7.

Subproducto	Fórmula química	Obtención	Industria	Referencia
Vainilina	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Oxidación a altas temperaturas y presiones moderadas, de la lignina disuelta en medio alcalino.	Alimentos, cosmética	(32)
Catecol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	Ortofenilación del fenol con una oxidación a ortoquinona y su posterior reducción.	Farmacéutica para el tratamiento de Parkinson e hipertensión	(33)
Ácido benzoico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	Despolimerización oxidativa por medio de las enzimas lacasas y peroxidases	Farmacéutica (pasta de dientes, germicida)	(34)
Ácido ferúlico	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	Condensación de la vainillina con ácido malónico catalizada por la piperidina o hidrolisis alcalina de lignina soluble en medio ácido.	Cosméticos como antioxidantes	(35), (36)

Tabla 7. Subproductos valiosos derivados de la lignina.

Actualmente, los subproductos derivados de la lignina vienen siendo intensamente investigados debido a la compleja estructura de esta macromolécula que dificulta el procesamiento posterior y la valorización de este biopolímero (37). Una posible ruta para superar los problemas antes mencionados es el uso de la lignina a nanoescala con propiedades mejoradas en relación con el área superficial que facilitan las interacciones químicas y físicas necesarias para aplicaciones farmacéuticas y cosméticas (38).

### MÉTODO DE DESCONSTRUCCIÓN DE LA MATRIZ LIGNOCELULÓSICA

Existen varios métodos de pretratamiento de la biomasa cuyo impacto se refleja tanto en las propiedades fisicoquímicas del producto objetivo, en los procesos aguas abajo conducentes a su

recuperación, concentración y purificación, como en la generación y manejo de residuos de toda la biorrefinería. Para seleccionar el método más adecuado, este debe minimizar el consumo de energía, hacer uso eficiente del catalizador a utilizar y evitar la formación de inhibidores (39). En la Tabla 8, se presenta una comparación entre los métodos químicos de pretratamiento más investigados en la literatura.

Método	Mecanismo de acción	Biomasa de aplicación	Condiciones de Operación	Referencia
Explotación a vapor	Promover la descomposición de la matriz lignocelulósica mediante la combinación de fuerzas mecánicas y químicas.	Rastrojo de maíz, paja de cebada, fibra de coco, paja de triticale, sorgo dulce, eucalipto.	Presión: 1 a 1.5 MPa Temperaturas: 150 °C a 300 °C.	(40) (21) (41) (42) (43) (44)
Agua caliente	Solubilizar la hemicelulosa en medio ácido resultante de las condiciones.	Bagazo de caña de azúcar, pino taeda, rastrojo de maíz, etc.	Presión: la suficiente para mantener líquido a temperaturas: 160°C a 214 °C.	(29) (45) (46)
Ácido	Solubilizar parte de la lignina e hidrolizar hemicelulosa mediante el uso de ácidos.	Paja de trigo, rastrojo de maíz, paja de girasol, cáscara de arroz, pino, etc.	Condición baja severidad: 180°C por tiempo corto ~ 5 min. Condición media o alta severidad: 120°C por tiempo largo (30-60 min). Ácido usados H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCl, HNO <sub>3</sub> , H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a concentraciones de 5-15% w/w.	(21) (29) (47) (48)
Alcalino	Solubilizar la lignina mediante la saponificación e hidrolizar parte de la hemicelulosa con soluciones básicas.	Paja de arroz, rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar, paja de girasol	Condición 1: 140°C a 175°C por cortos periodos de tiempo (1 a 1.5 h), Condición 2: (50°C a 90°C) por periodos más largos de tiempo (3 a 72h). Los álcalis usados son: NaOH, KOH, NH <sub>4</sub> OH, CaOH <sub>2</sub> , CaCO <sub>3</sub> . Las concentraciones varían de 5-15% w/w	(49) (43) (21) (50)
Solventes orgánicos	Solubilizar la lignina y la hemicelulosa e incrementar el área de acceso a la celulosa.	Paja de trigo, madera de eucalipto, rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar.	Se da entre las temperaturas de 100°C a 250 °C. Se usan varios solventes orgánicos como el metanol o etanol, al 50 o 60% w/v	(43) (51)

**Tabla 8.** Métodos de pretratamiento para la obtención de los componentes de la biomasa.

La generación y concentración de los subproductos en las corrientes generadas en los pretratamientos dependen del agente

químico usado y, en general de la severidad aplicada, por ejemplo, los pretratamientos ácidos generan, como subproductos el furfural, el hidroximetilfurfural y los ácidos acéticos y/o levulinico, etc. En el caso de los derivados de los tratamientos alcalinos y solventes orgánicos las corrientes generadas contienen fracciones aromáticas de la lignina y/o oligómeros de la hemicelulosa (43, 50, 51).

### HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA BIOMASA

La vía biológica de procesamiento integral de la biomasa presenta como etapa siguiente al pretratamiento, la hidrólisis enzimática de la fracción insoluble compuesta principalmente por celulosa y fracciones menores de hemicelulosa y lignina insolubles. Los biocatalizadores de esta reacción son complejos enzimáticos celulolíticos específicos, y el principal producto consiste en azúcares fermentables de glucosa derivados de la celulosa, siendo que también pueden obtenerse otras moléculas que representan bloques de construcción para un posterior procesamiento, como se mostró en la sección III. Estas enzimas tienen gran impacto en el costo de operación de todo el proceso de aprovechamiento de la biomasa por lo que su mejoramiento continuo favorece directamente la viabilización del concepto de biorrefinería en escalas comerciales. Podemos mencionar algunas iniciativas enfocadas en su desarrollo para aplicación a nivel industrial. Por ejemplo, la búsqueda estratégica y validación de combinaciones de preparados enzimáticos de celulasas y enzimas accesorias selectivas para alcanzar el mejor rendimiento de acuerdo a la variabilidad de la composición y estructura de la biomasa pretratada (52).

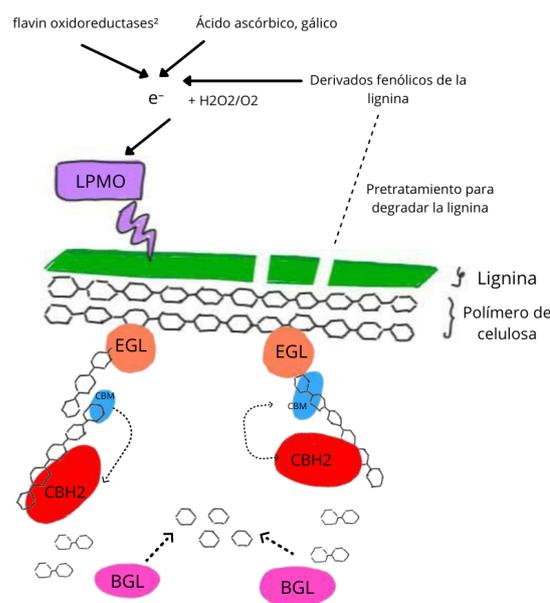
La estabilidad de las enzimas en ambientes industriales es diferente a escala de laboratorio lo que ofrece un desafío en la reproducibilidad de los resultados a mayores escalas. Así, su desarrollo también es orientado al mantenimiento de la actividad catalítica y del rendimiento en presencia de inhibidores y en ambientes severos que priorizan mayores cargas de sólidos y temperaturas más elevadas de reacción (53).

### D. Celulasas, enzimas accesorias y mecanismos

Las enzimas celulasas pertenecen a la clase de las hidrolasas, tradicionalmente han sido definidas como un complejo enzimático constituido por tres proteínas: endoglucanasa

(EG), exoglucanasa (CBH) y  $\beta$ -glucosidasa, las cuales tienen acción sinérgica sobre la celulosa para obtener glucosa (4). Convencionalmente se conocía que, durante la hidrólisis de la celulosa con celulasas, las fracciones de los otros componentes de la matriz vegetal remanentes de los procesos de pretratamientos perjudicaban este proceso porque actuarían como sustancias inhibitoras o barreras físicas. No obstante, desde el descubrimiento y aplicación de las enzimas monooxigenasas líticas polisacáridos (LPMOs) en los cocteles de celulasas, hace un poco más de una década, la visión de la acción celulolítica cambió y las LPMOs permitieron otorgar una función importante a las fracciones aromáticas derivadas de la lignina (54, 55). Las LPMOs se clasificaron en la base de datos de enzimas activas de carbohidratos "CAZY" como proteínas de "actividad auxiliar" (AA) (56). En esta base de datos, se encuentran las familias de LPMOs AA9, AA10, AA11, AA13, AA14 y AA15 de acuerdo a su microorganismo productor. (57).

Desde el punto de vista de su mecanismo de acción, las LPMO son enzimas dependientes de cobre que separan los enlaces glicosídicos en la fibra de celulosa mediante "pinchazos" en su superficie cristalina, oxidándola para liberar celooligosacáridos oxidados de varios tamaños. Mediante esta acción, se incrementa la accesibilidad para la intervención de las otras proteínas componentes de las celulasas (58, 59). La actividad de las LPMO requiere un co-sustrato de oxígeno, que originalmente se pensaba que era el O<sub>2</sub>, pero que también puede ser el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las mezclas de reacción típicas promueven reacciones secundarias por lo que todavía no se conoce bien la cinética de la reacción de la LPMO (54, 60). Las fracciones aromáticas de lignina, el ácido ascórbico, el glutatión reducido, el ácido ferúlico, la cisteína, y el galato son conocidos por ser agentes reductores (fuentes de electrones) de baja masa molar (61). Las reacciones de hidrólisis mediadas por LPMOs se llevan a cabo en condiciones aeróbicas estrictas y, por lo tanto, los reactores de hidrólisis deben ser diseñados con un espacio de cabeza suficiente para facilitar la transferencia de masa de oxígeno durante estas reacciones. (60). La Figura 5 presenta el mecanismo de acción de las LPMOs en sinergia con otros componentes del complejo de celulasas.



