

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Ingeniería Química y Materiales



TESIS DOCTORAL

Hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mateusz Wojtusik Wojtusik

Directores

Félix García-Ochoa Soria
Miguel Ladero Galán

Madrid 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y MATERIALES



TESIS DOCTORAL

**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA de MATERIALES
LIGNOCELULÓSICOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN EL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTADA POR:

Mateusz Wojtusik Wojtusik

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES:

Félix García-Ochoa Soria

Miguel Ladero Galán

Madrid, 2018

El Dr. Miguel Ladero Galán y el Dr. Félix García-Ochoa Soria, Profesores del Departamento de Ingeniería Química y Materiales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, afirman haber dirigido el trabajo recogido en la presente Memoria, y que, a su juicio, reúne los requisitos de originalidad y rigor científico necesarios para ser presentado como Tesis Doctoral.

Los Directores,

Dr. Miguel Ladero Galán

Dr. Félix García-Ochoa Soria

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar estas pocas líneas, siempre escasas, para dar las gracias a todas las personas que, con su apoyo, ayuda, paciencia y cariño han hecho posible este trabajo.

Empiezo por agradecer a mis directores de la Tesis, Doctores Miguel Ladero Galán y Félix García-Ochoa por su inestimable trabajo de dirección durante todo este tiempo, así como por la oportunidad que me han brindado para hacerlo y su paciencia a la hora de guiarme a través de innumerables horas de trabajo y reuniones. No he de olvidarme, además, de la Doctora Victoria Eugenia Santos por darme la oportunidad de empezar a trabajar en este mundo, así como al Doctor Emilio Gómez por su ayuda con la elaboración de una de las publicaciones más importantes contenidas en la presente Memoria. Asimismo, debo agradecer al resto de los miembros del grupo de investigación Físico-Química de los Procesos Industriales y Medio-Ambientales (FQPIMA), por su apoyo y colaboración, así como a los componentes del grupo de investigación de Celulosas y Papel del INIA-CIFOR, gracias al doctor Juan Carlos Villar, por su guía durante las primeras etapas de mi tesis, agradecimiento que quiero hacer extensible a Esteban Revilla, Jose M^a Carbajo, Nuria Gómez, Sara Santos y al resto de componentes de dicho grupo.

Cualquier persona que ha realizado una Tesis Doctoral sabe que este trabajo es imposible sin contar con la ayuda de los compañeros de laboratorio. En primer lugar, agradecer a la Doctora Vanessa Ripoll, que aunque ella siga negándolo, me enseñó todo lo que sé, desde aquel ya lejano 2010 en el que entré en el laboratorio a realizar las prácticas de la carrera. También, por supuesto, he de agradecer a los Doctores Igor Martínez y Sebastián Escobar todos los momentos vividos, su energía

positiva y en especial su manera de entender qué es lo que significa ser un compañero de laboratorio, es una lección que jamás olvidaré.

Ese día, no entré sólo al laboratorio. Me gustaría aprovechar este espacio para acordarme de todos aquellos que estuvieron junto a mí en esos primeros momentos: Bruno, Clara, Borja y Paula, espero que en vuestra vida todo os vaya tan bien como os merecáis. Cómo olvidarme, también, de mi hermano el Doctor Alberto Rodríguez, con el que he llegado a compartir mucho más que mi día de nacimiento. Gracias por todos los momentos pasados juntos, por el apoyo en los malos y en los buenos. Ha sido un honor compartir el camino contigo. Y aunque vino algo más tarde, debo agradecer a la Doctora Susana de la Morena por su cariño y por estar siempre dispuesta a escucharme y ayudarme, algo que nunca olvidaré.

También he de mencionar a las 'nuevas' incorporaciones del laboratorio, aunque lleve tanto tiempo a su lado que parezca parte de mi familia. Muchas gracias a Miguel García, a Isabel de la Torre y a Alberto Ramón por ser mucho más que mis amigos, mis confidentes y las personas con las que siempre he podido contar. Estas líneas se quedan cortas para deciros todo lo que os quiero y todo lo bueno que os merecáis. Tampoco quiero olvidarme de todo el mundo que pasó por el laboratorio: Flor, Álvaro, Andrea. Tuve la suerte de toparme también con compañeros de departamento inolvidables: Gracias a Cris, Javi, Mari (me caes mucho mejor de lo que crees), Cris (por escucharme y dejar que te escuchara), Antonio (no cambies nunca).

Aunque muchos de mis compañeros de promoción ya se fueron, quiero aprovechar para darles las gracias por hacerme ser quien soy ahora. Gracias a Vicky, sabes que siempre serás la mejor, es un placer y un honor haber compartido todo esto contigo; a Pablo, por siempre estar

aquí y compartir tantas risas, lágrimas y culebritas, a Alvarito, Isra, Baita, Ire, Salva, Charly, Juan, Ana, Gadea, Sara, Laura... y tanta gente más que he tenido el privilegio de conocer y compartir en este viaje.

A todos aquellos locos que me aguantan desde que he sido un niño, a mis amigos y amigas de Ciempozuelos, siempre estuvisteis ahí aunque mi cabeza estuviera en otro lado, y siempre recogéis mis pedazos cuando estuve roto y los colocasteis sin pedir nada a cambio. Gracias Rubén, Ana, Cris, Rubén, Santi, Suso, Adri, Miri, Silvy, Raúl, Pani, Silvia, Diego, Andrea, Desi, Dani... Pase lo que pase, siempre seréis parte de mi vida. También a Ester, por enseñarme tantas cosas y darme la oportunidad de descubrir lo importante, y qué es lo que significa crecer y hacer crecer mi corazón.

Finalmente, tengo que agradecer a aquellos sin los que nada de esto sería posible. Muchas gracias de todo corazón a mis padres, sólo espero estar a la altura de todo el cariño y amor que me habéis dado. Gracias a Patri, por ser mi apoyo hasta en los peores momentos, a Dima y a la pequeña Martina, todos te esperamos con impaciencia. Gracias a todos los que están y a los que se fueron, siempre os llevaré dentro de mí.

Además, quisiera agradecer a la empresa Abengoa, así como a sus trabajadores, la oportunidad que me brindaron para trabajar e investigar en la planta de Biocombustibles de Castilla y León, Babilafuente (Salamanca). Gran parte de lo que aprendí como profesional se lo debo a esa estancia.

Finalmente, agradecer el apoyo del Ministerio de Ciencia e Innovación, por financiar mi estancia previa a la realización de la Tesis Doctoral como investigador en la Universidad a través del proyecto CTQ2011-12725-E, y por la financiación de la tesis a través de los proyectos CTQ2013-45970-C2-1-R, RTC-2014-1826-3 y BSCH-UCM, GR35/10-A 91013

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY	12
OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO.....	22
INTRODUCCIÓN.....	24
1. Biorrefinerías: concepto general, materias primas y productos.....	25
2. Biomasa lignocelulósica como materia prima	30
3. Aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica.....	32
4. Hidrólisis enzimática.....	41
4.1. Enzimas empleadas para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica.....	41
4.1.1. Enzimas endoglucanasas.....	44
4.1.2. Enzimas exoglucanasas o celobiohidrolasas	44
4.1.3. Enzimas β -glucosidasas.....	44
4.2. Fenomenología de la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos.....	47
4.2.1 Reacción en fase sólida: Despolimerización y rotura de la estructura celulósica.....	47
4.2.2. Reacción en fase líquida: Oligosacáridos y celobiosa.....	48
4.2.3. Fenómenos asociados a las reacciones enzimáticas.....	49
4.2.4. Transferencia de materia y su implicación en la hidrólisis enzimática.....	52
4.3. Modelos cinéticos de la hidrólisis enzimática.....	53
4.3.1. Evolución de los modelos cinéticos: Tipo y clasificación	53
4.3.2. Modelos cinéticos empíricos	57

4.3.3. Modelos cinéticos basados en la hipótesis de Michaelis-Menten	59
4.3.4. Modelos cinéticos modificados con modelos de adsorción	61
4.4. Descripción cinética de la transferencia de materia entre fases	63
4.4.1. Cálculo de la velocidad de transferencia de materia	63
4.4.2. Acople de la transferencia de materia y la hidrólisis enzimática.....	65
5. Cambio de escala del proceso de hidrólisis enzimática	65
5.1. Determinación de la reología y cálculo de la potencia disipada....	65
5.2. Cambio de escala: Criterios	67
6. Bibliografía.....	68
MATERIALES Y MÉTODOS.....	84
1. Biomasa lignocelulósica y sustrato empleado	85
1.1. Paja de maíz pre-tratada	85
1.2. Paja de trigo pre-tratada.....	86
1.3. Sustratos sintéticos.....	86
2. Equipo experimental: Reactores y equipos de análisis	87
2.1. Reactores y equipos de reacción	87
2.2. Equipos de análisis	87
2.2.1. Análisis de reactantes en fase líquida.....	87
2.2.2. Análisis de sólido reamaneante.....	90
3. Determinación de la actividad enzimática.....	90
4. Observación de la estructura microscópica y determinación elemental mediante microscopía electrónica de barrido.....	91

5. Programas informáticos empleados para el cálculo de parámetros y ajustes cinéticos	92
6. Bibliografía.....	93
JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA DEL TRABAJO	95
1. Resumen de resultados y trabajos realizados.....	96
2. Relación de publicaciones.....	96
3. Justificación de la unidad temática del trabajo.....	98
3.1. Hidrólisis enzimática de paja de maíz pre-tratada de origen industrial.....	98
3.2. Descripción de la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos en dos etapas diferentes: Hacia un modelo cinético más complejo	105
CONCLUSIONES	114
CONCLUSIONS.....	122
ANEXO (PUBLICACIONES)	130

RESUMEN

El desarrollo de la biorrefinería como modelo de producción análogo a las refinerías se ha visto favorecido tanto por las políticas ambientales adoptadas por los distintos organismos, tanto nacionales como plurinacionales, como por la previsible escasez futura de los combustibles fósiles y de las materias primas no renovables. La biorrefinería se define en la actualidad como la forma de producción basada en la biomasa que persigue obtener tanto productos químicos, finales o intermedios, como energía y alimentos a través de procesos ambientalmente sostenibles.

Existen diversos tipos de biorrefinerías, tanto en función de los procesos que llevan a cabo, y los productos que ponen en el mercado, como del tipo de biomasa que emplean como materia prima. Dentro de las biorrefinerías que se están desarrollando en la actualidad, destacan aquellas que emplean biomasa lignocelulósica como materia prima. Esta biomasa se compone, fundamentalmente, de celulosa, hemicelulosa y lignina. Asimismo, cada uno de estos polímeros naturales puede ser procesado y separado en sus componentes fundamentales, que se pueden emplear como materias primas o productos intermedios en otros procesos.

Uno de los procesos de extracción de los componentes de la biomasa lignocelulósica más empleados en la actualidad consiste en tres etapas:

- pre-tratamiento de la biomasa,
- hidrólisis enzimática
- y posterior fermentación de los azúcares liberados (o transformación catalítica de los mismos).

La presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de la segunda de estas etapas: la hidrólisis enzimática.

Esta hidrólisis, también llamada sacarificación, enzimática se realiza empleando enzimas celulolíticas, cuyo origen reside en los hongos capaces de metabolizar la celulosa. Si bien esta mezcla de enzimas, conocida como celulosoma, es muy compleja, cabe distinguir cuatro tipos diferentes de enzimas: endoglucanasas, exoglucanasas o celobiohidrolasas, β -glucosidasas y enzimas auxiliares.

El proceso de degradación de la celulosa comienza con la acción de las enzimas auxiliares, que favorecen el ataque subsiguiente de las enzimas endoglucanasas, cuya labor es acortar la longitud de las cadenas celulósicas, y de las exoglucanasas, que reducen el tamaño de los oligómeros hasta liberar celobiosa. Finalmente, las enzimas β -glucosidasas transforman la celobiosa en glucosa.

El objeto de la presente Tesis es evaluar, desde un punto de vista fenomenológico y cinético, el comportamiento del sistema de hidrólisis enzimática de los residuos lignocelulósicos. Al tratarse de una reacción heterogénea compleja, el proceso de estudio del sistema será abordado desde dos puntos de vista diferentes: la caracterización y modelización de la sacarificación de un sólido industrial y el estudio de las diferentes etapas de la hidrólisis enzimática por separado, con el objetivo final de obtener un modelo cinético complejo, de carácter físico-químico, capaz de describir adecuadamente la evolución de este complejo proceso, que consiste en una red de reacciones.

En la primera parte del trabajo realizado, se estudió la hidrólisis enzimática de paja de maíz pre-tratada de origen industrial, proporcionado por la empresa Abengoa y pre-tratada en las instalaciones de Biocombustibles de Castilla y León, situada en Babilafuente (Salamanca). Se utilizó un cóctel enzimático desarrollado por la misma empresa (Zylase). En primer lugar, se evaluó el efecto de la transferencia

de materia en la velocidad del proceso global, factor que cobra especial importancia debido a la naturaleza heterogénea del proceso estudiado. Para ello, se realizaron distintos experimentos de hidrólisis a diferentes velocidades de agitación, empleando como sistema de reacción un reactor tipo tanque agitado en discontinuo, de 1 L de volumen total. De los resultados obtenidos, se dedujo que la velocidad de agitación influye de forma muy significativa sobre los resultados obtenidos, y que existen tres comportamientos diferentes en función de la agitación empleada. Para velocidades de agitación superiores a 250 rpm, la cantidad de glucosa liberada alcanzó un máximo; por lo tanto, se observa que el incremento en la velocidad de transferencia de materia a partir de 250 rpm no afecta a la velocidad global de proceso. El efecto contrario se puede ver para velocidades de agitación bajas; para este nivel de agitación, la cantidad de glucosa obtenida fue sensiblemente menor, y su magnitud se ve influenciada por el cambio en la velocidad de agitación. Finalmente, si la velocidad de agitación empleada se sitúa entre 100 y 250 rpm, se observa una tendencia intermedia a la de las dos zonas anteriormente mencionadas.

Una vez puesta de manifiesto la influencia de la fluido-dinámica y, por tanto, de la velocidad de transferencia de materia sobre la velocidad del proceso global, se pasó a evaluar de forma cuantitativa la influencia de dicha etapa de transferencia de materia a partir de la estimación teórica de dicha velocidad a través del cálculo del coeficiente de transporte correspondiente. Una vez obtenido el valor de este coeficiente, se utilizó para calcular la velocidad de transferencia de materia máxima, que varía con el tiempo, y compararlo con la velocidad en cada momento de la reacción enzimática. De esta manera, comparando la velocidad global con la velocidad calculada, es posible diferenciar la influencia ejercida en

la velocidad del proceso por ambos fenómenos: reacción de hidrólisis enzimática y transporte de materia de la fase líquida a l sólido o viceversa. Tras esta comparación, se ratificaron los resultados observados al analizar los experimentos llevados a cabo con diferentes agitaciones: La velocidad de transferencia de materia ejerce un papel controlante a velocidades bajas de agitación, mientras que ese papel de control recae sobre la velocidad de la propia reacción de hidrólisis cuando la transferencia de materia se ve facilitada a altas agitaciones. Por último, se efectuó una comparación sobre la eficiencia y rapidez de cambio de la velocidad del proceso ante dos acciones: el aumento de la velocidad de agitación o el aumento de la concentración del cóctel enzimático, tanto añadiendo mayor concentración de enzima al inicio del experimento como suministrando enzima fresca a la mitad del proceso de hidrólisis. De los resultados obtenidos, se puede concluir que se produce una clara y positiva influencia sobre la velocidad del proceso al aumentar la agitación (de 50 a 400 rpm), mientras que el aumento de la concentración de enzima (al doble) apenas produjo cambios en la cantidad de glucosa liberada al final del proceso de hidrólisis.

A continuación, se procedió a estudiar la influencia de la presencia de distintos posibles compuestos inhibidores. Empleando condiciones de operación en las que la transferencia de materia no controlaba la velocidad del proceso, se adicionaron cantidades diferentes de los compuestos con mayor potencial de inhibición (según la literatura), entre los que se encuentran los siguientes: glucosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural y lignina. Comparando los resultados obtenidos en cuanto a glucosa producida, así como en cuanto a la velocidad a la que la misma es liberada, se observó que la mayor parte de los compuestos anteriormente mencionados no ejercen actividad

inhibitoria sobre la acción de las enzimas empleadas. De todos los compuestos estudiados, la glucosa a concentraciones superiores a $70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, ejerce un efecto inhibitorio importante para tiempos de operación elevados (aunque esta concentración de glucosa no se suele presentar en la operación industrial), y la lignina, cuyo efecto inhibitorio se observa para cualquier cantidad añadida aunque queda por dilucidar cuál es el mecanismo por el que ejerce esta acción inhibitoria.

