

---

# *Estudio de la cinética de la hidrólisis enzimática del bagazo pretratado*

Yaillet Albernas-Carvajal<sup>1\*</sup>, Gabriela Corsano<sup>2</sup>, Layanis Mesa Garriga<sup>1</sup>,  
Ronaldo Santos Herrero<sup>1</sup> y Erenio González Suárez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Análisis de Procesos. Facultad de Química y Farmacia. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½. Santa Clara. Cuba. <sup>2</sup>Instituto de Desarrollo y Diseño (CONICET-UTN). Avellaneda 3657 - (S3002GJC) Santa Fe, Argentina

---

*Study of enzymatic hydrolysis kinetic of pretreated bagasse*

*Estudi de la cinètica de la hidròlisi enzimàtica del bagàs pretractat*

*Recibido: 16 de abril de 2014; revisado: 17 de julio de 2014; aceptado: 19 de julio de 2014*

## RESUMEN

En el estudio se determinan los parámetros fundamentales de la cinética enzimática a partir de un modelo cinético pseudo-homogéneo de Michaelis-Menten, previamente estudiado con otros materiales lignocelulósicos, para determinar la velocidad de producción de Azúcares Reductores Totales (ART) en el tiempo. Para ello se emplearon los resultados obtenidos a nivel de laboratorio, en el cual se llevó a cabo la hidrólisis enzimática del bagazo previamente pretratado de forma ácida y básica. Se emplearon las enzimas Celulolíticas Novozyme Cellic<sup>®</sup>CTec2 y  $\beta$ -glucosidasa con código NS50010, en un experimento con un diseño factorial  $2^3$  haciendo réplicas al azar. Los valores de la constante de Michaelis-Menten y constante de inhibición determinados ( $K_M$  y  $K_I$ ) son intrínsecos al sistema de celulosa y celulasa dado, y son independientes de las variables de operación empleadas.

**Palabras clave:** Bagazo; hidrólisis enzimática; Michaelis-Menten; modelo cinético.

## SUMMARY

In this work, the enzymatic kinetic essential parameters are determined through the pseudo-homogeneous Michaelis-Menten kinetic model, which was previously studied using different lignocellulosic materials in order to establish the total reducing sugar (ART) production rate. For that purpose, experimental results of enzymatic hydrolysis of bagasse were used, where an acid and alkaline pretreatment was previously applied. The Novozyme Cellic<sup>®</sup>CTec<sup>2</sup> and  $\beta$ -glucosidase with code NS50010 Cellulolytic enzymes

were used, in a test with  $2^3$  factorial design and random replicas. The Michaelis-Menten constant and inhibition parameters ( $K_M$  and  $K_I$ ) are intrinsic to the given cellulose and cellulase system, and they are independent of the used operation variables.

**Key words:** Bagasse; enzymatic hydrolysis; Michaelis-Menten; Kinetic model

## RESUM

En l'estudi es determinen els paràmetres fonamentals de la cinètica enzimàtica a partir d'un model cinètic pseudo-homogeni de Michaelis-Menten, prèviament estudiat amb altres materials lignocel·lulòsics, per determinar la velocitat de producció en el temps de Sucres Reductors totals (SRT). Per a això es van emprar els resultats obtinguts a nivell de laboratori, en el qual es va dur a terme la hidròlisi enzimàtica del bagàs prèviament pretractat de manera àcida i bàsica. Es van emprar els enzims cel·lulolòtics Novozyme Cellic<sup>®</sup>CTec2 i  $\beta$ -glucosidasa amb codi NS50010, en un experiment amb un disseny factorial  $2^3$  fent rèpliques a l'atzar. Els valors de la constant de Michaelis-Menten i de la constant d'inhibició determinats ( $K_M$  i  $K_I$ ) són intrínsecs al sistema de cel·lulosa i cel·lulasa donat, i són independents de les variables d'operació utilitzades.