<sup>2</sup> CDH, GDH, AAO, PDH AAQO

Figura 5. Mecanismo de acción de las LPMO y su sinergia con otro componente celulosa para la hidrólisis de la celulosa. Fuente: (64)

Hoy además sabemos que las enzimas celulasas están acompañadas de hemicelulasas y enzimas degradantes de lignina (62). En el caso de las hemicelulasas, o xilanasas se agrupan de acuerdo con sus propiedades catalíticas, ya sean glucosilhidrolasas (GHs) que hidrolizan enlaces glicosídicos, o esterasas de carbohidratos (CEs) que hidrolizan enlaces éster (62). En el caso de la lignina, se utilizan las lacasas y las ligninas peroxidadas como enzimas auxiliares. En conjunto, estas enzimas degradan tanto la hemicelulosa como la lignina para aumentar la accesibilidad de las celulasas a la celulosa. (63)

## E. Preparaciones celulolíticas comerciales

La dosificación y formulación de un complejo enzimático adecuado para los diferentes tipos de materias primas lignocelulósicas pretratadas es un desafío abordado por varias empresas productoras de enzimas y centros de investigación a nivel mundial. De esta forma, estas empresas han lanzado varios "cócteles" enzimáticos comerciales para uso industrial cuya composición específica es generalmente desconocida (65, 66). Algunos ejemplos de preparados comerciales celulolíticos y sus características técnicas reportadas por las mismas empresas productoras se observan en la Tabla 9. El rango de temperaturas de la reacción de hidrólisis enzimática varía de 25-70°C.

Nombre comercial	Actividad específica predominante	Rango de pH	Microorganismo	Empresa
Celluzyme	Exoglucanasas I	4 - 10	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Thermomyces lanuginosus</i> , <i>Humicola</i> y <i>Aspergillus niger</i>	Novozymes
Carezyme	Endoglucanasas V	5 - 10.5	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Thermomyces lanuginosus</i> , <i>Humicola</i> y <i>Aspergillus niger</i>	Novozymes
Endolase	Endoglucanasas II	5 - 9	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Novozymes
Accellerase™ 1000	β-glucosidasa	4 - 6	<i>Trichoderma reesei</i>	Genencor
Accellerase® 1500	Exoglucanasas, endoglucanasas, hemi-celulasas, y beta-glucosidasas	4.6 - 5	<i>Trichoderma reesei</i>	Genencor
Spezyme® CP	β-glucanasas	4 - 6	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	DuPont
Celluclast	exo-b-glucanasa I, exo-b-glucanasa II, Endoglucanasas I y Endoglucanasas II	4.5-6.0	<i>Trichoderma reesei</i> y <i>Aspergillus niger</i>	Novozymes
Celllic® Ctec3	β-glucosidasas	3 - 7	<i>Trichoderma reesei</i>	Novozymes

**Tabla 9.** Datasheet de celulasas de diferentes empresas. Fuente: Adaptado de (67), (68), (69) y (70).

Por otro lado, con el objetivo de estandarizar la medida de la eficiencia de hidrólisis de los diferentes cócteles enzimáticos comerciales en diferentes sustratos es que se aplica un índice porcentual para expresar la relación entre los azúcares reductores producidos y la cantidad de celulosa contenida en la biomasa pretratada. Este índice es llamado porcentaje de sacarificación (71), el cual se obtiene mediante la Ecuación 1.

$$\% \text{ de sacarificación } f(t) = \frac{\text{Azúcares reductores liberados} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) \times 0.9 \times 100}{\text{Concentración de carbohidratos} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)} \quad (1)$$

La velocidad de hidrólisis del material lignocelulósico refleja la afinidad de los sitios activos de la enzima frente a un sustrato. Un índice de sacarificación alto (entre 70-80% en preparados de Cellic Cetec 2 y Accellerase con biomasa pretratada) significa una alta asociación de los sitios activos a la celulosa (66-70). En general, se puede mencionar que la acción sinérgica de actividades enzimáticas se refleja en una mejor velocidad de hidrólisis (71).

### III. RESULTADOS

#### INGENIERÍA DE PROCESOS Y SISTEMAS APLICADOS A LAS BIORREFINERÍAS

El concepto de biorrefinería surge desde una perspectiva de aprovechamiento integral de la biomasa lignocelulósica empleando todos sus componentes para obtener un conjunto de productos químicos y combustibles producidos en sistemas (procesos) holísticos y complejos (2, 21, 29). Esta visión sistémica del proceso integral permitiría la viabilización de las vías biológicas de transformación de la biomasa en escala comercial. Inicialmente, las etapas conceptuales de estimaciones técnico-económicas para el desarrollo de biotecnologías de aprovechamiento suelen tener indicadores favorables ya que es posible encontrar una gran disponibilidad de recursos de biomasa y residuos agrícolas y, además varias naciones promueven incentivos económicos a este tipo de industria emergente (72). Sin embargo, para el diseño sostenible de plataformas de biorrefinerías se requieren considerar aspectos como la madurez tecnológica del proceso, la rentabilidad, el desarrollo social e el impacto ambiental que nos permitan analizar el desempeño global del proceso desde diferentes perspectivas (2, 72). Así, el diseño de una biorrefinería sostenible debe ser evaluado en términos de criterios que no son fácilmente cuantificables, por lo que proponer indicadores (o métricas) para medir la sostenibilidad de un sistema debe seguir una metodología cuidadosa (72, 73).