A continuación, teniendo en cuenta ambos estudios, se procedió a proponer un modelo cinético sencillo, con el objeto de describir de una forma empírica la evolución de la concentración de glucosa, producto principal, con el tiempo. Para ello, se utilizó una aproximación fractal. En este tipo de modelos cinéticos, se asume que la morfología del sólido, así como su evolución, produce que la ley de acción de masas no sea efectiva, no pudiendo darse la reacción en las tres dimensiones de forma libre. De esta manera, se define un parámetro o dimensión fractal. Para el sistema estudiado, se decidió emplear un modelo cinético que supone un esquema de reacción con una única reacción de hidrólisis (de celulosa a glucosa), con una ecuación cinética empírica potencial de primer orden. Se definió el parámetro fractal h , que modifica la constante cinética de la ecuación con el tiempo. Consecuentemente, un valor mayor de h provoca una disminución más acusada del valor de la velocidad de reacción con el tiempo.

Para realizar el ajuste del modelo y calcular el valor de sus parámetros, se utilizaron los datos experimentales obtenidos para el estudio de la influencia de la transferencia de materia. Asimismo, se comparó el ajuste obtenido con el correspondiente a un modelo cinético con ecuación potencial de orden n , variando el orden de reacción para cada experimento. Tras analizar los resultados, se observó que el modelo

potencial de orden n no conseguía ajustar los resultados de forma correcta para valores de agitación bajos. Además, el valor de n cambiaba al modificar las condiciones fluido-dinámicas, alcanzándose valores de n mayores de 13 para la menor agitación probada, valor que carece de sentido desde el punto de vista termodinámico y físico. Sin embargo, el modelo fractal es capaz de explicar de una manera más correcta la evolución de los parámetros, ya que el cambio de los valores del parámetro h se adecuó a las observaciones realizadas durante el estudio de la transferencia de materia, fluctuando entre cerca de 0.6 para los experimentos realizados a baja agitación (50 rpm), hasta un valor de 0.2 cuando los experimentos son realizados con valores de agitación elevados (más de 200 rpm).

Una vez analizado el caso de un sólido real, se pasó a estudiar la hidrólisis enzimática de forma secuencial. En primer lugar, se consideró que el proceso de hidrólisis transcurre de acuerdo a un esquema de reacción formado por dos reacciones en serie: un primer proceso de despolimerización de la celulosa hasta la obtención de celobiosa, y un segundo proceso de digestión de la celobiosa que lleva a la obtención de la glucosa final. Debido a la dificultad del análisis de la segunda parte de la reacción de forma integrada, se decidió realizar un estudio de la hidrólisis de celobiosa utilizando sólo las enzimas encargadas de esta reacción (β -glucosidasas, suministradas por ASA Specialenzyme GmbH) y celobiosa pura como sustrato. A partir de experimentos realizados con diferentes concentraciones de sustrato, de enzima y de producto añadido inicialmente, y empleando el método diferencial se dedujo que el modelo cinético que describe esta reacción ha de tener en cuenta una inhibición de tipo acompetitivo para el sustrato y competitivo para el producto; así mismo, se comprobó que la influencia de la concentración de enzima

sobre la velocidad de reacción es lineal. A través del método integral, y ajustando diferentes modelos cinéticos a los datos experimentales previamente obtenidos, se realizó una discriminación entre seis modelos cinéticos diferentes. De acuerdo a criterios estadísticos y termodinámicos, el modelo más fiable resultó aquel que tiene en cuenta una inhibición competitiva por producto con una doble ocupación del centro activo por moléculas de glucosa, así como una inhibición acompetitiva por sustrato.

Sin embargo, el modelo previamente descrito es válido sólo para un intervalo estrecho de temperaturas (entre 40 y 50 °C), y fue realizado sobre sustrato puro (celobiosa comercial). Para dotar de mayor robustez al modelo cinético formulado, se decidió estudiar el efecto de la temperatura y de la presencia de sólido lignocelulósico real (en este caso, paja de trigo pre-tratada por medio de disolución con etanol-agua con ácido sulfúrico, suministrada por el Instituto de Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, INIA). Para ello, se midió, en primer lugar, la actividad relativa remanente de la enzima con el trascurso de la reacción de hidrólisis, y en un intervalo más amplio de temperatura, de 40 a 70 °C. A partir de los datos obtenidos en estos experimentos de medida de la actividad, se desarrolló un modelo de desactivación térmica de las enzimas β -glucosidasas. El modelo que mejor se ajustaba a la evolución de la actividad remanente medida resultó ser una ecuación cinética empírica de primer orden con una actividad asintótica remanente, determinada por el parámetro β . Una vez conocida la ecuación de desactivación, se amplió el modelo cinético de la hidrólisis de celobiosa previamente descrito, pero teniendo en cuenta la pérdida de actividad de la enzima causada por la temperatura. De esta manera, el modelo final obtenido consiguió no solo reproducir una variedad amplia de resultados experimentales conseguidos en

experimentos con diferentes concentraciones iniciales de sustrato, sino también en un intervalo amplio de temperaturas. Por último, se midió la estabilidad de la enzima, determinando la evolución de la actividad para tiempos largos, lo que tiene sentido cuando la enzima β -glucosidasa estudiada forma parte del cóctel de hidrólisis enzimática completo, junto al cóctel Celluclast 1.5L de Novozymes (compuesto en su mayor parte de endo y exoglucanasas) empleado para la sacarificación de un sólido real, la paja de trigo previamente mencionada. Tras la medida de la actividad a tiempos largos de hidrólisis del sólido, se comprobó que, si bien la enzima β -glucosidasa pierde parte de su actividad, esta actividad final alcanzada es estable a lo largo de toda la hidrólisis enzimática global.

Una vez descrita la segunda de las reacciones del esquema de dos reacciones, la hidrólisis de celobiosa, se pensó utilizar el conocimiento adquirido para, junto con un nuevo modelo cinético adaptado a la fase de despolimerización, formular un modelo cinético físico-químico para describir el proceso de hidrólisis enzimática completo. Para ello, y debido a que esta primera parte del proceso es poco conocida, se realizaron diferentes experimentos de hidrólisis enzimática de un sólido real (paja de maíz pre-tratada por disolución con etanol-agua y ácido sulfúrico, suministrada por el INIA) utilizando para ello un cóctel de enzimas con una proporción de β -glucosidasas muy baja, Celluclast 1.5L, que posee solo un 1 % en peso de este tipo de enzimas. Asimismo, para obtener mayor información de la evolución del sólido durante la hidrólisis enzimática de la paja de trigo pre-tratada, se realizaron fotos empleando microscopía electrónica de barrido (SEM) y también análisis por espectrometría de transmisión de rayos X, de determinadas muestras a diferentes tiempos de reacción, observándose así la evolución de la

estructura del sólido y la composición tanto de las partes más cristalinas como de las más amorfas de la matriz celulósica.

De la observación por SEM, se dedujo que, si bien era posible determinar una disminución en la proporción de celulosa presente en las muestras analizadas, se puede observar que las estructuras más importantes se mantienen incluso a tiempos elevados de reacción. Esto puede redundar en una mayor adsorción de las enzimas sobre el sustrato sólido, incluso prolongada en el tiempo de reacción. Por lo tanto, combinando la información presente en bibliografía para estos sistemas con la información obtenida por estas observaciones, se estableció un modelo cinético basado en el modelo de Michaelis y Menten, pero con inhibición competitiva por producto y con una disminución de la actividad causada por la adsorción de la enzima sobre el sustrato, hecho que se expresa por medio de una ecuación de desactivación de primer orden que afecta a la concentración de enzima útil, capaz de catalizar la hidrólisis. Combinando esta ecuación cinética con la previamente descrita para la hidrólisis de celobiosa por medio de las enzimas β -glucosidasas, se obtiene un modelo cinético capaz de reproducir la evolución de los compuestos clave para experimentos que emplean diversas concentraciones de enzimas, con un conjunto de parámetros cinéticos que tiene sentido físico y estadístico y con una excelente reproducción de los datos experimentales.

Por último, para probar la robustez del modelo calculado, se ajustaron las ecuaciones cinéticas del mismo a los resultados experimentales obtenidos durante la primera parte del trabajo, en el estudio de la influencia de la fluido-dinámica y la transferencia de materia. Sin embargo, el cóctel enzimático empleado para la realización de dichos experimentos la concentración de enzima β -glucosidasa era mucho más elevada, por la

que la velocidad global de reacción está definida por la velocidad de la primera de las reacciones, la hidrólisis de celulosa en oligosacáridos de diferente tamaño molecular. Por lo tanto, la velocidad de reacción viene definida sólo por la primera ecuación cinética determinada. Finalmente, el modelo y los parámetros cinéticos obtenidos para este segundo material lignocelulósico fueron consistentes desde el punto estadístico y físico-químico, demostrando la validez de este tipo de aproximación para sistemas diferentes.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, es preciso señalar que el éxito del enfoque fenomenológico asociado a la modelización y determinación del comportamiento de un sistema heterogéneo tan complejo como la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos. Asimismo, se ha demostrado también que el estudio pormenorizado de las diversas etapas presentes en un proceso que está compuesto de un gran número de reacciones químicas permite el aislamiento de los fenómenos involucrados en el mismo, así como su estudio y conocimiento de forma más precisa y adecuada. Ha sido posible describir aceptablemente el conjunto de fenómenos mediante modelos cinéticos robustos y versátiles, que permitan la descripción del proceso de hidrólisis enzimáticas realizadas con distintas enzimas y/o residuos lignocelulósicos.

SUMMARY

Biorefineries development as production model kindred to the traditional refineries has been favoured by the different environmental policies adopted by different national and supranational organisms, and also by the scarcity of the fossil fuels and no-renewable raw materials. Nowadays, biorrefineries can be defined as every production process based on biomass, obtaining as result final or intermediate chemical products and/or energy, food and feed, and employing environmental sustainable production processes.

There are many types of biorefineries, and they can be classified according to the process that are employing, what kind of products are producing and in terms of the biomass used as raw material. Among all the different biorefineries, nowadays is gaining importance those that are using lignocellulosic biomass to obtain products and energy. Lignocellulosic biomass is composed by, mainly, cellulose, hemicellulose and lignin. All of these biopolymers can be processed and separated into their fundamental components, which can be used as reactive or intermediate products in many different industrial processes.

One of the extraction processes mostly employed for lignocellulosic biomass involves a three-step transformation:

- Biomass pre-treatment
- Enzymatic hydrolysis
- Released sugars fermentation or catalytic transformation

The present Doctoral Thesis focus on the study of the second stage of this production process: Enzymatic hydrolysis.

This enzymatic hydrolysis, also known as saccharification, is carried out employing cellulolytic enzymes whose origin is within fungi able to metabolize cellulose. Even though this enzyme mixture is very complex,

it is possible to distinguish four different classes of enzymes: endoglucanase, exoglucanase or cellobiohydrolase, β -glucosidase and auxiliary enzymes.

Cellulose degradation process starts with the involvement of auxiliary enzymes, which facilitate the subsequent attack of endoglucanase enzymes. These enzymes facilitate the access to the cellulose chains, and these chains are shortened by the action of endoglucanase towards the production of oligomers through the final liberation of cellobiose. Finally, β -glucosidase enzymes transform cellobiose into glucose.

The objective of the present Ph.D. Thesis is to evaluate from kinetic and phenomenological perspective the behaviour of the lignocellulosic biomass enzyme hydrolysis system. Thus it is a complex heterogeneous reaction; the study of the process will be evaluated from two different points of view: characterization and modelling of a saccharification of an industrial lignocellulosic biomass and the study of the different stages involved on the enzymatic hydrolysis separately, in order to achieve a complex kinetic model, able to describe adequately the evolution of the process, which consist on a reaction net.

In the first step of the work that was carried out, industrial pre-treated corn stover, kindly given by Abengoa and pre-treated in "Biocombustibles de Castilla y León" from Babilafuente (Salamanca) facility, enzymatic hydrolysis was studied. A commercial enzymatic cocktail (Zylase), developed by the same company, was employed. Firstly, mass transfer effect over process rate was studied due to its importance according to the heterogeneous nature of the system studied. For this purpose, several enzymatic hydrolysis were carried out using different stirrer speeds in a stirred tank reactor, operating in discontinuous, with a 1 L of total working volume. Within the obtained

results, it can be deduced that stirrer speed affects clearly the results achieved, and that there are three distinct regions of behaviour depending on the agitation used. For stirrer speeds superior to 250 rpm, glucose released was maximum; therefore, it has been proved that for an increment of mass transfer rate does not affect global process rate. On the contrary, that effect was observed for low stirrer speeds, in which the amount of glucose released was slightly less, and its value was heavily influenced by agitation changes. Finally, if the stirrer speed is fixed between 100 and 250 rpm, it has been noticed an intermediate tendency compared to the both previously described.

Once fluid-dynamic influence and, therefore, mass transfer effect over global reaction rate was evaluated, the quantitative impact of this phenomena over system rate by means of the theoretical estimation of this mass transfer rate employing mass transfer coefficient. This coefficient was employed to calculate the maximum mass transfer rate, which evolves during enzymatic hydrolysis, and was compared for each reaction time with global reaction rate. Based on this comparison, it was possible to differentiate the influence exerted over the process rate by both phenomena: enzymatic hydrolysis reaction and liquid-solid (or vice versa) mass transfer. The results achieved were coherent with the ones obtained in the study of stirrer speed effect over enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Mass transfer rate controls at low stirrer speeds, while this control switches to enzymatic hydrolysis when mass transfer rate is facilitated by high stirrer speeds. And last but not least, a comparison between the efficiency and rate of change of global process rate by two different actions was established: stirrer speed increase or enzymatic cocktail amount increase, both adding more initial cocktail concentration and supplying fresh enzymatic cocktail at half

experimental time. Regarding the achieved results, it is possible to conclude that an increase of agitation (from 50 to 400 rpm of stirrer speed) had a positive influence over global process rate, while enzyme amount increase (to double concentration) rendered only a small positive effect over final glucose released on enzymatic hydrolysis process.

After mass transfer influence over the system was evaluated, the presence of several possible inhibitors was studied. Using operational conditions in which mass transfer rate does not exert control over global process rate, different amount of potential inhibitor compounds (cited in literature) were added, such as: glucose, cellobiose, xylose, arabinose, acetic acid, furfural, 5-hydroxymethylfurfural and lignin. Comparing glucose produced during these experiments, as well as the glucose releasing rate, it has been observed than most of the previously cited compounds did not have inhibition effect over employed enzyme action. Of all of the compounds evaluated, more than 70 g·L⁻¹ of glucose produces clear inhibitory effect for long operational times, although this kind of concentrations usually are not present in industrial operations, and lignin, whose inhibitory effect can be observed at any amount of lignin added to the system. However, the evaluation of the inhibition mechanism provoked by the lignin still needs to be evaluated.

Then, combining the results achieved in both previous studies, a non-complex kinetic model was proposed in order to empirically describe the evolution of glucose concentration (main product) with time. For this purpose, fractal kinetics approach was employed. In this type of kinetic models, it is assumed that solid morphology and its evolution produces that mass action law turns to be non-applicable to the system, being unable the reaction to be carried out freely in a three-dimensional space. Therefore, a kinetic parameter known as fractal dimension has been

defined. For the system studied, a one reaction scheme was employed to define the kinetic model (from cellulose to glucose), with a first-order empiric potential kinetic equation. The parameter h , which reduces the kinetic constant, was employed. Consequently, a higher h value provokes a more notable decreasing over reaction rate during enzymatic hydrolysis.

To perform the model adjusting, and to calculate parameters values, experimental data obtained for mass transfer studies were employed. Likewise, the results obtained of this adjustment were compared to an empiric potential model of n order, which was calculated for each experiment. With the modelled results, it was observed that potential kinetic model was unable to reproduce correctly experimental results obtained for low stirrer speeds values, being n higher than 13 for the experiment with the lowest stirrer speed, being this value therefore meaningless. However, fractal model is able to explain more adequately the evolution of the parameters, the change on h value was consequent with the observations realised during mass transfer study, since h value oscillate between 0.6 for experiments carried out with the lesser stirrer speed (50 rpm), to a value of 0.2 when the experiments were carried out with high stirrer speeds (more than 200 rpm).