**Paraules clau:** Bagàs; hidròlisi enzimàtica; Michaelis-Menten; model cinètic.

---

\*Autor para la correspondencia: yailletac@uclv.edu.cu

## 1. INTRODUCCIÓN

Los modelos para la reacción de la hidrólisis enzimática se pueden clasificar dentro de dos categorías: tipo de modelo (*empírico o mecanístico*) y tipo de sustrato (*puro o impuro*). La mayoría de los modelos mecanísticos para esta reacción son o modelos Michaelis Menten con algún tipo de inhibición o modelos más detallados con múltiples reacciones. Esos modelos generalmente consideran múltiples reacciones debido a la acción de diferentes tipos de enzimas o diferentes sustratos (*crystalino y amorfo*) o una combinación de los dos. Los modelos más simplificados incluyen una sola expresión de velocidad de reacción para la hidrólisis, mientras que los modelos que consideran múltiples reacciones usan varias expresiones de velocidad y muchos parámetros.

En la tabla siguiente se relacionan las características básicas de la cinética, lo asumido, y la aproximación modelada de varios modelos establecidos en las diferentes etapas de la comprensión del complejo de reacciones de la hidrólisis de la celulosa.

**Tabla 1.** Características básicas de la cinética, lo asumido, y la aproximación modelada de varios modelos establecidos en las reacciones de la hidrólisis de la celulosa.

Estado del sustrato	Sistema enzimático	Aproximación cinética	Inhibición	Referencia
Material homogéneo	$E_{12}$	QSS	Competitiva	(Howell and Stuck, 1975)
Material homogéneo	$E_{123}$	MM	Competitiva	(Huang, 1975)
Grado de polimerización	$E_1, E_2, E_3$	MM	No Competitiva	(Okazaki and Moo-Young, 1978)
Material homogéneo	$E_{123}$	QSS	Competitiva	(Howell and Mangat, 1978)
Cristalino y amorfo	$E_{123}$	MM	-	(Peitersen and Ross, 1979)
Cristalino y amorfo	$E_{123}$	QSS	Competitiva	Ryu et al. (1982)
Material homogéneo	$E_{12}, E_3$	-	No Competitiva	(Fan and Lee, 1983)

$E_1$ , endo-glucanasa;  $E_2$ , celobiohidrolasas;  $E_3$ , celobiosa;  $E_{12}$  combina  $E_1$  y  $E_2$ ;  $E_{123}$  combina  $E_1$ ,  $E_2$  y  $E_3$ . QSS, estado cuasi estacionario; MM, Michaelis-Menten

Posteriormente se hicieron otros estudios en este sentido; en 1999, Ljunggren (1999) desarrolló un modelo cinético que incluye características o factores como inhibición de producto final de celobiosa y glucosa, desactivación de enzima y un nuevo parámetro de sustrato. El modelo se basa en reacciones homogéneas y heterogéneas, las cuales son influenciadas por el producto final y la desactivación de la enzima. En el 2003 Gan et al. (2003) presentan la cinética enzimática de la hidrólisis de la celulosa considerando un sistema de reacción heterogéneo sólido líquido. En el 2004, Li et al. (2004) desarrollan un modelo pseudo homogéneo de Michaelis Menten con inhibición competitiva, considerando sustrato soluble hipotético, empleando un método gráfico y en el 2007 González (2007) emplea un algoritmo de optimizaciones sucesivas a partir de valores iniciales de  $K_M$ ,  $V_m$  y  $K_i$ , mediante Runge Kutta de cuarto orden. Demuestra que el modelo de inhibición no competitiva se descarta para este caso.

Entre las ventajas de considerar Michaelis-Menten para este tipo de reacciones de hidrólisis enzimática, se encuentran:

- La aparente analogía entre la cinética enzimática y la cinética celular que ha sido ampliamente empleada para sugerir una estructura de la expresión cinética para la conversión de sustratos por células vivientes.
- Permite analizar diversos factores ambientales que influyen en la actividad enzimática como la temperatura, el pH, etc.
- Permite derivar expresiones una vez conocido el mecanismo de inhibición.
- Toma en consideración elementos relacionados con el mecanismo de hidrólisis enzimática.
- La expresión de Michaelis - Menten es mucho más robusta que el modelo de Monod de cinética celular, Villadsen et al. (2011).