Todas estas consideraciones dan pase al abordaje de Ingeniería Procesos y Sistemas (PSE), que abarca desde el modelado y el diseño del proceso (bio) químico hasta el análisis a nivel empresarial de la logística y de las cadenas de valor de los productos potenciales (2). En este contexto, una de las herramientas metodológicas es la jerárquica de Toma de Decisiones Multicriterio (MCDM de sus siglas en inglés), la cual permite considerar aspectos como la viabilidad operacional, económica, ambiental y social de manera escalonada y ponderada (73,74).

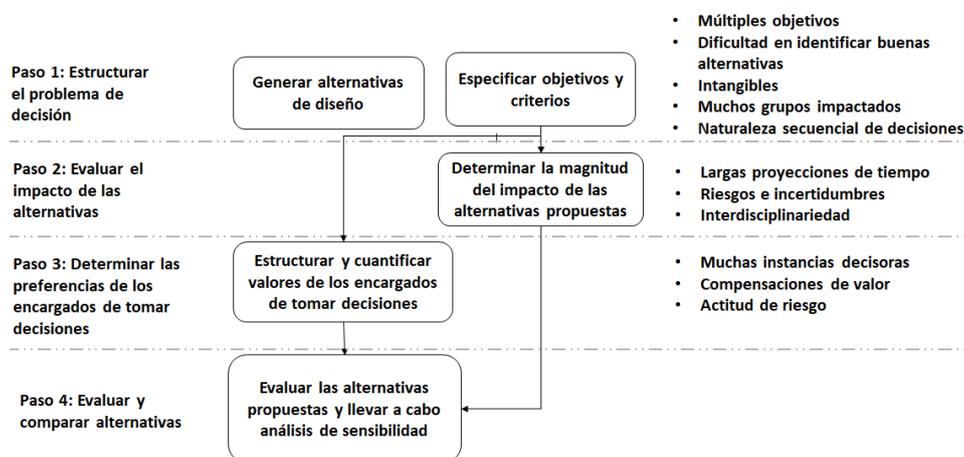
Primero, la MCDM permite la identificación de plataformas tecnológicas de biorrefinería más prometedoras utilizando un conjunto de indicadores (criterios) que se observan en la Tabla 10 (2). La selección de rutas tecnológicas por parte de un panel multidisciplinario considerará todos estos indicadores con diferentes ponderaciones, las cuales variarán en

función de los intereses económicos-productivos, las normas vigentes y las condiciones del mercado. De este modo, se asegura que el criterio que tiene mayor importancia obtenga un rol más notorio en la toma de decisión final. A partir de los valores y pesos se logra obtener un puntaje de viabilidad técnico-económica y de sostenibilidad para cada alternativa considerada en diferentes escenarios. Cabe destacar que las metodologías desarrolladas y utilizadas en el marco de este enfoque sólo serán aplicables caso por caso. (73)

Con todos estos puntos expuestos, es necesario recalcar que se necesita una comprensión minuciosa y detallada de cada proceso a ser evaluado con la metodología MCDM (73,75) y 74). La MCDM incluye tres análisis: mercado, económico y medioambiental. Los datos del mercado incluyen varias heurísticas que servirán para determinar las necesidades de los consumidores, la presencia de mercados especializados o de productos básicos, y la capacidad de las biorrefinerías para satisfacer estas necesidades (74). En relación con la conceptualización del proceso se ha propuesto algoritmos de generación que permiten incluir rutas de síntesis para la creación de superestructuras de procesos (73). A continuación, las rutas se pueden restringir utilizando diversas heurísticas y se seleccionan las mejores opciones. Hay que tener en cuenta que el producto químico de la plataforma a ser evaluada debe ser un producto básico para soportar la capacidad de producción del proceso. En la segunda etapa, se repite el proceso, utilizando los productos de plataforma como materia prima y generando matemáticamente una familia derivada de productos. Una vez más, se utiliza la heurística, pero esta vez se elimina la condición de producto básico. El resultado se evalúa mediante análisis técnico-económico o por simulaciones Monte Carlo como reportado en Sammons et al. (76). Las combinaciones resultantes se introducen en el MCDM como opciones potenciales. Un ejemplo de la complejidad de la metodología es es ilustrada en la Figura 6.

Criterio	Definición	Métodos	Indicadores	Comentarios
Análisis de Mercado	Identificación de los productos y su evaluación según el análisis FODA <sup>1</sup> .	Proyecciones para 3 opciones: caso base, caso optimista y caso pesimista.	CPC (competitividad de costos de producción) y QR (calidad de los ingresos).	Se registran el precio y la demanda de los productos durante un año
Técnico - económico	Evaluación de la viabilidad técnica y sostenibilidad en términos económicos, sociales y técnicos del proyecto	Diseño de Procesos Químicos Análisis de procesos considerando las eficiencias de reacción, balances de masa y energía Cálculos de costos de capital (CAPEX) y costos de operación (OPEX)	Eficiencias de ruta de reacción. Toxicidad de materias primas e insumos. Cantidad de subproductos generados en la ruta de reacción IRR (tasa interna de retorno), ROCE (retorno de capital empleado)	Registrar la disponibilidad de la materia prima y su costo. Evaluar la relación costo/rendimiento según la tecnología.
Análisis de Ciclo de vida (LCA)	Herramienta de evaluación de sostenibilidad ambiental de las opciones tecnológicas y el uso eficiente de recursos.	Cuantificación de residuos y subproductos del proceso, su disposición y efectos en salud y ambiente	GHG (emisiones de gases de invernadero), NRRM (uso de recursos no renovables),	Evaluar los efectos de productos / residuos en la salud de las generaciones actuales y futuras y del ecosistema.
Análisis de la Cadena de suministros (SC)	Mide el nivel de flexibilidad del proyecto para mitigar el riesgo de volatilidad del mercado.	Diseño del proceso y sus alternativas, Diseño de la cadena de suministros.	MR (métrica de robustez)	Cómo aprovechar el beneficio en un mercado volátil.