Once the example of a real solid was studied, enzymatic hydrolysis was evaluated sequentially. Firstly, the enzymatic hydrolysis process was considered to follow a two consecutive reaction scheme: starting with a first cellulose depolymerisation into cellobiose, and a second hydrolysis process of cellobiose that renders glucose finally. Due to the difficulty to integrate both stages, it was decided to perform cellobiose hydrolysis process, employing the enzymes responsible for this reaction (β -glucosidase, supplied by ASA Specialenzyme GmbH) and pure

cellobiose as substrate. Using experiments realised with different substrate, enzyme and added product concentration, and using differential method, it was derived that the kinetic model that describes this reaction has to include acompetitive inhibition for substrate and competitive for the product; it was also demonstrated that enzyme amount exerts a lineal influence over reaction rate. Through the integral method, and adjusting several different kinetic models to the previous experimental data, discrimination between six different kinetic models was carried out. According to statistical and thermodynamical criteria, the most reliable model resulted to take into account a competitive product inhibition with double active site occupation by glucose molecules, as well as an acompetitive substrate inhibition.

However, the previously described model is valid only in a narrow temperature interval (between 40 and 50 °C), and for pure substrate (commercial cellobiose). To deduce a more complete model, it has been decided to study the effect of temperature and real lignocellulosic solid (being, in this case, ethanol-water with sulphuric acid dissolved pre-treated wheat straw, provided by Instituto de Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, INIA). For this instance, it was determined firstly the relative residual enzyme activity during enzymatic hydrolysis reaction, using a wider temperature interval, from 40 to 70 °C. Bearing in mind residual activity experiments results, a thermal inactivation model was developed for β -glucosidase enzymes. The best achieved model has resulted to be an empiric first order kinetic equation with asymptotic remnant activity, determined by β parameter. Once inactivation equation was described, kinetic model for cellobiose previously described was extended, given the activity loss caused by temperature. Therefore, the final achieved model was able not only to

describe the variety of different experimental results obtained with several initial substrate concentrations, but it was also valid for a broad temperature interval. Finally, the enzyme stability was evaluated studying the change of enzyme activity for long experimental times, which makes sense as the β -glucosidase evaluated is a part of the complete enzyme cocktail (with Novozymes' Celluclast 1.5L cocktail, which is composed mostly by endo and exo-glucanases), employed for the previously mentioned wheat straw saccharification. After the measurement of activity at long reaction times, it was tested that, even though with a low activity loss, β -glucosidase enzyme reaches a final activity value that is stable during the global enzymatic hydrolysis process.

After the description of the second reaction of the two-reaction scheme, cellobiose hydrolysis, it was proposed to employ the acquired knowledge to, with a new kinetic model adapted to the depolymerisation phase, formulate a physic-chemical kinetic model to describe the global enzymatic hydrolysis process. For this instance, and owing to the little knowledge of this first process retrieved from literature, different enzymatic hydrolysis of a real solid (water-ethanol and sulphuric acid solubilized pre-treated corn stover, given by INIA), using a glucanase cocktail with a low β -glucosidase activity (Celluclast 1.5L, which possesses only 1% w/w of this type of enzymes) were performed. Likewise, in order to obtain more information over solid evolution during pre-treated corn stover saccharification, scanning electron microscopy (SEM) with X-ray transmission spectrometry of several reaction times was evaluated, therefore observing the solid structure evolution as well as the crystalline and amorphous cellulose composition.

Of the SEM observation, it was deduced that, even with a cellulose proportion diminishing in the analysed samples, it was possible to notice that the most important structures remain even for long reaction times. This factor can redound in a bigger enzyme adsorption over solid substrate, even prolonged in reaction time. Therefore, using both literature retrieved information and the observations performed, a Michaelis-Menten based kinetic model was established, but with a competitive product inhibition and activity lessening caused by enzyme adsorption over the substrate, expressed by a first order inactivation equation that affects remaining active enzyme. Using both previously described for cellobiose hydrolysis by β -glucosidase kinetic equation with this one, a kinetic model able to reproduce the evolution of the key compounds, with a set of kinetic parameters with physical and statistical coherence, and with an excellent experimental data reproduction.

Finally, to evaluate the robustness of the developed kinetic model, the same kinetic equations were employed to adjust the experimental results retrieved in the first part of the present work, in the mass transfer and fluid dynamic influence studies. Although the enzymatic cocktail used had more significant β -glucosidase concentration, global reaction rate was defined solely by the rate of the first reaction, cellulose hydrolysis to oligosaccharides. Therefore, reaction rate is described only for the first kinetic equation calculated. Finally, the obtained model and kinetic parameters for this second lignocellulosic material were consistent with statistical and physic-chemical point of view, assuring the validity of this kind of approximations for different systems.

Bearing in mind the results achieved in this doctoral thesis, it can be pointed out that the phenomenological focus as a base for the kinetic modelling of these complex heterogeneous systems and their behaviour

determination has been successful. Furthermore, it has been proved that the detailed study of the different stages of a process which is composed by a big number of chemical reactions leads to isolation of the different phenomena involved, and therefore to a more thorough and precise knowledge. It has been possible to correctly describe the involved phenomena by robust and versatile kinetic models, which permits the description of enzymatic hydrolysis processes carried out with different enzymes and/or lignocellulosic residues.

OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO

El objetivo fundamental de la presente tesis doctoral es realizar la descripción fenomenológica y el estudio pormenorizado de los factores que afectan a la hidrólisis enzimática de diferentes materiales lignocelulósicos. Con este fin, se ha propuesto y desarrollado una serie de trabajos experimentales a partir de los cuales se ha propuesto una serie de modelos matemáticos capaces de describir la evolución de los compuestos más importantes presentes en el sistema estudiado. Para la realización de este trabajo, se ha empleado la metodología desarrollada en el Grupo de Investigación Fisicoquímica de los Procesos Industriales y Medioambientales (FQPIMA) del Departamento de Ingeniería Química y Materiales de la Universidad Complutense de Madrid, donde se ha llevado a cabo los trabajos experimentales recogidos en la presente Tesis Doctoral. En primer lugar, se estudió la influencia de diversos parámetros operativos tales como la influencia de las condiciones fluidodinámicas o el efecto de ciertas sustancias inhibidoras sobre la velocidad y extensión de la reacción enzimática realizada sobre un sólido lignocelulósico pre-tratado de interés industrial, proporcionado por la empresa Abengoa y pre-tratado en la planta de Biocombustibles de Castilla y León, situada en Babilafuente (Salamanca). A partir de estos experimentos, se propuso un modelo cinético sencillo capaz de describir la sacarificación del sólido estudiado. La segunda parte de la tesis consistió en la descripción de la reacción enzimática a partir del estudio del proceso en dos partes separadas: La descripción de la solubilización y pérdida de complejidad del sólido a través de la acción de las enzimas endo-glucanasas y celobiohidrolasas o exo-glucanasas, así como la posterior conversión de los oligómeros solubles formados en glucosa a través del efecto de las enzimas β -glucosidasas. Finalmente, se propuso un modelo matemático aunando ambas descripciones.

INTRODUCCIÓN

1. Biorrefinerías: concepto, materias primas y productos

En la actualidad, la humanidad afronta dos retos en la producción de bienes y servicios para conseguir un modelo productivo que sea sostenible desde el punto de vista económico y ambiental. Estos retos son el inevitable agotamiento de los recursos fósiles (petróleo, carbón, gas natural), que hoy día son la base energética y la principal materia prima de la industria, y el aumento residuos y emisiones como consecuencia de su empleo¹. Aunque se han adoptado políticas de diversa índole de cara a la potenciación del empleo de energías y recursos renovables y su desarrollo, como por ejemplo el programa Horizonte 2020 de la Unión Europea que financia entre otras cosas la I+D+i en procesos tecnológicos que reduzcan el impacto ambiental², es cierto que, según el informe publicado por uno de los principales explotadores de recursos fósiles (BP), el consumo de petróleo, carbón y gas natural sigue en aumento, como se puede apreciar en la Figura 1. En esta figura se recoge el consumo energético, desglosado por tipo de fuente energética. Se aprecia que, aunque la tendencia de las fuentes renovables de energía es positiva (existe un incremento en su uso), todos los combustibles fósiles aumentan en menor o mayor medida, destacando incluso un incremento notable en el empleo del carbón como fuente energética³.

Dentro de las diferentes estrategias empleadas por la industria para conseguir atajar estos problemas, destaca la creación del concepto de biorrefinería. De modo análogo a las refinerías de crudo tradicionales, en las que se emplea petróleo como materia prima para obtener distintos combustibles y productos de base que son, a su vez, materias primas para obtener multitud de distintas aplicaciones. De forma similar, se pretende que en las biorrefinerías se empleen recursos biológicos renovables para este propósito⁴: *From biomass to fuels and chemicals*.

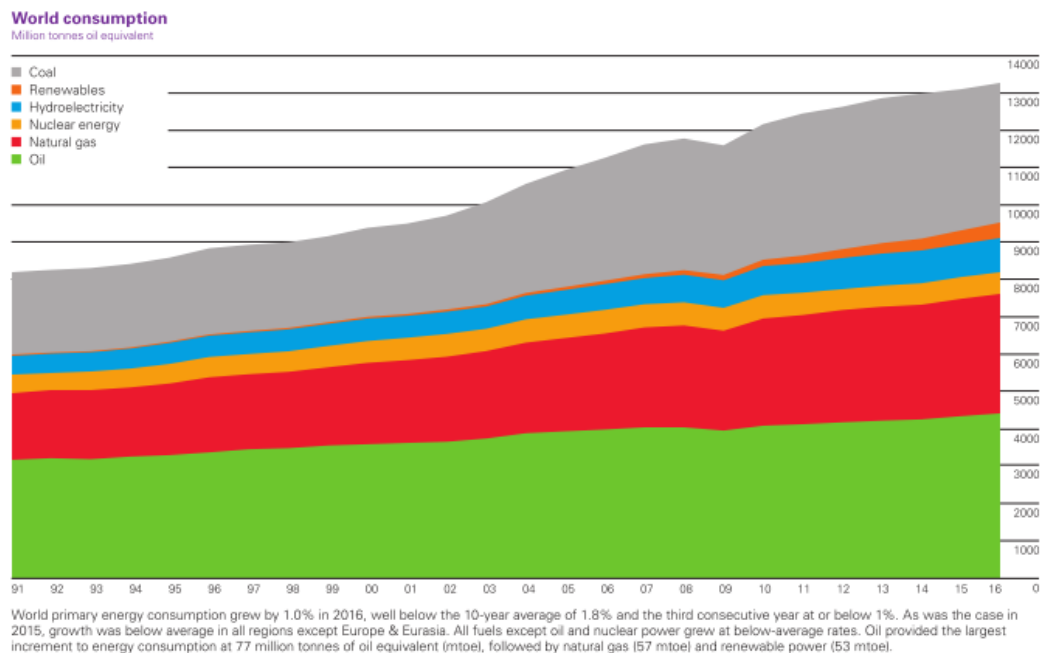


Figura 1. Evolución del consumo mundial de energía desglosado por tipo de fuente energética, expresado en millones de toneladas equivalentes de petróleo³

Durante los últimos años, se han propuesto diversas definiciones de biorrefinería. En 2009, Demirbas y col. Describieron la biorrefinería como una fábrica que integra procesos de conversión de biomasa y equipamiento para producir combustibles, energía y productos, un concepto análogo al de refinería petrolífera⁵.

Esta descripción se vio plasmada en el trabajo de dos comisiones internacionales diferentes, que dieron al concepto de biorrefinería una nueva dimensión. En 2009, el Laboratorio Nacional de Energías Renovables de Estados Unidos (*National Renewable Energy Laboratory*, en sus siglas NREL) definió biorrefinería como toda instalación o fábrica que sólo emplea biomasa, o la procesa⁶. Por otro lado, el Panel 42 de Bioenergía de la Agencia Internacional de Energía (*International Energy Agency Bioenergy Task 42*) estableció que la biorrefinería consiste en el proceso sostenible de biomasa en un amplio espectro de productos

comercializables y energía⁷. Esta última definición introduce el concepto de sostenibilidad ecológica, ya que implica no sólo la utilización de materias primas respetuosas con el medioambiente (biomasa), sino que estas materias deben ser procesadas empleando a su vez procesos y productos ecológicamente sostenibles.

En este sentido, Koltuniewicz y Dabkowska establecieron una serie de principios por los que se deben regir las biorrefinerías, con el objetivo de cumplir con las definiciones anteriormente descritas⁸.

- Todas las materias primas empleadas deben provenir única y exclusivamente de biomasa procesada.
- Todos los productos y reactivos empleados diferentes a la biomasa deben ser, a su vez, biodegradables.
- Todos los procesos deben cumplir con el concepto de Química Verde y Tecnologías Limpias, descrito previamente⁹.

Por lo tanto, la tendencia de las instituciones que regulan o definen las energías renovables es a considerar la biorrefinería no sólo como un proceso de tratamiento integral de la biomasa, sino una transformación de la misma en una gran variedad de productos de mayor o menor valor añadido así como de energía. Además, esta conversión ha de llevarse a cabo mediante procesos respetuosos con el ambiente y rentables económicamente.

Asimismo, teniendo en cuenta la interpretación previamente descrita, es posible clasificar las biorrefinerías según diversos parámetros. En primer lugar, se pueden dividir las biorrefinerías en función de la materia prima empleada. De esta manera, existen numerosos tipos, ya que este tipo de tecnología permite emplear multitud de biomasa diferente como materia prima. Demirbas y col., por ejemplo, agruparon las biorrefinerías en los siguientes grupos, según el tipo de material base:

- azúcares libres,
- cultivos ecológicos,
- cultivos energéticos,
- aceites de semillas
- biomasa forestal y lignocelulósica⁵.

Por otro lado, también es posible clasificar las biorrefinerías en función del tipo de tecnología empleada para la obtención de los diversos productos. De esta manera, Parajuli y col. las clasifican en bioquímicas y termo-químicas, englobando cada una de ellas diferentes procesos que dan lugar a muchos productos diferentes¹⁰. En la Figura 2 se puede observar, a modo de ejemplo, un resumen de los posibles procesos y tecnologías empleados en una biorrefinería.

Sin embargo, es necesario tener en cuenta en ambas clasificaciones que, al igual que las refinerías, las biorrefinerías pueden contar con diversas materias primas que se emplean de forma simultánea, o acoplar varias tecnologías. El ejemplo más claro sería la valorización energética de los residuos provenientes de los procesos bioquímicos, ya que se pueden emplear como fuente de energía adicional para suministrar a la instalación, siendo la fermentación el proceso central de la misma.

Aunque la biomasa es considerada como una materia prima renovable, existen diversos factores que pueden afectar a su idoneidad de cara a su empleo para la producción de recursos, especialmente energéticos. De esta manera, a lo largo de los últimos años, las materias primas empleadas han ido evolucionando, adaptándose al efecto provocado sobre otros ámbitos económicos y sociales. Esta evolución se plasma en otro tipo de diferenciación de las biorrefinerías, que divide las mismas en tres generaciones diferentes⁶.

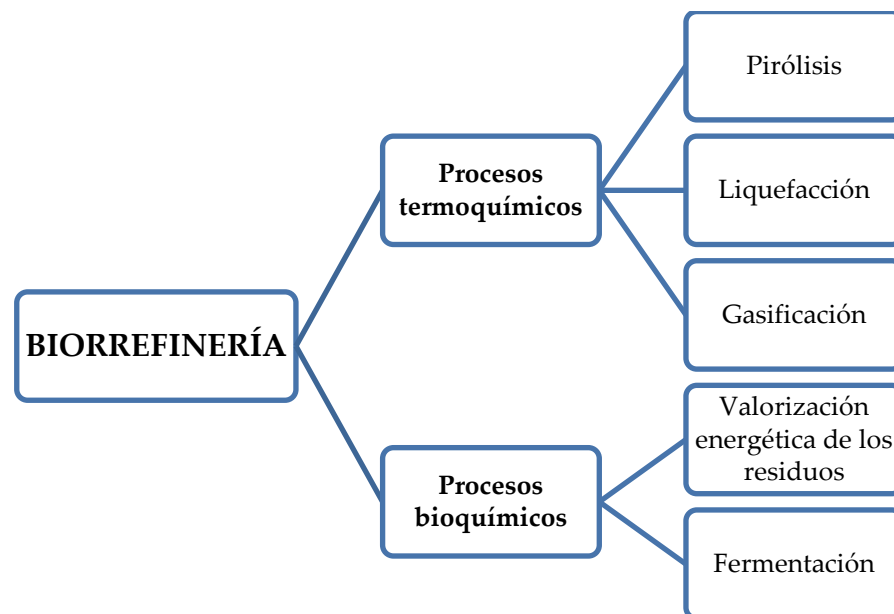


Figura 2. Tipos de tecnologías presentes en una biorrefinería, y su clasificación ⁵

- Biorrefinerías de primera generación. Se trata de las que emplean cultivos de carácter alimentario como materia prima, de cara a obtener los azúcares presentes en este tipo de plantas, empleando especialmente la parte de la planta dedicada a la producción de alimento. Ejemplos de este tipo de materias primas son el maíz, la caña de azúcar o los aceites vegetales.
- Biorrefinerías de segunda generación. Surgidas como alternativa al empleo de los cultivos previamente mencionados, se centran en utilizar o bien plantas que no se emplean en la alimentación (cultivos energéticos), o bien las partes de las plantas cultivadas para la producción de alimento que no se emplean y que se desechan como residuo (por ejemplo, la paja de trigo o el bagazo de la caña de azúcar).
- Biorrefinerías de tercera generación. En este tipo de instalaciones, las materias primas empleadas provienen, en exclusiva o no, de cultivos

microbianos. El ejemplo más común de este tipo de microorganismos son las microalgas.