El objetivo fundamental del presente trabajo es obtener el modelo cinético de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar pretratado.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Desarrollo de la hidrólisis enzimática del bagazo pretratado

La reacción de hidrólisis enzimática de la celulosa es catalizada por las enzimas celulasas, las cuales son altamente específicas. Los productos de la hidrólisis son usualmente azúcares reductores, incluyendo la glucosa. La reacción se lleva a cabo bajo condiciones suaves (pH: 4,8, T: 45-50°C). Al contrario de los catalizadores comunes, las enzimas presentan una elevada especificidad con respecto al sustrato, y su uso reduce la obtención de subproductos indeseables González (2007). La reacción de hidrólisis enzimática se caracteriza por un sustrato insoluble (celulosa) y un catalizador soluble (enzimas). Existen fundamentalmente tres tipos de celulasas en los sistemas completos: endoglucanasa, exoglucanasa o celobiohidrolasa y  $\beta$ -glucosidasa o celobiasa tal como lo aborda González (2007).

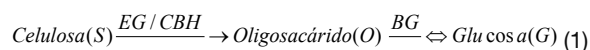
Para obtener las mejores condiciones en la obtención del hidrolizado se realizó un diseño factorial de experimentos  $2^3$  con réplicas al azar, empleando el bagazo pretratado anteriormente en las etapas de hidrólisis ácida y básica, Granado et al. (2013) y las enzimas Celulolíticas Novozyme Cellic<sup>®</sup>CTec2 y  $\beta$ -glucosidasa con código NS50010, el volumen de la segunda enzima fue del 10% del volumen total de enzima a utilizar. El experimento se realizó en beakers con un volumen de 25 mL de solución tampón HAc-acetato de sodio de pH 4,8 en zaranda a 2,5 rps (150 rpm). Para la determinación de los ART se aplicó la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a partir de la elaboración previa de la curva de calibración en un Espectrofotómetro Genesys 20 a 540 nm. Por el método de diferencia de pesada se determinó la lignina presente en el bagazo pretratado.

En el desarrollo de la hidrólisis enzimática las variables independientes estudiadas fueron la temperatura, en la cual el nivel inferior se corresponde con los mejores resultados de Mesa (2010) y el nivel superior 50 °C que es la óptima reportada por el fabricante de la enzima empleada. Las otras dos variables estudiadas fueron la concentración de enzima y de sustrato tomando los niveles de las mismas a partir de los estudios de Mesa (2010).

### Modelo cinético pseudo - homogéneo para la reacción de hidrólisis enzimática del bagazo

El mecanismo simplificado pseudo-homogéneo de Michaelis-Menten para determinar la velocidad de producción de ART en el tiempo, parte de que el azúcar se produce de un sustrato soluble hipotético cuya concentración inicial correspondería a la concentración de ART producida finalmente según lo planteado en las referencias González (2007) y Li et al. (2004).

Un esquema simplificado del mecanismo de reacción se muestra a continuación:

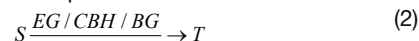


Donde:

**S:** Sustrato insoluble, **O:** Oligosacárido soluble, **G:** Glucosa, **EG:** Endoglucanasa, **CBH:** Celobiohidrolasa, **BG:**  $\beta$ -glucosidasa

El primer paso es la reacción heterogénea entre sustrato insoluble S y solución enzimática para producir el oligosacárido soluble O bajo la acción sinérgica de EG y CBH, la cual se considera como el paso que gobierna la velocidad global de reacción. El segundo paso es la reacción homogénea de los oligosacáridos para producir glucosa G, catalizada principalmente por la BG y con una velocidad de reacción mucho mayor que la del primer paso.