**Tabla 10.** Análisis correspondiente para la toma de decisiones multicriterio (MCDM). Fuente: Adaptado de (2). 1FODA: Fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas.



Además, la comparación de alternativas debe incluir criterios de sostenibilidad con herramientas como el análisis de ciclo de vida.

Pues, las biorrefinerías como toda industria química presentan una serie de impactos directos e indirectos sobre el medio ambiente, requiriéndose una evaluación sistemática de los mismos (2, 72).

Como se ha revisado en este trabajo, las plataformas de base biológica presentan muchas oportunidades de productos de alto valor agregado asociadas a desafíos multifactoriales, por lo que los análisis técnico-económicos representan estudios básicos y necesarios una vez que los fundamentos científicos en esta materia se han consolidado

#### IV. CONCLUSIONES

El presente trabajo brindó una revisión bibliográfica de temas que fundamentan la

teoría para la aplicación del procesamiento integrado de la biomasa desde una perspectiva de biorrefinerías.

Los temas presentados son la composición de la biomasa lignocelulósica, las posibilidades de tecnologías de pretratamiento, ejemplos de subproductos cuyo valor comercial es interesante para la viabilidad económica de los proyectos, y biocatálisis con la introducción de los tipos cócteles enzimáticos, su acción catalítica en diferentes sustratos y su oferta comercial.

Además, con la finalidad de integrar y procesar toda esta información se presentaron los criterios usados en la Ingeniería de Procesos y Sistemas y en la metodología de Toma de Decisiones Multicriterio, cuya jerarquía puede ser direccionada a la comparación de oportunidades generadas por tecnologías prometedoras de base biológica desde un enfoque multidisciplinario.

#### V. REFERENCIAS

1. Ullah K, Kumar Sharma V, Dhingra S, Braccio G, Ahmad M, Sofia S. Assessing the lignocellulosic biomass resources potential in developing countries: A critical review. *Renew Sustain Energy Rev* [Internet]. 2015 [citado 3 noviembre 2021]; 51: 682–698. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.044>
2. Mansoornejad B, Sanaei S, Gilani B, Batsy DR, Benali M, Stuart PR. Designing Integrated Biorefineries Using Process Systems Engineering Tools. En: Rabaçal M, Ferreira AF, Silva CAM, Costa M, editores. *Biorefineries: Targeting Energy, High Value Products and Waste Valorisation* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [citado 3 noviembre 2021]. p. 201-26. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48288-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48288-0_8)
3. Singhanian RR, Adsul M, Pandey A, Patel AK. Cellulases. En: Pandey A, Negi S, Soccol CR, editores. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Amsterdam: Elsevier; 2017. p. 37-101.
4. Singh J, Kundu D, Das M, Banerjee R. Chapter 24 - Enzymatic Processing of Juice From Fruits/Vegetables: An Emerging Trend and Cutting Edge Research in Food Biotechnology. En: Kuddus M, editor. *Enzymes in Food Biotechnology* [Internet]. Academic Press; 2019 [citado 5 noviembre 2021]. p. 419-432. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00024-4>
5. Singhanian RR, Saini JK, Saini R, Adsul M, Mathur A, Gupta R, et al. Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *Penicillium janthinellum* cellulases. *Bioresour. Technol.* 2014; 169: 490–495.
6. Tursi A. A review on biomass: importance, chemistry, classification, and conversion. *Biofuel Res. J* [Internet]. 2019 [citado 3 noviembre 2021]; 6(2): 962-979. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.18331/BRJ2019.6.2.3>
7. Nagler A, Gerace S. First and second-generation biofuels: What's the difference. Laramie, WY: University of Wyoming Extension; 2020.
8. Fengel D, Weneger G. *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: De Gruyter; 1984.