2. Biomasa lignocelulósica como materia prima

Como parte del desarrollo de las biorrefinerías a lo largo del tiempo, destaca la búsqueda de nuevos tipos de materias primas con el objetivo de mejorar no sólo la economía del proceso global, sino su propia sostenibilidad. En este esfuerzo se encuadran las biorrefinerías de segunda generación, tal y como se ha comentado.

Dentro de los diferentes tipos de biomasa que se emplean en las biorrefinerías de segunda generación destaca, por su amplia implantación y por la atención que la industria le ha proporcionado, la biomasa lignocelulósica. De forma general, se puede definir la biomasa lignocelulósica como todo aquel material en cuya composición destaca la presencia de celulosa y lignina, aunque entre sus componentes se puede encontrar también hemicelulosa^{11, 12}. Atendiendo a este tipo de composición, se puede considerar biomasa lignocelulósica al residuo producido por multitud de distintas actividades agrícolas (tanto de cultivos como del posterior procesado de los productos agrícolas) y forestales (tanto provenientes del cultivo forestal como de los residuos de las aplicaciones relacionadas con esta actividad, destacando la industria papelera). Asimismo, también se puede considerar como biomasa lignocelulósica los residuos producidos por otro tipo de actividades humanas, como por ejemplo los restos de podas en las ciudades o incluso parte de los restos orgánicos producidos en los hogares¹².

Por lo tanto, la biomasa lignocelulósica engloba una gran cantidad de residuos que proceden de muy diversas actividades, tanto industriales

como de otro tipo. De forma general, es posible dividir estos residuos en cuatro tipos diferentes: agrícolas, forestales, industriales y otros¹².

Dentro de los residuos agrícolas, la biomasa lignocelulósica empleada como materia prima para las biorrefinerías puede tener, a su vez, varios orígenes diferentes. Pueden emplearse los desechos producidos durante el cultivo de plantas herbáceas dedicadas a la producción de alimento o forraje; dentro de este tipo de residuos se encuadran, por ejemplo, la paja de plantas como el arroz, el trigo o la cebada. Asimismo, se pueden emplear directamente cultivos cuyo propósito es su empleo como materia prima para la transformación en productos o energía, como por ejemplo el pasto varilla producido en Estados Unidos (en inglés *switchgrass*), las plantas del género *Miscanthus* y el carrizo, cultivadas en Asia o América del Sur. Por último, se emplean como biomasa lignocelulósica los restos de cultivos energéticos, cuya finalidad inicial es la transformación de sus semillas o aceites en combustibles; ejemplos de este tipo son el bagazo de la caña de azúcar, la paja de maíz o los restos de la planta de colza.

En cuanto a los residuos forestales, al igual que en el caso de los residuos agrícolas, pueden proceder de diversas fuentes. Existen cultivos con un ciclo de vida corto rotatorio dedicado a la producción de biomasa para la obtención de energía o productos, como por ejemplo el eucalipto, el álamo o el sauce. Por otro lado, se pueden emplear también los residuos de la industria forestal, como por ejemplo la corteza de los diferentes árboles, los tocones o las virutas producidas como desecho en la transformación de la madera en productos, etc.

La biomasa producida como residuo industrial que se emplea en biorrefinerías puede tener origen tanto en la industria relacionada con los productos agrícolas, como por ejemplo los restos de frutas empleados

para hacer zumos o los residuos del procesado de la caña de azúcar y el maíz, o bien ser originados en las industrias relacionadas con las actividades forestales, como por ejemplo la industria papelera.

Finalmente, biomasa lignocelulósica también se obtiene como residuo de otro tipo de actividades humanas, como puede ser los restos de poda de jardines y parques o los residuos sólidos urbanos. En la Tabla 1 se muestran algunos trabajos relacionados con los diferentes tipos de residuos sólidos citados; como puede apreciarse, existe un gran interés científico por el desarrollo de la tecnología empleada para obtener tanto productos de valor añadido como energía a partir de la biomasa lignocelulósica.

3. Aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica

Debido a la gran variedad existente de este tipo de residuos, los procesos integrados en las biorrefinerías difieren bastante, tanto en complejidad como en coste económico, en función del tipo de residuo lignocelulósico empleado como materia prima. Sin embargo, es posible definir unas características generales en cuanto a las medidas necesarias para poder transformar el residuo lignocelulósico inicial en un producto de valor añadido o en una fuente de energía.

El principal componente de los diferentes residuos lignocelulósicos es la celulosa, aunque su proporción puede variar bastante en los diferentes tipos de residuos; de manera general su contenido ronda entre el 35 y el 50 % en peso seco del total del material¹³. Al tratarse, en su mayor parte, de residuo de origen orgánico, la celulosa es el esqueleto que mantiene cohesionado las células presentes en las estructuras vegetales, formando parte de la pared celular tanto de plantas herbáceas como de cultivos

forestales. La celulosa es un polímero cristalino que se compone de unidades de glucosa, unidas entre sí por enlaces β -1,4-O-glucosídicos. Debido a las fuertes uniones de puente de hidrógeno entre las subunidades de glucosa, es posible considerar que el polímero está formado a su vez por subunidades de celobiosa¹³. Las cadenas poliméricas se agrupan entre sí formando estructuras cristalinas de carácter fibrilar, llamadas microfibras, que a su vez se agrupan entre sí para formar fibras mayores¹³.

Tabla 1. Trabajos en bibliografía relacionados con los diferentes tipos de biomasa lignocelulósica

Origen de la biomasa lignocelulósica	Tipo de residuo	Biomasa	Referencia
Residuos agrícolas	Cultivos herbáceos	Pasto varilla	14
		<i>Miscanthus Poaceae</i>	15
		Carrizo	16
	Residuos de cultivos	Paja de arroz	17
		Paja de trigo	18
		Tallo de algodón	19
	Cultivos energéticos	Colza	20
		Maíz	21
		Caña de azúcar	22
Residuos forestales	Cultivos dedicados	Eucalipto	23
		Álamo	24
		Sauce	25
	Restos de procesamiento de madera	Corteza de eucalipto	26
		Astillas de eucalipto	27
Residuos industriales	Industrias agrícolas	Paja de maíz	28
		Bagazo de caña de azúcar	29
		Piel de naranja	30
	Industrias forestales	Serrín de pino	31
		Madera reciclada	32
Otros residuos	Residuos de parques y jardines	Poda de olivo	33
	Residuos urbanos	Residuos sólidos	34

El segundo componente presente en mayor proporción en la biomasa lignocelulósica es otro biopolímero formado por monosacáridos, la hemicelulosa, presente en un menor porcentaje, que varía entre el 20 y el 40 % en peso seco, este polímero, al contrario que la celulosa, se trata de una estructura amorfa formada por diferentes heteropolímeros, tales como xilanos, galactomananos, glucurono xilanos, arabinoxilanos, glucomananos y xiloglucanos¹³. Esta composición tan heterogénea hace que aumente la versatilidad de este tipo de sólidos, ya que permite obtener diferentes tipos de monómeros que, a su vez, pueden convertirse en todo tipo de productos secundarios. La composición de la hemicelulosa presente en cada tipo de biomasa es única, y, por lo tanto, es necesario analizar con profundidad qué tipo de azúcares monoméricos están presentes en su estructura de cara a su empleo en las biorrefinerías. Asimismo, esta estructura amorfa se sitúa entre las diferentes microfibras de celulosa, dotando de consistencia a la estructura fibrilar final¹³.

Finalmente, la biomasa lignocelulósica se compone de lignina en la proporción restante. La lignina es un polímero fenólico de alto peso molecular, que contribuye al crecimiento de la planta, al desarrollo de órganos y dota de resistencia al ataque microbiano y al estrés físico y químico³⁵. La lignina está compuesta por tres tipos diferentes de monómeros: alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico. Estos monómeros forman a su vez unidades monoméricas fenilpropanoicas que se pueden identificar dentro de la estructura polimérica de la lignina, siendo guayacil, siringilo y *p*-hidroxifenilo¹³.

En la Figura 3 se resume esquemáticamente la estructura expandida de una biomasa lignocelulósica, de manera general.

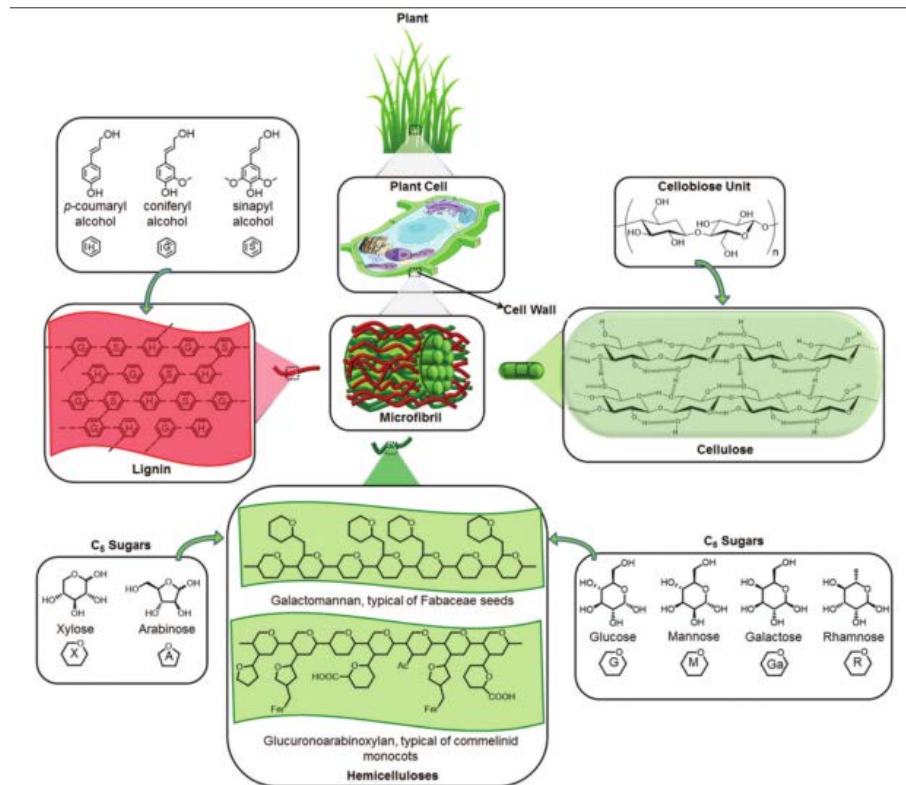


Figura 3. Estructura desarrollada de la biomasa lignocelulósica, obtenida del trabajo de Isikgor y Becer de 2015¹³

Por lo tanto, para el procesamiento de esta biomasa es necesaria la separación de las tres fracciones o constituyentes principales descritos. Debido a la naturaleza resiliente de la biomasa lignocelulósica, cuyo origen reside en su estructura y composición, es necesario realizar este procesamiento en varias etapas diferentes. Asimismo, debido a la gran variedad de tipos de biomasa, y a su diferente naturaleza, la estrategia óptima para la separación en sus componentes varía en gran medida para los distintos residuos lignocelulósicos.

Sin embargo, de forma general, es posible agrupar los diferentes procesos que están involucrados en tres etapas. En primer lugar, el residuo debe ser previamente acondicionado con el objetivo de facilitar su posterior transformación. Este proceso previo se conoce como pre-tratamiento, y engloba tanto los diferentes procesos de acondicionamiento (secado,

molido, lavado, etc.), así como diferentes tipos de transformación de la biomasa lignocelulósica, con el objetivo de conseguir que los componentes presentes en el sólido tengan una separación más sencilla³⁶. Existen multitud de diferentes pre-tratamientos que están siendo diseñados, mejorados e investigados en la actualidad. En función de la naturaleza del pre-tratamiento empleado, se pueden dividir en pretratamientos físicos, químicos, fisicoquímicos o biológicos^{11, 37}. Tanto los pretratamientos físicos como los químicos, así como los fisicoquímicos tienen la ventaja de conseguir una accesibilidad muy buena a los biopolímeros de interés y una posterior extracción elevada de azúcares³⁷. Además, estos pretratamientos suelen involucrar procesos bien conocidos e implementados, cuya operación suele ser sencilla y requerir un tiempo de proceso bajo, como por ejemplo la molienda, el tratamiento con ácido diluido o la explosión por vapor³⁷. Sin embargo, este tipo de pre-tratamientos suelen requerir productos químicos tóxicos y/o contaminantes, que frecuentemente llevan a la necesidad de emplear equipamientos especiales. Adicionalmente, para determinado tipo de procesos, como por ejemplo el pre-tratamiento con microondas, el empleo de compuestos oxidativos o los líquidos iónicos emplean sustancias o procesos cuyo coste es muy elevado, encareciendo el proceso final³⁷. Por lo tanto, al tratarse de una parte compleja de todo el conjunto de las operaciones necesarias para la transformación de la biomasa lignocelulósica, existe un gran esfuerzo por parte de la industria y la comunidad científica para conseguir desarrollar pre-tratamientos más sencillos, asequibles y ecológicamente favorables¹¹. Un ejemplo muy destacable de esto es el pre-tratamiento con disolventes (entre los que recientemente se ha llegado a utilizar líquidos iónicos), cuyo interés ha aumentado en gran medida en los últimos años³⁸. En la Tabla 2 se

recogen un ejemplo de los trabajos publicados en bibliografía relacionados con los pre-tratamientos.

Una vez completado el pre-tratamiento, existen diferentes posibilidades a la hora de transformar la biomasa lignocelulósica pre-tratada en productos de valor añadido o energía. Estas posibilidades, así como los distintos productos que derivan de cada uno de los procesos se recogen en la Figura 4, obtenida de la obra de Cardona Alzate y col., publicada en 2018. Tal y como se puede apreciar en esta figura, existen muchos y diferentes procesos que permiten transformar la biomasa lignocelulósica en el producto deseado. Dentro de los procesos bioquímicos existentes, el estudio se centrará en evaluar el proceso fermentativo.