Si se considera que los oligosacáridos O liberados durante la reacción están formados en su mayor proporción por celobiosa, la suma de oligosacáridos y glucosa ( $T = O+G$ ), representan la fracción de los productos de la reacción que inhiben las enzimas celulasas. Considerando como único efecto inhibitorio, el esquema simplificado de reacción que se reduce a:



El modelo pseudo - homogéneo asume que T es producido a partir de un sustrato soluble hipotético cuya concentración durante la reacción corresponde a la diferencia entre la máxima cantidad de T producida durante la reacción, ( $T_{\infty}$ ) y la cantidad de T presente en el tiempo t. El nuevo sustrato ( $T_{\infty} - T$ ) se introduce en los modelos cinéticos de Michaelis-Menten.  $T_{\infty}$  es un nuevo parámetro del modelo cinético para el cual se halla una relación funcional con la concentración inicial de sustrato.

Según Li et al. (2004) y González (2007), la expresión para determinar la velocidad de reacción de la formación de ART en el tiempo es la siguiente:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{k E_0 (T_{\infty} - T)}{K_M [1 + (1/K_I)T] + 0,9(T_{\infty} - T)} \quad (3)$$

Donde:

$T_{\infty}$ : Representa el máximo valor de T (O+G) alcanzado durante la reacción

( $T_{\infty} - T$ ): Concentración de sustrato hipotético del modelo pseudo-homogéneo.

0,9: Relación entre el peso molecular de una unidad de glucosa en celulosa y el peso molecular de la glucosa.

k: Constante aparente que representa la frecuencia de enlace entre celulosa y celulosa

$K_M$ : Constante aparente de Michaelis - Menten que representa la afinidad entre la celulosa y la celulosa.

$K_I$ : Constante aparente de inhibición competitiva o no competitiva entre celulosa-glucosa y celulosa.

$E_0$ : Concentración inicial de la enzima.

Para un sistema dado los valores de k dependen de la eficiencia de contacto entre el sustrato insoluble y la solución de celulosa, de las propiedades del sustrato y condiciones de operación como tipo y tamaño del reactor, mezclado y concentración inicial de sustrato. Los valores de  $T_{\infty}$  dependen de las mismas variables anteriores, especialmente de la concentración inicial de sustrato. Por otro lado se asume que los valores de  $K_M$  y  $K_I$  son intrínsecos al sistema dado de celulosa y celulosa, y son independientes de las variables de operación descritas previamente.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Resultados experimentales de la hidrólisis enzimática

Los niveles de las variables estudiadas experimentalmente y explicadas en el epígrafe de la sección anterior fueron: *Variables independientes:*

$X_1$ : Temperatura: 38-50 °C

$X_2$ : Concentración de la enzima: 10-20 UPF/g  
CE (0,15-0,31mL/g)

$X_3$ : Concentración de sustrato: 5 - 10 %  
CS (50-100 g/L)

*Variable dependiente:*

Formación de Azúcares Reductores Totales (ART) g/L

En la tabla 2 se muestra la matriz experimental planteada, se hicieron réplicas al azar de los experimentos 1, 5, 6 y 8. También se muestran los valores máximos de ART obtenidos a las 48 horas de experimento.

Tabla 2. Matriz experimental para hidrólisis enzimática

Exp	$X_1$	$X_2$	$X_3$	ART max obtenido (g/L)
1	+	+	+	48,74
1-R	+	+	+	58,02
2	+	+	-	25,38
3	+	-	+	38,05
4	+	-	-	19,26
5	-	+	+	40,82
5-R	-	+	+	35,01
6	-	+	-	20,58
6-R	-	+	-	23,03
7	-	-	+	31,23
8	-	-	-	15,59
8-R	-	-	-	15,78

#### Obtención de los parámetros del modelo pseudo-homogéneo de Michaelis Menten

Aplicando dicha metodología propuesta por Li et al. (2004) se grafican los valores de  $T(O+G)$  (g/L) en el tiempo (t) obtenidos al final de la hidrólisis enzimática tomando como base de cálculo 100 kg de material.