9. Chávez-Sifontes M. La biomasa: fuente alternativa de combustibles y compuestos químicos. *An. Quím.* 2019, 115 (5): 399-407.
10. Brigham C. Chapter 3.22 - Biopolymers: Biodegradable Alternatives to Traditional Plastics. En: Török B, Dransfield T, editores. *Green Chemistry: An Inclusive Approach*. Ámsterdam: Elsevier; 2018. p.753-770.
11. Bajpai P. Structure of Lignocellulosic Biomass. En: *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2016 [citado 31 octubre 2021]. p. 7-12. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-981-10-0687-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-0687-6_2)
12. Ortiz-Toledo CO, Trujillo-Mozón CJ, Influencia de los tratamientos químicos de mercerizado, trimetoxisilanos y anhídrido maleico, sobre la estabilidad térmica de las fibras de lino [tesis final de grado]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2019.
13. Patel JP, Parsania PH. Characterization, testing, and reinforcing materials of biodegradable composites. En: Shimpi NG, editor. *Biodegradable and Biocompatible Polymer Composites* [Internet]. Woodhead Publishing; 2018 [citado 5 noviembre 2021]. P. 55–79. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100970-3.00003-1>
14. Cortes-Ortiz WG. Tratamientos Aplicables a Materiales Lignocelulósicos para la Obtención de Etanol y Productos Químicos. *J. Technol.* 2014; 13(1): 39-44.
15. Carpenter D, Westover TL, Czernik S, Jablonski W. Biomass feedstocks for renewable fuel production: a review of the impacts of feedstock and pretreatment on the yield and product distribution of fast pyrolysis bio-oils and vapors. *Green Chem* [Internet]. 2014 [citado 3 noviembre 2021]; 16(2): 384–406. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C3GC41631C>
16. Quesada-González, O, Torres-García E, Alfonso-Martínez FE. Estudio de la degradación térmica del residuo de la naranja. *Rev. cuba. quím* [Internet]. 2011 [citado 3 noviembre 2021]; XXIII(1): 25-33. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543722004>
17. Avgerinos GC, Wang DIC. Selective delignification for fermentation of enhancement. *Biotechnol Bioeng.* 1983; 25(1): 67–83.
18. Carvalho DM, Colodette JL. Comparative study of acid hydrolysis of lignin and polysaccharides in biomasses. *BioRes.* 2017; 12(4): 6907-6923.
19. Dence CW. The Determination of Lignin. En: Lin SY, Dence CW, editores. *Methods in Lignin Chemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1992. p. 33-61.
20. Wang W, Niu M, Hou Y, Wu W, Liu Z, Liu Q, et al. Catalytic conversion of biomass-derived carbohydrates to formic acid using molecular oxygen. *Green Chem* [Internet]. 2014 [citado 3 noviembre 2021]; 16(5): 2614-2618. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.001>
21. Haldar D, Kumar M. Lignocellulosic conversion into value-added products: A review. *Process Biochem* [Internet]. 2019 [citado 3 noviembre 2021]; 89:110-133. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.001>
22. Saka S, Miyafuji H, Koara Y, Kawamoto H, inventores; Saka S, asignado. Method for producing acetic acid using anaerobic microorganism and method for producing bioethanol. English Patent US8409832B2. 2013 Abr 2.
23. Wagner FS, Staff U. Acetic Acid. En: Kirk-Othmer, editors. *Encyclopedia of Chemical Technology* [Internet]. Oxford; John Wiley & Sons; 2014 [citado 23 de noviembre 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/0471238961.0103052023010714.a01>
24. Morales de la Rosa, S. Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos, [Tesis doctoral], Madrid: Universidad Autónoma de Madrid: 2015.
25. Song,J, Fan H, Ma J, Han B. Conversion of glucose and cellulose into value-added products in water and ionic liquids. *Green Chem*, [Internet], 2013, [Citado 3 noviembre 2021], 15(10), 2619. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C3GC41141A>
26. Marianou A, Michailof C, Ipsakis D, Triantafyllidis K, Lappas A. Cellulose conversion into lactic acid over supported HPA catalysts, *Green Chem*, [Internet], 2019, [Citado 3 noviembre 2021] 21(22), 6161-6178, Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C9GC02622C>