Tabla 2. Estudios recientes de diferentes pretratamientos presentes en la literatura

Tipo de pre-tratamiento	Pre-tratamiento	Biomasa lignocelulósica	Referencia
Físico	Mecánico	Paja de trigo	39
	Microondas	Varias	40
	Ultrasonidos	Paja de maíz	41
	Radiación electrónica de alta energía	Bagazo de caña de azúcar	42
	Pirólisis	Paja de colza	43
Químicos	Ácido concentrado	Bagazo de caña de azúcar	44
	Ácido diluido	<i>Oryzopsis</i>	45
	Álcali	Tallos de algodón	46
	Tratamiento oxidativo	Paja de arroz	47
	Organosolv	Paja de trigo	48
	Líquidos iónicos	Eucalipto	49
Fisicoquímicos	Explosión por vapor	Restos de árbol de banana	50
	Expansión de fibras con amoníaco (AFEX)	Restos de agave	51
Biológicos	Biológico	Restos de maíz	52

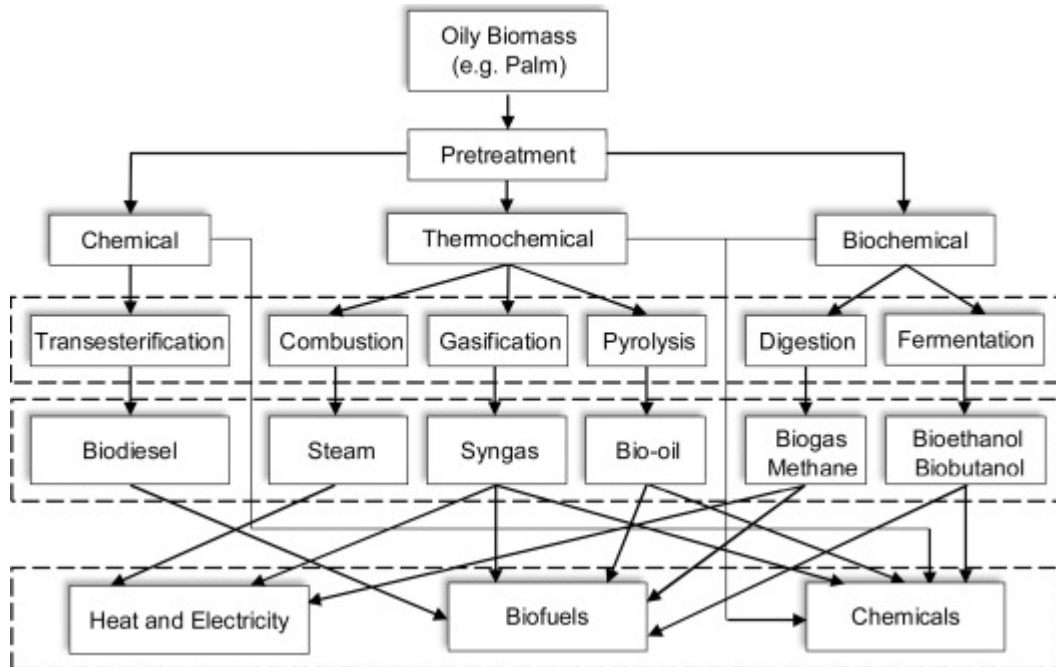


Figura 4. Diferentes tipos de procesamiento de los materiales lignocelulósicos en una biorrefinería ³⁶

Este trabajo, la Tesis Doctoral que se presenta, se va a centra en el estudio del proceso bioquímico, uno de los más prometedores de los anteriormente descritos. En este tipo de procesos se utiliza primero una degradación o hidrólisis llevada a cabo con enzimas. Posteriormente, mediante un proceso fermentativo, los azúcares conseguidos en la etapa anterior se convierten de forma habitual en etanol, empleado como fuente de energía (combustible, conocido como bioetanol). No obstante, de acuerdo a los últimos conceptos de biorrefinerías, se tratan de desarrollar múltiples bioprocesos, llevados a cabo con microorganismos, aerobios o anaerobios, para obtener compuestos químicos de más alto valor añadido y de múltiples aplicaciones.

En función del producto de interés, es necesario emplear un tipo de microorganismo determinado, cuya idoneidad vendrá marcada por su capacidad para metabolizar los monosacáridos liberados durante el proceso de transformación de la biomasa lignocelulósica, especialmente aquellos de cinco y seis carbonos¹³. Debido a la estructura anteriormente mencionada de la biomasa lignocelulósica, no existen microorganismos (salvo algunos hongos) capaces de transformar directamente el residuo en un producto útil. Por ello, es necesario someter al sólido lignocelulósico a una etapa previa de liberación de monosacáridos solubles, que serán a la sazón los sustratos de los microorganismos empleados en los bioprocesos. Como se ha indicado, este proceso de degradación de la biomasa lignocelulósica pre-tratada se lleva a cabo empleando catalizadores enzimáticos, que son capaces de degradar los distintos biopolímeros (celulosa, hemicelulosa) hasta liberar los monosacáridos y monómeros de los que se componen⁵. Este tipo de transformación se prefiere frente a la química ya que se realiza en condiciones de operación suave, aunque es necesario tener en cuenta que

el coste de las enzimas puede afectar a la rentabilidad del proceso⁵³. A su vez, los productos intermedios generados durante la degradación pueden ser empleados de cara a otorgar mayor rentabilidad al proceso⁵⁴.

Asimismo, existen dos formas diferentes de operación. Es posible realizar el proceso de forma secuencial, es decir, primero se lleva a cabo la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico y, posteriormente, se procede a la transformación de la mezcla de monómeros liberada por microorganismos (levaduras o bacterias), capaces de transformar estos monosacáridos solubles en productos de interés⁵. Por otro lado, se ha desarrollado recientemente una nueva forma de operación, en la que el proceso de hidrólisis y fermentación se lleva a cabo en el mismo reactor, empleando microorganismos y enzimas de forma simultánea. Este proceso, conocido como sacarificación y fermentación simultánea (en inglés, *simultaneous saccharification and fermentation*, o SSF) tiene como ventaja que permite el empleo de un único sistema de reacción y permite conseguir mayores concentraciones de producto final y un empleo más eficiente de la hidrólisis enzimática, ya que se produce un consumo continuo de los monosacáridos producidos, que se ha demostrado que ejercen un efecto negativo sobre la capacidad productiva de las enzimas⁵³. Sin embargo, se presenta la dificultad de que las condiciones, de temperatura, por ejemplo, no son las mismas para la hidrólisis y para la biotransformación. En la actualidad, se está desarrollando un proceso que va más allá, y que intenta emplear biomasa lignocelulósica sin pre-tratar. Este sistema emplea microorganismos capaces de producir las enzimas necesarias para degradar la biomasa lignocelulósica y, además, consumir los monosacáridos generados. Esta nueva forma de operación se conoce como bioproceso consolidado (en inglés *consolidated bioprocess*, o CBP), y aún se encuentra en fase de desarrollo muy temprana debido a

la dificultad de encontrar biocatalizadores capaces de llevar a cabo la operación, si bien se espera que sea un proceso que reduzca los costes de operación y que aumente la productividad del mismo⁵³.

Por lo tanto, en cualquiera de los procesos descritos anteriormente, las enzimas juegan un papel fundamental tanto en la consolidación de las biorrefinerías fermentativas como en el desarrollo de procesos de producción económica y ecológicamente más sostenibles. En la actualidad, la forma secuencial de funcionamiento, separando hidrólisis y fermentación o bioproceso aerobio es la forma usual de funcionar.

4. Hidrólisis enzimática

4.1. Enzimas empleadas para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica

La hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos emplea enzimas cuyo origen se encuentra en los hongos celulolíticos, que están adaptados al consumo de este tipo de residuos para la obtención de nutrientes⁵⁵. Dentro de los diferentes tipos de hongos empleados que son capaces de secretar las enzimas necesarias para la descomposición de las estructuras lignocelulósicas, destaca la especie *Trichoderma reesei*, cuyo secretoma fue utilizado como referencia para la producción de las primeras mezclas enzimáticas encargadas de la degradación de celulosa⁵⁵. Actualmente, existen otras especies de hongos con capacidad de producir enzimas celulolíticas. En la Tabla 3 se recoge una recopilación de varios ejemplos de hongos utilizados en investigaciones recientes con el objetivo de producir este tipo de enzimas.

Tabla 3. Diferentes especies de hongos con capacidad de secreción de enzimas celulolíticas empleadas en diferentes trabajos científicos

Género	Especie	Tipo de trabajo	Referencia
<i>Trichoderma</i>	<i>Reesei</i>	Producción de xilanasas	56
		Modificación genética para la sobreexpresión de celulasas	57
		Silenciamiento genético	58
	CMIAT 054 y 041	Optimización de la producción de celulasas	59
	<i>atroviridae, reesei y harzianum</i>	Estudio de la estructura de las enzimas secretadas	60
<i>Penicillium</i>	<i>Verruculosum</i>	Modificación genética de endoglucanasas	61
	<i>Funiculosum</i>	Híper expresión genética de celulasas	62
<i>Myceliophthora</i>	<i>Termophila</i>	Optimización de celulasas y xilanasas	63
		Mutación dirigida con CRISPR/CAS9	64

Los hongos celulolíticos generan varios tipos de enzimas diferentes; para degradar biomasa lignocelulósica se emplean enzimas que hidrolizan celulosa, hemicelulosa, y otras enzimas auxiliares.

- Enzimas que degradan la celulosa. Se trata de las enzimas con más interés para la producción de monosacáridos, ya que degradan la celulosa en glucosa. Aunque el hongo celulolítico produce muchos tipos diferentes de enzimas que hidrolizan la celulosa, se pueden dividir en tres tipos de enzimas diferentes: endoglucanasas, celobiohidrolasas o exoglucanasas y β -glucosidasas⁶⁵.
- Enzimas que hidrolizan hemicelulosa. En general, se dividen en dos grupos: enzimas que degradan la xilanasas y enzimas que degradan los polímeros de mannosas⁵⁵. La degradación de la hemicelulosa produce diferentes tipos de monosacáridos (xilosa, arabinosa, galactosa, mannosas) cuya composición varía en función del tipo de biomasa lignocelulósica, así como otro tipo de compuestos ácidos (ferúlico, acético)⁵⁵.

- Enzimas que hidrolizan lignina. Secretadas únicamente por hongos con capacidad de metabolizar la lignina, son una mezcla muy compleja de enzimas, peroxidasas y lacasas, que recibe el nombre general de ligninasas⁶⁶.
- Otras enzimas auxiliares. Se trata de un conjunto de enzimas que si bien su actividad concreta no reside en la degradación de la celulosa, hemicelulosa o lignina, su actividad facilita la reactividad de las enzimas descritas anteriormente⁵⁵. Aunque existen muchos tipos diferentes, cabe destacar las swolleninas⁶⁷ y las expansinas⁶⁸.

Las enzimas que producen la degradación de la celulosa poseen una serie de características diferenciadas que hacen que la actividad combinada de todas ellas haga posible la hidrólisis de la estructura celulósica, y la liberación final del monosacárido que compone esta estructura: la glucosa.

Las enzimas que se encuentran involucradas en la degradación de polisacáridos están clasificadas en una base de datos común, que se conoce como clasificación de enzimas activas sobre carbohidratos (en inglés, *carbohydrate active enzymes*, o CAZy), en la que las proteínas se clasifican en función de su estructura tridimensional, secuencia de aminoácidos y mecanismo catalítico⁶⁹. Dentro de la clasificación general de estas enzimas, las enzimas celulasas (que tienen capacidad de hidrolizar la celulosa) pertenecen a la familia de las enzimas glicosil hidrolasas, cuya abreviación es GH⁵⁵. A continuación, se describen la funcionalidad y las características principales de cada tipo de celulasa.

4.1.1. Enzimas endoglucanasas

Nombradas como EC 3.2.1.4, este tipo de enzimas ataca de forma aleatoria en posiciones internas de regiones amorfas de celulosa, generando nuevos finales de cadenas y oligosacáridos de diversa longitud⁷⁰. Pertenecen a las familias GH5, GH7, GH12 y GH45 de la clasificación CAZy⁵⁵. A modo de ejemplo, en la figura 5 se presenta la estructura tridimensional de una endoglucanasa GH5 procedente del hongo *Trichoderma reesei*⁷¹. Por lo tanto, la actividad de esta enzima permite la rotura de la estructura principal de la celulosa, permitiendo la actuación de las siguientes enzimas involucradas en la degradación de la celulosa a glucosa.

4.1.2. Enzimas exoglucanasas o celobiohidrolasas

Existen dos tipos diferentes de exoglucanasas, conocidas como celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) y celodextrinasa (EC 3.2.1.74)⁷⁰. Ambos tipos de enzima actúan sobre los extremos de las cadenas celulósicas liberando celobiosa como producto, si bien las celodextrinasas actúan sólo sobre celooligosacáridos⁷⁰. Este tipo de enzimas contienen estructuras tipo túnel, que permiten desplazarse a la enzima a lo largo del punto de unión hasta el punto de rotura en el que se produce la liberación de la celobiosa⁵⁵. Como ejemplo de estructura tridimensional para este tipo de enzimas, en la figura 6 se muestra un ejemplo de una enzima Cel48S de la familia GH48s obtenida del microorganismo *Clostridium thermocellum*⁷².

4.1.3. Enzimas β -glucosidasas

La última parte del proceso de degradación de celulosa en glucosa la catalizan las enzimas β -glucosidasas, que pertenecen a las familias GH1 y GH3 de la clasificación CAZy⁵⁵. Son activas frente a celobiosa y a

determinados tipos de celooligosacáridos, teniendo un centro activo con forma de bolsillo que detecta el extremo no reductivo de ambos tipos de moléculas⁵⁵. Además, estas enzimas provocan un efecto sinérgico sobre la actividad de los otros dos grupos de enzimas, ya que reducen la concentración de celobiosa y celobiohidrolasa que poseen un claro efecto inhibitorio tanto en las endoglucanasas como especialmente en las exoglucanasas⁷³. A modo de ejemplo, se muestra en la figura 7 la estructura tridimensional de una β -glucosidasa originaria de la planta de arroz expresada en *Escherichia coli*⁷⁴.

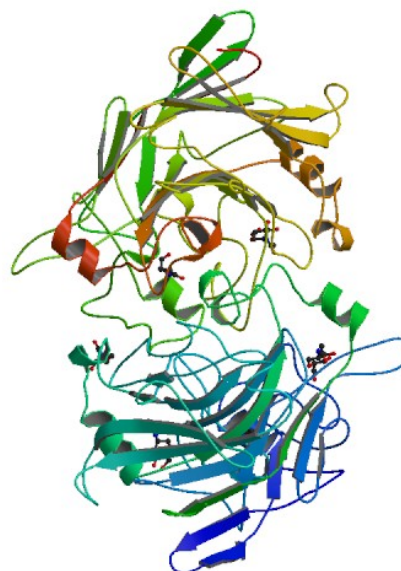


Figura 5. Estructura tridimensional de endoglucanasa de *Trichoderma reesei*⁷¹



Figura 6. Estructura tridimensional de la enzima Cel48S de *Clostridium thermocellum*⁷¹

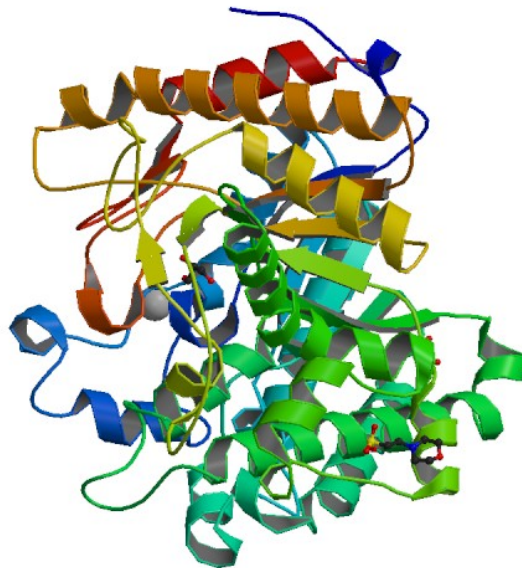


Figura 7. Estructura tridimensional de una enzima β -glucosidasa originaria de la planta del arroz expresada en *E. coli*⁷⁴

4.2. Fenomenología de la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos

4.2.1. Reacción en fase sólida: Despolimerización y rotura de la estructura celulósica

Aunque el proceso global consiste en la liberación de los monosacáridos presentes inicialmente en la estructura lignocelulósica, durante la primera parte del mismo, se produce una etapa de disminución de la complejidad del sólido, reacción que transcurre tanto sobre la superficie del sólido como en la interfase con el líquido en el que se encuentra sumergido. Este colapso de la estructura conlleva la solubilización del sólido inicial, y la conversión en monosacáridos, pasando por productos intermedios y otras sustancias presentes en la composición de los materiales lignocelulósicos. Por lo tanto, se puede dividir el proceso en tres partes diferenciadas⁷⁵:

- Cambios físicos y químicos en el sustrato sólido,
- hidrólisis inicial de la celulosa, liberando oligómeros,
- una última etapa de transformación de estos oligómeros en monómeros.

Sin embargo, la primera parte de la degradación del residuo lignocelulósico es un proceso que no es considerado frecuentemente en la bibliografía, debido a su complejidad y a las múltiples enzimas que participan en esta etapa del proceso⁷⁶. Estas enzimas se conocen también como enzimas accesorias, y entre las más importantes destacan las polisacárido-deacetilasas, cuyo sustrato objetivo son biopolímeros como la quitina⁷⁷, las enzimas peroxidadasas y enzimas estererasas, cuya actividad provoca la rotura de la lignina que protege la celulosa del ataque de otras enzimas⁷⁸. Este tipo de enzimas se encuentran presentes en el complejo enzimático secretado por los hongos que tienen capacidad para degradar

el material lignocelulósico, lo que hace que esta mezcla de enzimas sea más efectiva que el celulosoma excretado por otros microorganismos, como por ejemplo las bacterias⁷⁶.