En la figura 1 se observa la tendencia de la formación de ART en el tiempo de los experimentos realizados y sus réplicas, apreciándose como tendencia general que la mayor formación de azúcares ocurre en las primeras 5 a 15 horas, ya a partir de ese momento la formación de ART ocurre de forma más moderada.

Si se analiza el experimento 1-R y 8 se observa como en el 1-R la máxima formación de ART es de aproximadamente 58 g/L, siendo este valor mucho mayor que en el experimento 8 que es de 16 g/L, este comportamiento se debe a que en el 1-R la temperatura a la que se llevó a cabo el experimento fue de 50°C, siendo esta la temperatura de trabajo óptima reportada para esta enzima y en el 8 fue de 38°C que fue la óptima obtenida por Mesa (2010).

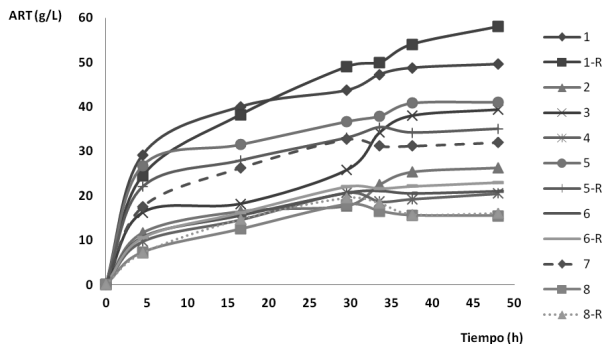


Figura 1. Formación de ART experimentales en el tiempo

Si se compara el 1-R con el 2, en el cual se mantienen constantes la temperatura y la concentración de enzima, se observa que a medida que es mayor la concentración de sustrato (1-R) mayor es la formación de ART, manteniéndose el mismo comportamiento en el caso de la concentración de la enzima en los experimentos 1-R y 3 en los cuales se evidencia claramente que a mayor concentración de enzima mayor será la formación de T notando una diferencia marcada de producción de ART de aproximadamente 18 g/L, Albernas (2014).

Siguiendo la metodología planteada por Li et al. (2004) se determina la  $T_{\infty}$  para los experimentos 1-R, 8 y 2 (figura 2) a partir de graficar  $T$  (O+G) en el tiempo. Se tomaron los experimentos 1-R y 8 por representar las condiciones de los extremos de las variables independientes y el 2 por representar un punto intermedio; lo cual permite que el experimento sea válido para todo el rango de las variables independientes estudiado.

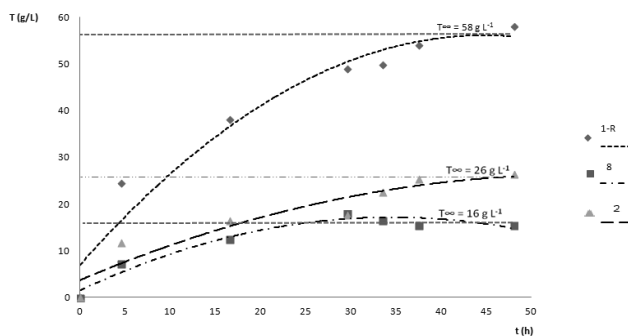


Figura 2. Determinación de  $T_{\infty}$

Posteriormente en la figura 3 se determina la velocidad inicial  $(dT/dt)_{t \rightarrow 0}$  a partir de la curva que muestra la evolución en el tiempo de T (g/L).