27. Aslam NM, Masdar MS, Kamarudin SK, Daud WRW. Overview on Direct Formic Acid Fuel Cells (DFAFCs) as an Energy Sources. *APCBEE Procedia*, [Internet], 2012, [Citado 4 noviembre 2021], 3, 33-39, ISSN 2212-6708, Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.apcb.2012.06.042>.
28. Rejal ZS, Masdar SM, Kamarudin SK. A parametric study of the direct formic acid fuel cell (DFAFC) performance and fuel crossover. *Int. J. Hydrog. Energy*. [Internet], 2014, [Citado 5 noviembre 2021]; 39: 10267–10274. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.149>.
29. Patel, A., Shah A. Integrated lignocellulosic biorefinery: Gateway for production of second-generation ethanol and value-added products. *JB&B*, 2021; 6(2), 108-128.
30. Cerioni JL, Santori GF, Nichio NN. Producción de Xilitol a partir de la hidrogenación de xilosa en fase acuosa con catalizadores de níquel. *InvJov* [Internet]. 2019 [citado 3 de noviembre de 2021]; 6 (Especial):53-4. Disponible en: <https://revistas.unlp.edu.ar/InvJov/article/view/6774>
31. Yue P, Hu Y, T R, Bian J, Peng, F. Hydrothermal pretreatment for the production of oligosaccharides: A review. *Bioresour. Technol.* [Internet], 2021, [Citado 3 noviembre 2021]; 343: 126075. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126075>.
32. Maeda M, Hosoya T, Yoshioka K, Miyafuji H, Ohno H, Yamada T. Vanillin production from native softwood lignin in the presence of tetrabutylammonium ion. *J Wood Sci*, [Internet]. 2018 [citado 5 noviembre 2021]; 64: 810–815, Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10086-018-1766-0>
33. Martínez-Vargas DX. Catalizadores complejos salen CO (ii), Fe (iii) y Cu (ii) soportados en SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y carbón activado, con selectividad para la obtención de catecol y 2,5- diformilfurano [Tesis doctoral]. México: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2016.
34. Domínguez-González A, Hernández-Soto R, Salgado-Román JM, Ardila-Arias AN, Hernández-Maldonado JA, Obtención de compuestos aromáticos por oxidación de lignina con lacasa inmovilizada en alginato. *AGRO*, [Internet], 2018, [Citado 5 noviembre 2021]; 52: 191-202. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v52n2/2521-9766-agro-52-02-191-en.pdf>
35. McCarthy AL, O'Callaghan YC, Connolly A, Piggott CO, FitzGerald RJ, O'Brien NM. Phenolic extracts of brewers' spent grain (BSG) as functional ingredients – Assessment of their DNA protective effect against oxidant-induced DNA single strand breaks in U937 cells. *Food Chem* [Internet]. 2012 [Citado 5 noviembre 2021]; 134(2): 641–646. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.133>
36. Pacheco MI. Obtención de ácido Ferúlico a partir de un concentrado de la hidrólisis alcalina del maíz [Tesis Master]. Hermosillo: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) Sonora; 2015.
37. Matsakas L, Karnaouri A, Cwirzen A, Rova U, Christakopoulos P. Formation of lignin nanoparticles by combining organosolv pretreatment of birch biomass and homogenization processes. *MDPI*, [Internet]. 2018 [citado 3 noviembre 2021]; 23. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules23071822>
38. Low LE, Teh KC, Siva SP, Chew IM, Mwangi WW, Chew CL, et. al. Lignin nanoparticles: The next green nanoreinforcer with wide opportunity. *Environ. Nanotechnol Monit Manag* [Internet]. 2016 [Citado 10 noviembre 2021]; 15(5). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100398>
39. De Bhowmick G, Sarmah AK, Sen R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresour Technol*, [Internet]. 2018 [Citado 4 noviembre 2021]; 247: 1144–1154. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.163>
40. Katsimpouras C, Zacharopoulou M, Matsakas L, Rova U, Christakopoulos P, Topakas E. Sequential high gravity ethanol fermentation and anaerobic digestion of steam explosion and organosolv pretreated corn stover. *Bioresour Technol*. 2017; 244:1129-1136.
41. Oliva JM, Negro, MJ, Manzanares P, Ballesteros I, Chamorro MA, Sáez F. et al. Sequential Steam Explosion and Reactive Extrusion Pretreatment for Lignocellulosic Biomass Conversion within a Fermentation-Based Biorefinery Perspective. *MDPI* [Internet]. 2017. [citado 6 noviembre 2021]; 3(15). Disponible en: <https://doi.org/10.3390/fermentation3020015>

42. Kumar B, Bhardwaj N, Agrawal K, Chaturvedi V, Verma P. Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. *Fuel Process Technol* [Internet]. 2020 [citado 3 noviembre 2021]; 199: 106244. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106244>.
43. Rezania S, Oryani B, Cho J, Talaiekhazani A, Sabbagh F, Hashemi B. et al. Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. *Energy*, [Internet]. 2020 [citado 3 noviembre 2021]; 199: 117457. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117457>
44. Singh J, Suhag M, Dhaka A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. *Carbohydr. Polym.*, [Internet]. 2015 [citado 3 noviembre 2021]; 117: 624–631. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.012>
45. Gurgel-da Silva AR, Torres Ortega CE, Rong BG. Techno-economic analysis of different pretreatment processes for lignocellulosic-based bioethanol production. *Bioresour Technol*. [Internet]. 2016 [citado 6 noviembre 2021]; 218:561-570. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.007>.
46. Biswas R, Uellendahl H, Ahring, BK. Wet Explosion: a Universal and Efficient Pretreatment Process for Lignocellulosic Biorefineries. *Bioenerg. Res.* [Internet]. 2015 [citado 10 noviembre 2021]; 8: 1101–1116. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12155-015-9590-5>
47. Bhutto AW, Qureshi K, Harijan K, Abro R, Abbas T, Bazmi A. et al. Insight into progress in pretreatment of lignocellulosic biomass. *Energy* [Internet]. 2017 [citado 3 noviembre 2021]; 122: 724–745. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.01.005>.
48. Jaisamut K, Paulová L, Patáková P, Kotúčová S, Rychtera M. Effect of sodium sulfite on acid pretreatment of wheat straw with respect to its final conversion to ethanol. *Biomass Bioenergy* [Internet]. 2016 [citado 5 noviembre 2021]; 95: 1–7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.08.022>
49. Nosratpour MJ, Karimi K, Sadeghi M. Improvement of ethanol and biogas production from sugarcane bagasse using sodium alkaline pretreatments. *J. Environ. Manage* [Internet]. 2018 [citado 3 noviembre 2021]; 226: 329–339. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.058>.
50. Mankar AR, Pandey A, Modak A, Pant KK. Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresour Technol* [Internet]. 2021 [citado 6 noviembre 2021]; 334:125235. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125235>
51. Arjan S, Wouter H. Effective fractionation of lignocellulose in herbaceous biomass and hardwood using a mild acetone organosolv process *Green Chem* [Internet]. 2017 [citado 6 noviembre 2021]; 19:5505-5514, Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C7GC02379K>
52. Volynets B, Ein-Mozaffari F, Dahman Y. Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. *Green Process. Synth.* 2017; 6: 1–22.
53. Chen H, Fu X. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renew Sustain Energy Rev* 2016; 57: 468–478.
54. Forsberg Z, Mackenzie AK, Sorlie M, Rohr AK, Helland R, Arvai AS, et al. Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide monoxygenases. *Proc Natl Acad Sci* 2014; 111 (23): 8446–8451.
55. Westereng B, Agger JW, Horn SJ, Vaaje-Kolstada G, Aachmann FL, Stenstrøm YH, et al. Efficient separation of oxidized cello-oligosaccharides generated by cellulose degrading lytic polysaccharide monoxygenases. *J Chromatogr A.* 2013; 1271: 144–152.
56. Levasseur A, Drula E, Lombard V, Coutinho PM, Henrissat B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol Biofuels.* 2013; 6 (1): 41.
57. Lombard V, Ramulu HG, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acid Res.* 2014; 42 (D1): D490–D495.
58. Hemsworth GR, Ciano L, Davies GJ, Walton PH. Production and spectroscopic characterization of lytic polysaccharide monoxygenases. *Methods Enzymol.* 2018; 613: 63–90.