Tras esta primera fase de despolimerización, se produce el ataque de las enzimas que se dedican, propiamente, a la degradación de la celulosa. Inicialmente, las enzimas endoglucanasas se encargan de romper las cadenas celulósicas, hidrolizando de forma aleatoria enlaces β -(1,4)-glicosídicos, formando extremos tanto reductores como no⁷⁵. Una vez liberados estos extremos reductores, las enzimas exoglucanasas actúan sobre estos extremos reducidos liberando oligosacáridos⁷⁵. La acción de estas enzimas, por lo tanto, se produce sobre la superficie del sólido⁷⁶, para lo que es necesario que ocurra una etapa previa de adsorción de endo y exoglucanasas sobre dicha superficie, a través de su dominio de unión, formando un complejo enzima-sustrato como paso previo a la formación de los productos de hidrólisis⁷⁹. Sin embargo, debido a la complejidad del celulosoma implicado en la reacción, aún se encuentra bajo investigación el mecanismo exacto a través del que transcurre la reacción de hidrólisis que llevan a cabo ambos tipos de enzimas.

4.2.2. Reacción en fase líquida: Oligosacáridos y celobiosa

Una vez colapsada la estructura celulósica, se liberan oligosacáridos al medio. Esta producción de oligosacáridos hace que entre en juego el último grupo de enzimas celulolíticas: las β -glucosidasas^{76, 80}. Estas reacciones, debido a la solubilidad de los compuestos generados, transcurre en fase líquida⁷⁹, y es el último paso de la obtención de los monosacáridos de la estructura celulósica inicial.

Por otro lado, para aumentar la velocidad global del proceso, los cócteles enzimáticos empleados en la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos son suplementados con enzimas β -glucosidasas

obtenidas de microorganismos cuya capacidad productora es mayor que los hongos celulolíticos descritos anteriormente⁸¹.

Aunque los productos finales de este proceso son sencillos de evaluar y de seguir a lo largo del proceso de hidrólisis, conviene resaltar que la medida de la concentración y presencia de oligosacáridos se ve dificultada por la complejidad de los mismos. Asimismo, la acción de las propias enzimas β -glucosidasas no se reduce exclusivamente a la celobiosa, pudiendo ser este tipo de enzimas activas sobre oligosacáridos de cadena corta⁸⁰, haciendo necesario un estudio más profundo de los productos de hidrólisis y su evolución a lo largo de la reacción.

4.2.3. Fenómenos asociados a las reacciones enzimáticas

Debido a la alta complejidad del sistema estudiado, existen diferentes fenómenos que pueden tener lugar por la actuación de las distintas enzimas empleadas en el proceso de obtención de monosacáridos a partir de la biomasa lignocelulósica, que pueden tener un efecto importante sobre la cantidad final de monosacáridos obtenida así como la velocidad del proceso, que se comentan a continuación.

Inhibición de las enzimas por la presencia de diversos compuestos

Los compuestos inhibitorios están presentes a lo largo del proceso de hidrólisis enzimática, y su origen no sólo se encuentra en las sustancias liberadas durante la degradación de la estructura de la celulosa, sino que también pueden proceder del pre-tratamiento al que se sometan las diferentes biomasas lignocelulósicas.

Una parte de los posibles inhibidores generados durante la etapa de pre-tratamiento son los fragmentos procedentes de la degradación de la lignina, que forman compuestos fenólicos como el alcohol *p*-cumarílico o el alcohol coniferílico, que producen una desactivación de las enzimas al

interaccionar con los centros activos ⁸². Otro tipo de compuestos que inhiben fuertemente la acción de las enzimas celulasas, e incluso el posterior proceso de fermentación, son los compuestos derivados del furano, siendo los más abundantes el furfural y el hidroximetilfurfural ⁸³. Ambos compuestos se originan de la degradación de xilosa y glucosa a altas temperaturas y presiones, y son un subproducto que aparece en cierta cantidad en los pre-tratamientos más comunes empleados en la actualidad, tales como el tratamiento con ácido diluido o la explosión por vapor ⁸³. Sin embargo, los inhibidores más importantes se originan durante el propio proceso de hidrólisis; se trata, por un lado, de oligómeros de cadena corta para las endo y exoglucanasas (especialmente la celobiosa), y de la glucosa para la β -glucosidasa⁵⁵.

Efecto sinérgico de la actividad de un tipo de enzima sobre las demás

La sinergia, del latín científico *synergia* ('tarea coordinada'), y del griego *synergía* ('cooperación'), se define como la acción de dos o más causas cuyo efecto es superior a la suma de los efectos individuales, siendo además su definición para biología el concurso activo y concertado de varios órganos para realizar una función⁸⁴. En el sistema estudiado, la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica, debido a la gran variedad de enzimas presentes en el proceso, los efectos sinérgicos de la actividad de cada una de ellas sobre las actividades de las demás han de ser tenidos en consideración de cara a realizar un estudio pormenorizado del mecanismo de reacción del proceso global⁷⁵. De hecho, analizando la actividad correspondiente de cada enzima involucrada en el proceso por separado y comparando la actividad global con la suma de cada actividad individual, es posible observar que para el conjunto de las enzimas celulolíticas se produce un aumento en la suma de la actividad debido a su acción conjunta^{55, 85}.

Si bien la profundidad y ramificación de los efectos es difícil de evaluar debido a la complejidad del celulosoma involucrada en la degradación de la celulosa, es probable que este efecto sinérgico se deba a que las enzimas de las etapas posteriores de la reacción, especialmente las β -glucosidasas, eliminan compuestos que actúan como fuertes inhibidores de la reacción de las enzimas de las primeras etapas (oligosacáridos, especialmente la celobiosa)^{55, 75, 80}, si bien también pueden existir otros factores sinérgicos por las enzimas auxiliares, como puede ser la facilitación del transporte o la disminución de la cristalinidad de la celulosa⁵⁵.

Efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas

Debido a la naturaleza (mesofílica o termofílica) de los microorganismos de los que se obtienen los cócteles empleado para la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica, se considera que las enzimas celulolíticas son termoestables⁸⁶. Si bien, el concepto de termo-estabilidad es relativo, se considera que este tipo de enzimas tienen un rango de funcionamiento óptimo situado entre 40 y 50 °C, dependiendo del tipo de enzima y de su origen⁸⁶.

Por otro lado, en este tipo de enzimas se cumple que la actividad inicial aumenta al aumentar la temperatura, efecto que se produce mientras que la estructura y funcionalidad de la misma no se vean comprometidas por una temperatura excesiva⁸⁶. Sin embargo, el aumento de temperatura, si bien produce un incremento en la actividad inicial, puede llevar aparejado, especialmente en el caso de las enzimas β -glucosidasas al estar en fase líquida, una disminución de la actividad a tiempos largos de proceso^{81, 86}.

Actualmente, se están tratando de obtener nuevas enzimas de bacterias termófilas híper termoestables⁸⁶; no obstante, la desactivación que se

produce debido a la inestabilidad térmica de alguna de las enzimas del complejo celulolítico puede jugar un papel importante a la hora de describir de forma adecuada la fenomenología del proceso.

4.2.4. Transferencia de materia y su implicación en la hidrólisis enzimática

La transferencia de materia es un fenómeno cuya importancia varía en función de la naturaleza de los procesos involucrados en el sistema estudiado. En este caso, la reacción enzimática para la degradación de celulosa implica un sistema bifásico en el que el catalizador (las enzimas, disueltas en el medio) y el sustrato (celulosa, insoluble en el medio) se encuentran en fases diferentes. Por ello, la descripción del transporte entre fases debe tenerse en cuenta de cara a obtener una descripción realista del transcurso del proceso.

Uno de los factores, por lo tanto, a tener en cuenta en este caso es la accesibilidad de las enzimas al sustrato. Esta accesibilidad, que se puede determinar mediante estudios de adsorción de la enzima en la matriz celulósica, se ve impedida por la disposición que adoptan tanto la lignina como la hemicelulosa en los residuos lignocelulósicos⁸⁷. Por una parte, la lignina se liga de forma no productiva a las endo y exoglucanasas, propiciando una caída notable en la actividad observada de las mismas^{88, 89}. Por otro lado, la propia celulosa posee capacidad de propiciar la adsorción de las enzimas, ya sea por la aparición de enlaces improductivos⁹⁰ o por el cambio en la porosidad de la celulosa durante la hidrólisis, que provoca un atrapamiento efectivo de las enzimas después de la liberación del producto, impidiendo su unión a un nuevo sustrato, disminuyendo su actividad efectiva⁹¹⁻⁹³.

El otro factor relevante es la carga inicial de sólido requerida para la obtención de una concentración de monosacáridos necesaria para la

posterior transformación en productos finales de forma rentable. Tal y como se pone de manifiesto en los trabajos publicados en la literatura, la cantidad mínima de sólidos necesaria ronda el 15 % en masa, si bien se suele emplear una cantidad del 20 % dependiendo de la biomasa lignocelulósica empleada⁹⁴. Por lo tanto, la viscosidad del sistema, en especial para los momentos iniciales de la reacción, provoca que asegurar una correcta transferencia de materia sea un aspecto clave de cara a la posible implementación de este tipo de procesos a escala industrial⁹⁴.

4.3. Modelos cinéticos de la hidrólisis enzimática

4.3.1. Evolución de los modelos cinéticos: tipos y clasificación

Debido a la complejidad del sistema en estudio por la gran variedad de fenómenos y reacciones que transcurren de forma simultánea, no existen muchos modelos cinéticos publicados en bibliografía que sean capaces de describir la evolución de la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos de forma aceptable⁷⁹. A modo de referencia, se hace una mención a los más relevantes encontrados en la literatura en la Tabla 4. Si bien la mayor parte de ellos emplean premisas similares, Bansal y col. establecieron una categorización de los modelos en cuatro tipos diferentes⁷⁹:

- **Modelos empíricos.** Son modelos cinéticos sin, o con apenas, base mecanística, que utilizan ecuaciones cinéticas empíricas; su objetivo es conseguir una buena predicción de la velocidad del proceso, así como la descripción de la evolución de algunos de los compuestos involucrados en la hidrólisis enzimática⁷⁹.

Tabla 4A. Modelos cinéticos para la descripción de las hidrólisis enzimáticas más relevantes presentes en la literatura

Autor	Biomasa	Esquema de reacción	Referencia
Schell y col.	Madera leñosa pre-tratada	$\text{Celulosa} \xrightarrow{R_1} \text{Celobios} \xrightarrow{R_2} \text{Glucosa}$ $\text{Celulosa} \xrightarrow{R_3} \text{Glucosa}$	96
Kiram y col.	Paja de maíz pre-tratada	$\text{Celulosa} \xrightarrow{R_1} \text{Celobios} \xrightarrow{R_2} \text{Glucosa}$ $\text{Celulosa} \xrightarrow{R_3} \text{Glucosa}$	97
Liao y col.	Fibras pre-tratadas de estiércol de lechería	$\text{Celulosa} \xrightarrow{R} \text{Glucosa}$	98
Zheng y col.	<i>Leymus triticoides</i> pre-tratado	$\text{Celulosa} \xrightarrow{R_1} \text{Celobios} \xrightarrow{R_2} \text{Glucosa}$ $\text{Celulosa} \xrightarrow{R_3} \text{Glucosa}$	99

$$r_1 = \frac{k_1' \cdot C_{\text{Cel}} \cdot e^{-\lambda \cdot t}}{1 + \frac{C_G}{K_{1G}} + \frac{C_G}{K_{1G}} + \frac{C_G}{K_{1G}}}$$

$$k_1' = \frac{k_1 \cdot (C_E)_T \cdot C_E^*}{K_{\text{eq}} + (C_E)_T \cdot C_E^*} \quad i = 1, 3$$

$$k_2' = k_2 \cdot (C_E)_T \cdot C_{E_G}^* \cdot (1 - K_1 \cdot C_1)$$

$$r_1 = \frac{k_{1R} \cdot C_{E1B} \cdot R_S \cdot C_{\text{Cel}}}{1 + \frac{C_{G2}}{K_{1/G2}} + \frac{C_G}{K_{1/G}} + \frac{C_X}{K_{1/X}}}$$

$$r_2 = \frac{k_{2R} \cdot (C_{E1B} + C_{E2B}) \cdot R_S \cdot C_{\text{Cel}}}{1 + \frac{C_{G2}}{K_{1/G2}} + \frac{C_G}{K_{1/G}} + \frac{C_X}{K_{1/X}}}$$

$$r_3 = \frac{K_{3M} \left(1 + \frac{C_G}{K_{3IG}} + \frac{C_X}{K_{3IX}} \right) + C_{G2}}{C_{E1B} \cdot K_{3M} + C_{E1F} \cdot C_{\text{Cel}}}$$

$$r = \frac{k \cdot \left(\frac{C_{\text{Cel}}}{C_{\text{Cel}0}} \right)^\lambda \cdot C_{\text{Cel}}}{1 + \frac{C_G}{K_{1G}}}$$

$$r_1 = \frac{k_{1R} \cdot C_{E1BC} \cdot R_S \cdot C_{\text{Cel}}}{1 + \frac{C_{G2}}{K_{1/G2}} + \frac{C_G}{K_{1/G}}}$$

$$r_2 = \frac{k_{2R} \cdot C_{E1BC} \cdot R_S \cdot C_{\text{Cel}}}{1 + \frac{C_{G2}}{K_{2/G2}} + \frac{C_G}{K_{2/G}}}$$

$$r_3 = \frac{K_{3M} \left(1 + \frac{C_G}{K_{3IG}} \right) + C_{G2}}{C_{E1B} \cdot K_{3M} + C_{E1F} \cdot C_{\text{Cel}}}$$

Tabla 4B. Modelos cinéticos para la descripción de las hidrólisis enzimáticas más relevantes presentes en la literatura

Autor	Wang y Feng	Gupta y col	Zhang y col. Ruiz y col.	Aguiar y col.
Biomasa	Varios	Madera de <i>Prosopis juliflora</i> pre-tratada	Paja de trigo pre-tratada	Bagazo de caña de azúcar pre-tratado
Esquema de reacción	Celulosa \xrightarrow{r} Glucosa	Celulosa \xrightarrow{r} Glucosa	Celulosa \xrightarrow{r} Glucosa	Celulosa \xrightarrow{r} Glucosa
Ecuaciones cinéticas	$r = k_t \cdot C_{Cel}$ $k_t = k \cdot V \quad t = 0$ $k_t = k \cdot t^{-h} \quad V \quad t > 0$	$r = k_t \cdot C_{Cel}$	$r = \frac{k_2 \cdot C_{Cel0} \cdot C_{E0}}{(1 + k_3 \cdot t) \cdot (K_e + C_{E0})}$	$r = k_t \cdot C_{Cel}$ $k_t = k \cdot V \quad t = 0$ $k_t = k \cdot t^{-h} \quad V \quad t > 0$
Referencia	100	101	102, 103	104

Tabla 4B. Modelos cinéticos para la descripción de las hidrólisis enzimáticas más relevantes presentes en la literatura

Autor	Biomasa	Esquema de reacción	Ecuaciones cinéticas	Referencia
Neto y col.	Bagazo de caña de azúcar pre-tratado	$\text{Celulosa} \xrightarrow{r_1} \text{Celobios} \xrightarrow{r_2} \text{Glucosa}$	$r_1 = \frac{K_1 \cdot C_{\text{cel}} \cdot e^{-\lambda \cdot t}}{1 + \frac{C_c}{K_{1c}} + \frac{C_g}{K_{1g}}}$ $r_2 = \frac{K_2 \cdot C_c}{K_2 \cdot C_c}$ $K_1 = \frac{K_M \cdot \left(1 + \frac{C_g}{K_{2g}}\right) + C_c}{k_1 \cdot C_{\text{EC}}}$ $K_2 = k_2 \cdot C_{\text{EG}} \cdot (1 - K_L \cdot C_L)$	105
Tian y col.	Paja de maíz pre-tratada	$\text{Celulosa} \xrightarrow{r} \text{Glucosa}$	$r = k_t \cdot C_{\text{cel}}$ $k_t = k \cdot V \cdot t = 0$ $k_t = k \cdot t^{-n} \quad V \cdot t > 0$	106

- **Modelos basados en la ecuación de Michaelis-Menten.** Utilizan el mecanismo descrito por Michaelis-Menten a principios del siglo pasado⁹⁵, que supone un mecanismo de tres pasos: unión de enzima con el sustrato, activación de la misma produciendo la transformación en producto (ambas etapas reversibles) y finalmente la separación del producto de la enzima (irreversible).
- **Modelos con adsorción de enzima.** Se trata de modelos cinéticos que, profundizando en el mecanismo descrito para los modelos basados en la cinética de Michaelis-Menten, describen la caída de actividad que sufre

la enzima por la adsorción improductiva o bien sobre el sustrato o bien sobre la lignina o la hemicelulosa⁷⁹.