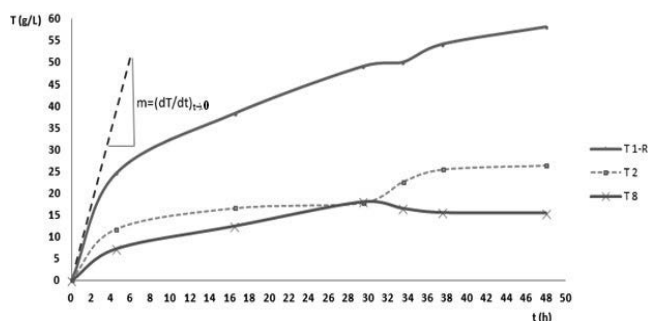


Figura 3. Determinación de  $(dT/dt)_{t \rightarrow 0}$

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de la figura anterior para la determinación de la velocidad inicial  $(dT/dt)_{t \rightarrow 0}$

Tabla 3. Determinación de la velocidad inicial  $(dT/dt)_{t \rightarrow 0}$

Experimentos	$(dT/dt)_{t \rightarrow 0}$	$1/(dT/dt)_{t \rightarrow 0}$	$T_{\infty}$	$1/T_{\infty}$
1-R	6,25	0,160	58	0,0172
2	3,57	0,280	26	0,0385
8	2,1	0,476	16	0,0625

A partir de los resultados obtenidos en la tabla anterior se grafica  $1/(dT/dt)_{t \rightarrow 0}$  vs  $1/T_{\infty}$ , en la misma se determina en intercepto y la pendiente de dicha recta obteniéndose así los valores de  $K_M$  y  $k$ .

Pendiente =  $K_M/kE_0$

Intercepto =  $0,9/kE_0$

$K_M = 217,49 \text{ g/L}$

$k = 0,735 \text{ h}^{-1}$

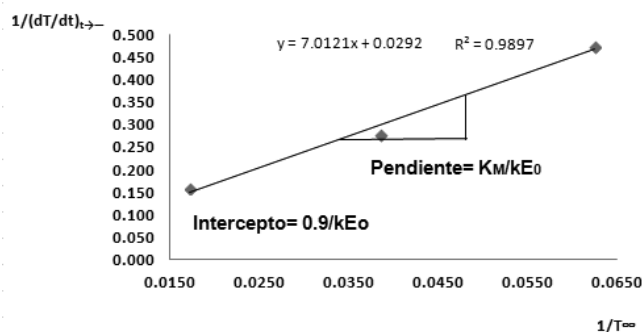


Figura 4. Determinación de  $k$  y  $K_M$

#### Análisis de la constante de Michaelis-Menten obtenida ( $K_M$ ).

La máxima concentración de sustrato que se utilizó fue de 100 g/L, esto quiere decir la mayor parte de los centros activos del complejo enzima-sustrato no están ocupados. Esto se debe a la presencia en el sustrato de lignina, que actúa como barrera entre el sustrato y la enzima. En reacciones enzimáticas en general, Lehninger (1981), plantea que cuando  $[S] \ll K_M$ , la velocidad de reacción es de primer orden con respecto al sustrato, aspecto que fue asumido en el desarrollo del presente modelo y da una medida de la adecuación del mismo.

#### Determinación de $K_I$ (Constante de inhibición)

Para determinar la constante de inhibición  $K_I$ , se integra la ecuación 4 bajo las condiciones iniciales y finales ( $T = T_0$  en  $t = 0$  y  $T = T$  en  $t = t$ , respectivamente) obteniendo la ecuación siguiente:

$$\frac{t}{0,9(T-T_0)} = \beta \frac{\ln \left[ \frac{(T_{\infty}-T_0)(T_{\infty}-T)}{(T_{\infty}-T)^2} \right]}{0,9(T-T_0)} - \gamma \quad (4)$$

o  $Y = \beta X - \gamma$ , donde

$$\beta = \frac{K_M}{kE_0} \frac{1}{K_I} \frac{1}{T_{\infty}} + \frac{K_M}{kE_0} \quad (5)$$

$$\gamma = \frac{1}{0,9} \frac{K_M}{kE_0} \frac{1}{K_I} - \frac{1}{kE_0} \quad (6)$$

$$Y \equiv \frac{t}{0,9(T-T_0)} \quad (7)$$

$$X = \frac{\ln\left[\frac{(T_{\infty} - T_0)}{(T_{\infty} - T)}\right]}{0,9(T - T_0)} \quad (8)$$

Se sustituyeron los valores de  $T$  (g/L) en el tiempo correspondientes a los experimentos 1-R y 8 en las ecuaciones 7 y 8 para calcular los valores de  $X$  y  $Y$ , los cuales satisfacen la ecuación de una línea recta.