59. Valenzuela SV, Ferreres G, Margalef G, Pastor FIJ. Fast purification method of functional LPMOs from *Streptomyces ambofaciens* by affinity adsorption. *Carbohydr Res*. 2017; 448: 205–211.
60. Kracher D, Scheiblbrandner S, Felice AKG, Breslmayr E, Preims M, Ludwicka K, et al. Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation. *Science*. 2016; 352: 1098–1101.
61. Eijsink VGH, Petrovic D, Forsberg Z, et al. On the functional characterization of lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs). *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2019 [citado en 10 de enero 2022]; 12:58. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1392-0>
62. Chylenski P, Petrovic DM, Müller G, Dahlstrom M, Bengtsson O, Lersch M, et al. Enzymatic degradation of sulfite-pulped softwoods and the role of LPMOs. *Biotechnol. Biofuel*. 2017; 10: 177.
63. Kumar, Bikash & Verma, Pradeep. Enzyme mediated multi-product process: A concept of bio-based refinery. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2020 [citado 3 noviembre 2021]; 154. 112607. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112607>.
64. Singhanian R, Dixit P, Patel AK, Giri BS, Kuo C, Chen C, et al. Role and significance of lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs) in lignocellulose deconstruction. *Bioresour Technol* [Internet]. 2021 [citado 3 noviembre 2021]; 335: 125261. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125261>.
65. Kubicek CP, Kubicek EM. Enzymatic deconstruction of plant biomass by fungal enzymes. *Curr Opin Chem Biol*. 2016; 35: 51–57
66. Singhanian RR, Patel AK, Pandey A, Ganansounou E. Genetic modification: A tool for enhancing beta-glucosidase production for biofuel application. *Bioresour. Technol*. 2017; 245: 1352–1361
67. Novozymes: Bioenergy. Enzymes for biomass conversion [Internet], Copenhagen, Dinamarca: [consultado 5 noviembre 2021] Disponible en: <https://biosolutions.novozymes.com/en/bioenergy/biomass-conversion>
68. Ghose T K. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem*. 1987; 59(2): 257-268.
69. Acellerace 1500: Cellulase Enzyme Complex for Lignocellulosic Biomass Hydrolysis, [Internet], Delaware, Estados Unidos: Dupont [consultado 5 setiembre 2021]; Disponible en: [http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem010/manual/accelerace1500\\_Dupont.pdf](http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem010/manual/accelerace1500_Dupont.pdf)
70. Yang JE, Kim JK, Lee S H, Yu J, Kim KH. Evaluation of commercial cellulase preparations for the efficient hydrolysis of hydrothermally pretreated empty fruit bunches. *BioRes*. 2017; 12(4), 7834-7840.
71. Salcedo J, López J, Florez L. Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha de caña de azúcar. *Dyna*. 2011; 169:182-190.
72. Daoutidis P, Kelloway A, Marvin WA, Rangarajan S, Torres AI. Process systems engineering for biorefineries: new research vistas. *Curr Opin Chem Eng* [Internet]. 2013 [citado 3 noviembre 2021]; 2(4): 442–447. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.coche.2013.09.006>.
73. Sacramento-Rivero JC. A methodology for evaluating the sustainability of biorefineries: framework and indicators. *Biofuels Biopro. Bioref*. 2012; 6:32–44.
74. Dieudonne B, Solvason C, Sammons N, Chambost V, Bilhartz D, Eden M, et al. Product Portfolio Selection and Process Design for the Forest Biorefinery. En: Stuart P, El-Halwagi M. *Integrated Biorefineries: Design, analysis and Optimization*. Taylor and Francis Editors; 2012. P. 4-33.
75. Holladay JE, Bozell JJ, White JF, Johnson D. Top Value-Added Chemicals from Biomass-Volume II—Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin. En: Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) and the National Renewable Energy Laboratory (NREL) Staff. Oak Ridge; U.S. Department of Energy. 2007. p. 30-87.
76. Sammons NE, Yuan W, Eden MR, Askoy B, Cullinan HT. Optimal biorefinery product allocation by combining process and economic modeling. *Chem Eng Res Des*, 2008; 86: 800–808.