- **Modelos que describen la evolución de los oligosacáridos solubles.** Estudian tanto la formación como el consumo de estos compuestos, que pueden ser determinados de forma más precisa debido a su carácter soluble. Existen muy pocos trabajos al respecto, no siendo ninguno de ellos muy relevante, ni se ha apostado por la descripción cinética del sistema de hidrólisis enzimática de esta manera de forma reciente⁷⁹.

Teniendo en cuenta esta clasificación, a continuación se hará una breve descripción de los tres tipos de modelos cinéticos más relevantes presentes en la literatura.

4.3.2. Modelos cinéticos empíricos

Dentro de este tipo de modelos cinéticos, se encuadran varios tipos de aproximaciones que se pueden encontrar en la literatura. Entre ellos, los más relevantes son los modelos cinéticos de tipo fractal, basados en las hipótesis de la cinética fractal formulada por Kopelman en 1988¹⁰⁷. La cinética fractal, aplicada a la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos supone que, debido a la presencia del sólido celulósico, la ley de acción de masas no se cumple¹⁰⁰; es decir, debido a la imposición estérica del sólido, el contacto efectivo entre la enzima y la celulosa no puede darse en cualquier dirección del espacio, limitando así la actividad de las enzimas¹⁰⁰.

Por ello, los autores que plantean modelos cinéticos fractales apuestan por modificar el valor que adopta la constante cinética de la ecuación cinética para ajustar los datos experimentales. En los modelos descritos en la literatura, publicados por Wang y Feng¹⁰⁰, Aguiar y col.¹⁰⁴ y Tian y col.¹⁰⁶, los autores deciden describir el mecanismo como una reacción única en la que la celulosa se transforma directamente en glucosa,

utilizando para describir la evolución de la velocidad de reacción una ecuación cinética potencial de primer orden ^{100, 104, 106}, como se muestra a continuación:

$$r = k' \cdot C_{Cel} \quad (1)$$

En esta ecuación, r representa la velocidad de reacción, expresada en función de la constante cinética aparente (k'), proporcional a la concentración de celulosa restante (C_{Cel}). Con el objeto de dotar de carácter fractal a la ecuación cinética (1), los autores establecen la siguiente evolución para la constante k' con el tiempo.

$$k' = k \quad \forall \quad t = 0 \quad (2)$$

$$k' = k \cdot t^{-h} \quad \forall \quad t > 0 \quad (3)$$

Es decir, para el primer choque efectivo ($t = 0$), el valor de la constante es el mismo que adoptaría la misma si se cumpliera la ley de acción de masas (k), mientras que tras este choque el valor de k disminuye a lo largo del tiempo en función de un factor fractal (h). Si bien h es una constante puramente empírica, su significado se puede ligar a un concepto de accesibilidad de las enzimas al sólido, puesto que una menor accesibilidad está relacionada con una velocidad de hidrólisis menor. En estos trabajos ^{100, 104, 106} se demuestra que, en condiciones en las que el sólido es menos accesible, el valor de h aumenta.

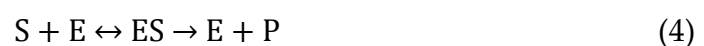
Empleando otra aproximación, Gupta y col.¹⁰¹ plantean el mismo esquema de reacción, utilizando también la misma ecuación cinética. Sin embargo, para describir k' realizan una serie de experimentos en los que alimentan la biomasa en varias cargas sucesivas¹⁰¹. A partir de los datos obtenidos en estos experimentos, se propone una correlación de k' que les permite fijar la cantidad de alimento necesaria en cada una de las cargas¹⁰¹; es decir, es posible correlacionarlo con un parámetro de

operación necesario (alimento), pero no se logra describir de forma correcta el mecanismo a través del que se produce la reacción.

Por lo tanto, se puede decir que, si bien los modelos empíricos son capaces de proporcionar información relevante sobre la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos, no describen ni tienen en cuenta la fenomenología asociada a este tipo de sistemas complejos. Sin embargo, pueden emplearse como una primera aproximación válida para el estudio de modelos más elaborados.

4.3.3. Modelos cinéticos basados en la hipótesis de Michaelis-Menten

Los modelos cinéticos que utilizan la cinética descrita por Michaelis y Menten llevan empleándose desde su planteamiento para la descripción de todo tipo de sistemas de reacción enzimáticos⁹⁵, ya que permiten obtener un modelo cinético sencillo con una cantidad limitada de datos experimentales, aportando cierta profundidad mecanística. Este tipo de modelos han sido empleados de forma profusa para describir la hidrólisis enzimática de celulosa⁷⁹. El modelo descrito por Michaelis y Menten propone que, para una enzima (E), que reacciona con un sustrato (S) para dar un producto (P), lo hace a través de dos etapas. En la primera, se produce una unión reversible entre la enzima y el sustrato (ES), mientras que en la segunda etapa se lleva a cabo la reacción de transformación en el producto y su separación del sustrato, de acuerdo a la ecuación (4).

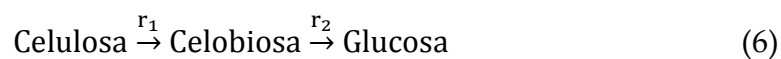


Suponiendo que la concentración de sustrato presente está en exceso, y que se cumple la ley de acción de masas, es posible obtener una ecuación cinética global simplificada del proceso, según la siguiente ecuación (5).

$$r = \frac{k \cdot C_E \cdot C_S}{K_M + C_S} \quad (5)$$

C_E y C_S son las concentraciones de enzima y sustrato, respectivamente. La constante cinética k , también conocida como número de recambio, hace referencia al número de moléculas de sustrato por unidad temporal que es capaz de procesar el centro activo de la enzima, mientras que K_M se conoce como afinidad, y posee el valor de la mitad de la máxima velocidad de reacción alcanzada. Es decir, este modelo permite conocer la velocidad de transformación potencial que posee una enzima para un determinado sustrato. Sin embargo, este tipo de modelos se basan en el cumplimiento de la ley de acción de masas, suposición que en este caso es cuestionable debido a la heterogeneidad del medio en el que se produce la reacción enzimática. De esta manera, debido a que la reacción se lleva a cabo en la superficie de un sólido (dificultando el acceso de las enzimas al mismo), no se produce en un exceso de sustrato respecto a la enzima, que es una condición empleada para la asunción del estado cuasi-estacionario implícito en este tipo de modelos⁷⁹.

Aun así, existen trabajos en la literatura que han intentado emplear este tipo de modelos para ajustar la evolución de los datos experimentales durante la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos. Destaca entre ellos el trabajo de Schell y col.⁹⁶ que plantea un esquema de reacción en el que se fijan tres reacciones diferentes, conversión de celulosa a celobiosa, de celobiosa a glucosa y de celulosa a glucosa de forma directa, tal y como se ve en las ecuaciones (6) y (7).



Por otro lado, los autores suponen que las enzimas involucradas en el proceso sufren inhibición por la presencia de celobiosa y de glucosa; además, modifican la constante cinética, así como la velocidad de

reacción, con un parámetro específico dependiente del tiempo relacionado con la evolución de la superficie de la celulosa accesible⁹⁶. La ecuación resultante, modificada para cada reacción, se muestra en la ecuaciones (8) a (10)⁹⁶.

$$r_i = \frac{k'_i \cdot C_{Cel} \cdot e^{-\lambda \cdot t}}{1 + \frac{C_C}{K_{IC}} + \frac{C_G}{K_{IG}}} \quad i = 1,3 \quad (8)$$

$$k'_i = \frac{k_i \cdot (C_E)_T \cdot C_E^*}{k_{eq} + (C_E)_T \cdot C_E^*} \quad i = 1,3 \quad (9)$$

$$k'_2 = k_2 \cdot (C_E)_T \cdot C_{EG}^* \cdot (1 - K_L \cdot C_L) \quad (10)$$

Donde λ es el parámetro que recoge la evolución de la superficie, K_{IC} es la constante de inhibición causada por la celobiosa, K_{IG} es la inhibición provocada por la glucosa. Asimismo, $(C_E)_T$ es la concentración total de enzima mientras que C_E^* es la concentración de enzima que se encuentra ligada al sustrato.

Finalmente, los autores introducen una variante al modelo, que consiste en suponer, para la segunda reacción, que las enzimas β -glucosidasas sufren una desactivación parcial al ligarse a la lignina, hecho que se refleja en la ecuación (10), en la que aparece la concentración de lignina (C_L), así como la constante de equilibrio para la formación del complejo enzima-lignina (K_L)⁹⁶.

4.3.4. Modelos cinéticos modificados con modelos de adsorción

Si bien la cinética de Michaelis-Menten permite obtener una aproximación a veces adecuada para sistemas sencillos, especialmente si la hidrólisis se lleva a cabo sobre celulosa pura, esta simplificación resulta insuficiente para hidrólisis enzimáticas de materiales lignocelulósicos complejos o reales, especialmente en los casos en los que la proporción de sólidos inicial es elevada, ya que no conduce a una buena descripción de los datos experimentales obtenidos.

Por lo tanto, algunos autores en la literatura complementan la estructura base de la cinética de Michaelis-Menten añadiendo un proceso físico de adsorción reversible de las enzimas sobre el sustrato celulósico⁷⁹. De esta manera, utilizan dos tipos de cinéticas de adsorción para describir este fenómeno: mediante ecuaciones cinéticas empíricas o empleando una isoterma de adsorción de Langmuir.

Zhang y col.¹⁰² y Ruiz y col.¹⁰³, cuyo trabajo está basado en el anterior, describen la hidrólisis enzimática como un proceso de una única etapa. Además, proponen una ecuación tipo Michaelis-Menten para describir la evolución de la velocidad de reacción. Sin embargo, para describir la variación en la concentración de enzima, utilizan una ecuación empírica de orden uno para tener en cuenta la desactivación de la actividad enzimática, debido a la adsorción de la enzima en el sustrato, según la ecuación (11).

$$\frac{dC_E}{dt} = k_E \cdot C_E \quad (11)$$

Donde k_E es la constante de desactivación enzimática causada por la adsorción. De esta manera, los autores consiguen obtener un ajuste mejor del modelo a los datos experimentales^{102, 103}.

En cuanto a los modelos con isotermas de adsorción de Langmuir, destaca el modelo de Kiram y col.⁹⁷, que emplea el mismo esquema de reacción descrito por Schell y col.⁹⁶ y las mismas ecuaciones cinéticas, añadiendo un término de inhibición por xilosa⁹⁷. La diferencia de este trabajo radica en la descripción de la variación de la concentración de enzima causada por la adsorción, que se recoge en la ecuación (12).

$$C_{E1B} = \frac{C_{E1max} \cdot k_{iad} \cdot C_{EIF}}{1 + k_{iad} \cdot C_{EIF}} \quad (12)$$

Donde se observa que la concentración de las enzimas encargadas de la descomposición de celulosa en celobiosa (nombradas como C_{E1B}) depende

de la constante de adsorción ($k_{i,ad}$), dando lugar a un comportamiento final asintótico, es decir, alcanzando una concentración de enzima de saturación o de equilibrio, lo que es capaz de describir la caída de actividad de las enzimas durante la reacción enzimática^{79, 97}.

Un modelo cinético similar, con la misma ecuación de adsorción y esquema de reacción ha sido aplicado también por Zheng y col.⁹⁹ y por Neto y col.¹⁰⁵, en estos casos no se tiene en cuenta la inhibición enzimática causada por la presencia de xilosa en el medio. Si bien estos modelos son capaces de reproducir de forma correcta los datos obtenidos durante la hidrólisis enzimática de lignocelulosas, no describen la compleja fenomenología implicada en la hidrólisis enzimática citada anteriormente.

4.4. Descripción cinética de la transferencia de materia entre fases

4.4.1. Cálculo de la velocidad de transferencia de materia

La hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos, tal y como se ha descrito antes, es un proceso heterogéneo en el que se ven involucradas una fase sólida (celulosa, hemicelulosa y lignina) y una fase líquida (en la que están presentes las enzimas). Por lo tanto, una de los fenómenos que cobra importancia en el contexto de la descripción cinética del proceso y que puede determinar la velocidad del mismo es la transferencia de materia.

La transferencia de materia se produce en un sistema cuando aparece un desequilibrio en la concentración de un componente o varios entre dos fases diferentes e inmiscibles entre sí¹⁰⁸. Esta transferencia se da desde la fase con mayor concentración del compuesto, pudiendo ser de dos tipos diferentes: difusional, en la que no existe ningún movimiento en la fase a

través de la que se produce el transporte, o convectiva, que ocurre en los fluidos que poseen un movimiento turbulento en su interior¹⁰⁹. Dado que en la interfase que se forma cuando se ponen en contacto dos fases diferentes se comporta como un fluido de carácter laminar, en esta región la transferencia predominante será la difusional, cuya progresión es mucho más lenta que la de tipo convectivo¹⁰⁹. Ya que la velocidad de un proceso viene determinada por la etapa más lenta del mismo, esta transferencia difusional marcará la rapidez con la que se produce el transporte de determinado compuesto de una fase a otra.

Para determinar la velocidad de transferencia de materia, se debe calcular por lo tanto su velocidad de transferencia difusional. Debido a la dificultad de la obtención de los diversos parámetros moleculares que son necesarios para determinar con precisión la difusión molecular, es común expresar de forma empírica la velocidad de transferencia de materia, como se muestra en la ecuación (13)¹¹⁰.

$$J_i = H \cdot \Delta C_i \quad (13)$$

Donde J_i es el flujo del componente entre fases, ΔC_i es la diferencia de concentraciones entre ambas fases (también conocida como fuerza impulsora) y H es el coeficiente de transferencia de materia global, que traslada de forma empírica la resistencia que ejerce el sistema a llevar a cabo la transferencia entre fases¹¹⁰. Este coeficiente, que depende de los parámetros físicos del sistema (tales como temperatura, presión, densidad, etc.), se define de forma diferente en función del tipo de fases entre las que se produce la transferencia de materia¹¹⁰. Es decir, a partir de las diferentes propiedades físicas que afectan al coeficiente de transferencia de materia, es posible calcular el flujo del componente o componentes a través de su determinación. La medida de este tipo de coeficientes se realiza de forma empírica correlacionando las distintas

variables físicas que influyen en el transporte de masa, que se expresan a través de diferentes números adimensionales¹¹⁰.

4.4.2. Acople de la transferencia de materia y la hidrólisis enzimática

Durante la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica la transferencia de materia que influye en la velocidad del proceso ocurre cuando las enzimas deben transportarse desde la fase líquida en la que están hasta la superficie del sólido donde se produce la interacción con la celulosa^{79, 90}.

Si bien se trata de un fenómeno relevante, debido a la complejidad de los análisis necesarios para la determinación del flujo de transferencia de materia a través del cálculo del coeficiente de transferencia de materia, no existen muchos estudios en bibliografía que analicen este fenómeno. Más aún, la transferencia de materia además afecta directamente a la posible adsorción de las enzimas sobre el sustrato celulósico, cuyo estudio, sin embargo, ha sido priorizado por numerosos autores⁹⁴.

5. Cambio de escala del proceso de hidrólisis enzimática

5.1.1. Determinación de la reología y cálculo de la potencia disipada

Existen algunos esfuerzos, en trabajos experimentales, para determinar la reología concreta del sistema lignocelulósico, uno de los pilares fundamentales necesarios para la descripción de la transferencia de materia en la hidrólisis de materiales lignocelulósicos¹¹¹. A su vez, varios autores han destacado la posible influencia negativa de la velocidad de transferencia de materia limitada sobre la velocidad global del proceso de hidrólisis, proponiendo varias alternativas de cara a facilitar este transporte de las enzimas desde la fase líquida a la matriz celulósica^{94, 112}.

Sin embargo, aún no se han descrito trabajos en la literatura incluyendo la transferencia de materia en los modelos cinéticos que describen la

hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos. Este es uno de los objetivos que se aborda en el presente trabajo.