Para determinar un simple valor razonable de  $K_i$  se trazan líneas rectas de  $X$  vs  $Y$  para los experimentos 1-R y 8 hasta obtener un intercepto que satisfaga simultáneamente las ecuaciones 5 y 6 para cada valor de concentración inicial de sustrato.

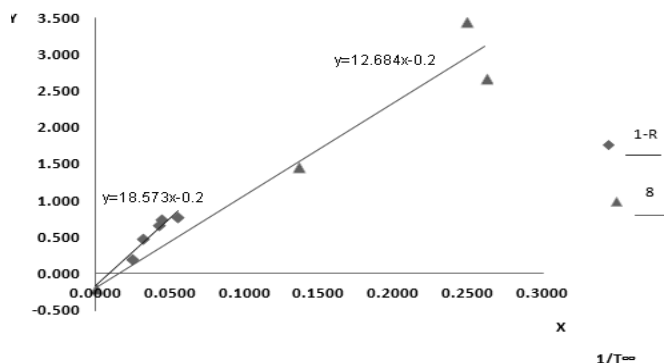


Figura 5. Determinación de  $\beta$  y  $\gamma$  para  $K_i$

Los resultados obtenidos son:

$$\beta = 18,57$$

$$\gamma = -0,2$$

$$K_i = 32,64 \text{ g/L}$$

Se asume que los valores de  $K_M$  y  $K_i$  son intrínsecos del sistema de celulosa y celulosa dado y que son independientes de las variables descritas anteriormente, al igual que lo aplicaron Li et al. (2004) y lo explica Albernas (2014).

#### Determinación de K (Constante de equilibrio)

Según el modelo planteado en la metodología reportada por Li et al. (2004) de  $G$  (g/L) vs  $T$  (g/L) se determina para el caso en cuestión los valores de  $G$  (g/L) -  $T$  (g/L), encontrando un modelo en el cual la pendiente es:

$$\text{Pendiente} = \frac{K}{K+1}$$

El valor de la constante de equilibrio,  $K$ , obtenido es de 3,35.

Después de calculados cada uno de los parámetros anteriores se sustituye en la ecuación 3 expresión general del modelo y se determina así la expresión de velocidad de reacción de la formación de ART en el tiempo siendo esta la siguiente:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{0,735 \cdot 42,2(58 - T)}{217,49 [1 + (1/32,6)T] + 0,9(58 - T)} \quad (9)$$

## 4. CONCLUSIONES

1. El experimento que mejores condiciones presenta en la etapa de hidrólisis enzimática es el experimento 1-R con la mayor producción de ART en el tiempo que es de 58 g/L con una concentración máxima de enzima y sustrato de 0,31 mL/g y 100 g/L respectivamente.
2. El valor de la constante de Michaelis - Menten para este complejo enzima sustrato es elevado ( $K_M=217,49$  g/L)

respecto a la máxima concentración de sustrato que se utilizó que fue de 100 g/L, lo que demuestra que la mayor parte de los centros activos del complejo enzima-sustrato no están ocupados, debido a la presencia de lignina en el material a hidrolizar, que actúa como barrera.

3. El modelo cinético desarrollado en el presente trabajo sirve como guía para la obtención de modelos cinéticos de hidrólisis enzimática de diferentes materiales lignocelulósicos, teniendo en cuenta que el mismo presenta las limitaciones siguientes:

- El valor de  $k$  depende de la eficiencia de contacto entre el sustrato insoluble y la solución de celulasa, de las propiedades del sustrato y condiciones de operación.
- El valor de  $T_{\infty}$  depende de las mismas variables anteriores y en especial de la concentración inicial del sustrato.
- Los valores de  $K_M$  y  $K_i$  son intrínsecos al sistema dado de celulosa y celulosa, y son independientes de las variables de operación descritas anteriormente (*al cambiar la enzima o el sustrato cambian estos valores y hay que repetir todo el procedimiento*)
- Teniendo en cuenta lo reportado por González (2007), solo se ajusta al mecanismo de inhibición competitiva.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCYT) y el Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de la República de Cuba (CITMA).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Albernas, Y., Procedimiento para la síntesis y el diseño óptimo de plantas discontinuas de obtención de bioetanol empleando bagazo de caña de azúcar., Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Técnicas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Departamento de Ingeniería Química, Santa Clara, 2014.
2. Fan, LT., & Lee, YH., Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: derivation of a mechanistic kinetic model., *Biotechnol Bioeng*, Vol. 14, 1983, pp. 2707-2733.
3. Gan Q., Allen S.J., & Taylor G., Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling., *Process Biochemistry*, Vol. 38, 2003, pp.1003-1018.
4. Granado J., Cornes, I., Albernas, Y., Corsano, G., González, E., Santos, R., y Mesa L., Aproximación de las expresiones cinéticas en las etapas de pretratamiento ácido y básico del bagazo., *Centro Azúcar*, Vol. 40, No. 4, Sept-Dic, 2013, pp. 8-15.
5. González, A., Hidrólisis enzimática de bagazo de caña; cinética y diseño preliminar de reactores., Trabajo presentado en opción al título de Ingeniero Químico, Universidad industrial de Santander, Escuela de Ingeniería Química Bucaramanga, 2007.
6. Howell, JA., & Stuck, JD., Kinetics of solka floc cellulose hydrolysis by *Trichoderma viride* cellulose., *Biotechnol Bioeng*, Vol. 17, 1975, pp. 873-893.
7. Howell, JA., & Mangat, M., Enzyme deactivation during cellulose hydrolysis., *Biotechnol Bioeng*, 20, 1978, pp. 847-863.

- 
8. Huang, AA., Kinetic studies on insoluble cellulose-cellulase system., *Biotechnol Bioeng*; 17, 1975, pp. 1421-1433.
  9. Lehninger, A., *Bioquímica, Segunda Edición*, Editorial Pueblo y Educación, Capítulo 8, 1981, pp. 189-218.
  10. Ljunggren, M., Kinetic analysis and modeling of enzymatic hydrolysis and SSF., Department of Chemical Engineering, Lund Institute of Technology, Sweden, 1999.
  11. Li, C., Yoshimoto, M., Tsukuda, N., Fukunaga, K. & Nakao, K. A kinetic study on enzymatic hydrolysis of a variety of pulps for its enhancement with continuous ultrasonic irradiation., *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 19, 2004, pp. 155-164.
  12. Mesa, L., *Estrategia Investigativa para la Tecnología de Obtención de Etanol y Coproductos del Bagazo de la Caña de Azúcar*, Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Técnicas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Departamento de Ingeniería Química, Santa Clara, 2010.
  13. Okazaki, M., & Moo-Young, M., Kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose: analytical description of a mechanistic model, *Biotechnol Bioeng*, Vol. 20, 1978, pp. 637-663.
  14. Peitersen, N., & Ross, EW., Mathematical model for enzymatic hydrolysis and fermentation of cellulose by *Trichoderma*., *Biotechnol Bioeng*, Vol. 21, 1979, pp. 997-1017.
  15. Ryu, DDY., Lee, SB., Tassinari, T., & Macy, C., Effect of compression milling on cellulose structure and on enzymatic hydrolysis kinetics., *Biotechnol Bioeng*, Vol. 24, 1982, pp. 1047-1967.
  16. Villadsen, J., Nielsen, J., & Lidén, G., *Bioreaction Engineering Principles* Third edition, Chapter 6, 2011, ISBN: 978-1-4419-9687-9.