Uno de los parámetros fundamentales a la hora del establecimiento de un proceso a escala industrial, es el cálculo de la energía que se necesita suministrar al proceso. En el caso de la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos, debido a que la carga de sólidos debe ser elevada para asegurar una producción suficiente de monosacáridos, el cálculo de la energía disipada cobra aún más importancia¹¹³.

Si bien la energía que se necesita suministrar durante a hidrólisis enzimática se dedica a varias operaciones, tales como el mantenimiento de la temperatura o el transporte del sólido pre-tratado, la mayor parte de la energía gastada corresponde a la facilitación de la mezcla del sólido con las enzimas a través de diferentes métodos¹¹³. Para evaluar la energía requerida para la mezcla, es necesario conocer en profundidad los parámetros físicos tanto del sólido como de la fase líquida.

Uno de las características más determinantes del grado y tiempo de mezcla es la reología del sistema. Para estudiar este aspecto, hay que determinar la relación entre el esfuerzo y la deformación en los materiales que tienen capacidad de fluir. Si bien la determinación de la reología de manera global es imposible, debido a la gran variedad de materiales lignocelulósicos existentes, Tien-Cuong y col.^{111, 114} realizaron una revisión de los parámetros reológicos correspondientes a distintos tipos de biomasa lignocelulósica, así como diferentes métodos para su determinación.

A partir de la determinación de los parámetros reológicos, y de forma similar al caso del transporte de materia, a través de correlaciones empíricas, es posible determinar la potencia energética que se debe suministrar para que la mezcla entre enzimas y sustrato se asegure. Éste

cálculo de potencia disipada depende del tipo de reactor que se emplee para realizar la hidrólisis enzimática de los residuos lignocelulósicos.

5.1.2. Cambio de escala: criterios

El cambio de escala en los procesos industriales consiste en la traslación de la operación que se lleva a pequeña escala, empleando cantidades limitadas de reactantes y productos, a una escala mayor, es decir, la obtención de mayores cantidades de producto final manteniendo las mismas premisas y calidades relativas al proceso de producción. Para que este proceso sea posible, es necesario conocer de manera precisa la fenomenología involucrada en el mismo, y es preciso estimar el efecto que puede producir sobre esta fenomenología el aumento de las proporciones a la hora de llevar a cabo el proceso de producción.

Debido a la complejidad de muchos de los sistemas industriales, es necesario encontrar métodos de estimación que permitan obtener una aproximación adecuada, que rinda resultados suficientemente correctos, para poder asegurar un cambio de escala correcto, manteniendo no sólo las propiedades de los productos finales deseados, sino también asegurando la viabilidad y seguridad del proceso.

Por lo tanto, en el caso de la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos, es necesario aplicar estos conceptos utilizando criterios que permitan superar la limitación del conocimiento del sistema de reacción¹¹⁵. Si bien en el futuro la aplicación de este tipo de criterios será fundamental de cara a la implementación y el diseño de instalaciones para la producción de productos derivados de la biorrefinería, en la actualidad aún no se han realizado debido a la complejidad del proceso de hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos.

6. Bibliografía

1. Coma M, Martinez-Hernandez E, Abeln F, Raikova S, Donnelly J, Arnot TC, Allen MJ, Hong DD and Chuck CJ, Organic waste as a sustainable feedstock for platform chemicals. *Faraday Discussions* **202**: 175-195 (2017).
2. Comission E, Communication from the commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions Horizon 2020 - The Framework Programme for Research and Innovation, in 52011DC0808, ed by Comission E (2011).
3. BP, BP Statistical Review of World Energy, ed by BP. BP (2017).
4. Bauer F, Coenen L, Hansen T, McCormick K and Palgan YV, Technological innovation systems for biorefineries: a review of the literature. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr* **11**: 534-548 (2017).
5. Demirbas A, Biorefineries: Current activities and future developments. *Energy Conversion and Management* **50**: 2782-2801 (2009).
6. Palmeros Parada M, Osseweijer P and Posada Duque JA, Sustainable biorefineries, an analysis of practices for incorporating sustainability in biorefinery design. *Industrial Crops and Products* **106**: 105-123 (2017).
7. Cherubini F, The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management* **51**: 1412-1421 (2010).
8. Kołtuniewicz Andrzej B and Dąbkowska K, Biorefineries – factories of the future, in Chemical and Process Engineering, pp. 109 (2016).

9. Koltuniewicz AB, Sustainable Process Engineering: Prospects and Opportunities. De Gruyter (2014).
10. Parajuli R, Dalgaard T, Jørgensen U, Adamsen APS, Knudsen MT, Birkved M, Gylling M and Schjørring JK, Biorefining in the prevailing energy and materials crisis: a review of sustainable pathways for biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **43**: 244-263 (2015).
11. Vyas P, Kumar A and Singh S, Biomass breakdown: A review on pretreatment, instrumentations and methods. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* **10**: 155-174 (2018).
12. Cai J, He Y, Yu X, Banks SW, Yang Y, Zhang X, Yu Y, Liu R and Bridgwater AV, Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **76**: 309-322 (2017).
13. Isikgor FH and Becer CR, Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry* **6**: 4497-4559 (2015).
14. Lee JE, Vadlani PV, Guragain YN, San KY and Min DH, Production of free fatty acids from switchgrass using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* **34**: 91-98 (2018).
15. Wang KT, Jing CY, Wood C, Nagardeolekar A, Kohan N, Dongre P, Amidon TE and Bujanovic BM, Toward Complete Utilization of Miscanthus in a Hot-Water Extraction-Based Biorefinery. *Energies* **11** (2018).
16. Evangelistella C, Valentini A, Ludovisi R, Firrincieli A, Fabbrini F, Scalabrin S, Cattonaro F, Morgante M, Mugnozza GS, Keurentjes JJB and Harfouche A, De novo assembly, functional annotation, and analysis of the giant reed (*Arundo donax* L.) leaf

- transcriptome provide tools for the development of a biofuel feedstock. *Biotechnology for Biofuels* **10** (2017).
17. Chi X, Li J, Wang X, Zhang Y and Antwi P, Hyper-production of butyric acid from delignified rice straw by a novel consolidated bioprocess. *Bioresource Technology* **254**: 115-120 (2018).
 18. Husson E, Auxenfans T, Herbaut M, Baralle M, Lambertyn V, Rakotoarivonina H, Remond C and Sarazin C, Sequential and simultaneous strategies for biorefining of wheat straw using room temperature ionic liquids, xylanases and cellulases. *Bioresource Technology* **251**: 280-287 (2018).
 19. Singh A, Bajar S and Bishnoi NR, Physico-chemical pretreatment and enzymatic hydrolysis of cotton stalk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* **244**: 71-77 (2017).
 20. D'Avino L, Dainelli R, Lazzeri L and Spugnoli P, The role of co-products in biorefinery sustainability: energy allocation versus substitution method in rapeseed and carinata biodiesel chains. *Journal of Cleaner Production* **94**: 108-115 (2015).
 21. Demirbas A, Biofuels from Agricultural Biomass. *Energy Sources Part a-Recovery Utilization and Environmental Effects* **31**: 1573-1582 (2009).
 22. Kandel R, Yang X, Song J and Wang J, Potentials, Challenges, and Genetic and Genomic Resources for Sugarcane Biomass Improvement. *Frontiers in Plant Science* **9** (2018).
 23. Fillat U, Martin-Sampedro R, Ibarra D, Macaya D, Martin JA and Eugenio ME, Potential of the new endophytic fungus *Hormonema* sp CECT-13092 for improving processes in lignocellulosic biorefineries: biofuel production and cellulosic pulp manufacture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **92**: 997-1005 (2017).

24. Dou C, Chandler DS, Resende FLP and Bura R, Fast Pyrolysis of Short Rotation Coppice Poplar: An Investigation in Thermochemical Conversion of a Realistic Feedstock for the Biorefinery. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering* **5**: 6746-6755 (2017).
25. Krzyzaniak M, Stolarski MJ, Szczukowski S and Tworkowski J, Life Cycle Assessment of New Willow Cultivars Grown as Feedstock for Integrated Biorefineries. *Bioenergy Research* **9**: 224-238 (2016).
26. Domingues RMA, Oliveira ELG, Freire CSR, Couto RM, Simoes PC, Neto CP, Silvestre AJD and Silva CM, Supercritical Fluid Extraction of Eucalyptus globulus Bark-A Promising Approach for Triterpenoid Production. *International Journal of Molecular Sciences* **13**: 7648-7662 (2012).
27. Cabrera MN, Arroside MF, Franzoni P and Cassella N, Integrated forest biorefineries: green liquor extraction in eucalyptus wood prior to kraft pulping. *Biomass Conversion and Biorefinery* **6**: 465-474 (2016).
28. Zhao SG, Li GD, Zheng N, Wang JQ and Yu ZT, Steam explosion enhances digestibility and fermentation of corn stover by facilitating ruminal microbial colonization. *Bioresource Technology* **253**: 244-251 (2018).
29. Zanchetta A, dos Santos ACF, Ximenes E, Nunes CDC, Boscolo M, Gomes E and Ladisch MR, Temperature dependent cellulase adsorption on lignin from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* **252**: 143-149 (2018).
30. de la Torre I, Ravelo M, Segarra S, Tortajada M, Santos VE and Ladero M, Study on the effects of several operational variables on

- the enzymatic batch saccharification of orange solid waste. *Bioresource Technology* **245**: 906-915 (2017).
31. Stoffel RB, Neves PV, Felissia FE, Ramos LP, Gassa LM and Area MC, Hemicellulose extraction from slash pine sawdust by steam explosion with sulfuric acid. *Biomass & Bioenergy* **107**: 93-101 (2017).
 32. Lesar B, Humar M, Hora G, Hachmeister P, Schmiedl D, Pindel E, Siika-Aho M and Liitia T, Utilization of recycled wood in biorefineries: preliminary results of steam explosion and ethanol/water organosolv pulping without a catalyst. *European Journal of Wood and Wood Products* **74**: 711-723 (2016).
 33. Santos JI, Fillat U, Martin-Sampedro R, Eugenio ME, Negro MJ, Sallesteros I, Rodriguez A and Ibarra D, Evaluation of lignins from side-streams generated in an olive tree pruning-based biorefinery: Bioethanol production and alkaline pulping. *International Journal of Biological Macromolecules* **105**: 238-251 (2017).
 34. Prasad S, Singh A and Joshi HC, Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources Conservation and Recycling* **50**: 1-39 (2007).
 35. Liu Q, Luo L and Zheng L, Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. *International journal of molecular sciences* **19** (2018).
 36. Cardona Alzate CA, Solarte Toro JC and Peña ÁG, Fermentation, thermochemical and catalytic processes in the transformation of biomass through efficient biorefineries. *Catalysis Today* **302**: 61-72 (2018).
 37. Chen HY, Liu JB, Chang X, Chen DM, Xue Y, Liu P, Lin HL and Han S, A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology* **160**: 196-206 (2017).

38. Yoo CG, Pu YQ and Ragauskas AJ, Ionic liquids: Promising green solvents for lignocellulosic biomass utilization. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **5**: 5-11 (2017).
39. Moset V, Xavier CDN, Feng L, Wahid R and Moller HB, Combined low thermal alkali addition and mechanical pretreatment to improve biogas yield from wheat straw. *Journal of Cleaner Production* **172**: 1391-1398 (2018).
40. Bundhoo ZMA, Microwave-assisted conversion of biomass and waste materials to biofuels. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* **82**: 1149-1177 (2018).
41. Capari D, Dorgo G and Dallos A, Comparison of the Effects of Thermal Pretreatment, Steam Explosion and Ultrasonic Disintegration on Digestibility of Corn Stover. *Journal of Sustainable Development of Energy Water and Environment Systems-Isdewes* **4**: 107-126 (2016).
42. Kapoor K, Garg N, Diwan RK, Varshney L and Tyagi AK, Study the effect of gamma radiation pretreatment of sugarcane bagasse on its physico-chemical morphological and structural properties. *Radiation Physics and Chemistry* **141**: 190-195 (2017).
43. Gomez N, Banks SW, Nowakowski DJ, Rosas JG, Cara J, Sanchez ME and Bridgwater AV, Effect of temperature on product performance of a high ash biomass during fast pyrolysis and its bio-oil storage evaluation. *Fuel Processing Technology* **172**: 97-105 (2018).
44. Dodo CM, Mamphweli S and Okoh O, Bioethanol production from lignocellulosic sugarcane leaves and tops. *Journal of Energy in Southern Africa* **28**: 1-11 (2017).
45. Sahoo D, Ummalyama SB, Okram AK, Pandey A, Sankar M and Sukumaran RK, Effect of dilute acid pretreatment of wild rice

- grass (*Zizania latifolia*) from Loktak Lake for enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology* **253**: 252-255 (2018).
46. Zhang H, Ning ZF, Khalid H, Zhang RH, Liu GQ and Chen C, Enhancement of methane production from Cotton Stalk using different pretreatment techniques. *Scientific Reports* **8** (2018).
47. Zhang KJ, Si MY, Liu D, Zhuo SN, Liu MR, Liu H, Yan X and Shi Y, A bionic system with Fenton reaction and bacteria as a model for bioprocessing lignocellulosic biomass. *Biotechnology for Biofuels* **11** (2018).
48. Vergara P, Wojtusik M, Revilla E, Ladero M, Garcia-Ochoa F and Villar JC, Wheat straw fractionation by ethanol-water mixture: Optimization of operating conditions and comparison with diluted sulfuric acid pre-treatment. *Bioresource Technology* **256**: 178-186 (2018).
49. Rigual V, Santos TM, Dominguez JC, Alonso MV, Oliet M and Rodriguez F, Combining autohydrolysis and ionic liquid microwave treatment to enhance enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus globulus* wood. *Bioresource Technology* **251**: 197-203 (2018).
50. Kamdem I, Hiligsmann S, Vanderghem C, Jacquet N, Tiappi FM, Richel A, Jacques P and Thonart P, Enhanced Biogas Production During Anaerobic Digestion of Steam-Pretreated Lignocellulosic Biomass from Williams Cavendish Banana Plants. *Waste and Biomass Valorization* **9**: 175-185 (2018).
51. Flores-Gomez CA, Silva EME, Zhong C, Dale BE, Sousa LD and Balan V, Conversion of lignocellulosic agave residues into liquid biofuels using an AFEX (TM)-based biorefinery. *Biotechnology for Biofuels* **11** (2018).

52. Tisma M, Planinic M, Bucic-Kojic A, Panjicko M, Zupancic GD and Zelic B, Corn silage fungal-based solid-state pretreatment for enhanced biogas production in anaerobic co-digestion with cow manure. *Bioresource Technology* **253**: 220-226 (2018).
53. Diaz AB, Blandino A and Caro I, Value added products from fermentation of sugars derived from agro-food residues. *Trends in Food Science & Technology* **71**: 52-64 (2018).
54. FitzPatrick M, Champagne P, Cunningham MF and Whitney RA, A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology* **101**: 8915-8922 (2010).
55. Gupta VK, Kubicek CP, Berrin J-G, Wilson DW, Couturier M, Berlin A, Filho EXF and Ezeji T, Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. *Trends in Biochemical Sciences* **41**: 633-645 (2016).
56. Hirasawa H, Shioya K, Furukawa T, Tani S, Sumitani J-i, Kawaguchi T, Morikawa Y, Shida Y and Ogasawara W, Engineering of the *Trichoderma reesei* xylanase3 promoter for efficient enzyme expression. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**: 2737-2752 (2018).
57. Li Y-H, Zhang X-Y, Zhang F, Peng L-C, Zhang D-B, Kondo A, Bai F-W and Zhao X-Q, Optimization of cellulolytic enzyme components through engineering *Trichoderma reesei* and on-site fermentation using the soluble inducer for cellulosic ethanol production from corn stover. *Biotechnology for Biofuels* **11**: 49 (2018).
58. Wang L, Zheng F, Zhang W, Zhong Y, Chen G, Meng X and Liu W, A copper-controlled RNA interference system for reversible silencing of target genes in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels* **11**: 33 (2018).

59. de Sousa KA, da Faheina Junior GS, de Azevedo DCS and Pinto GAS, Optimization of Cellulase Production by Trichoderma Strains Using Crude Glycerol as a Primary Carbon Source with a 24 Full Factorial Design. *Waste and Biomass Valorization* **9**: 357-367 (2018).
60. Borisova AS, Eneyskaya EV, Jana S, Badino SF, Kari J, Amore A, Karlsson M, Hansson H, Sandgren M, Himmel ME, Westh P, Payne CM, Kulminskaya AA and Ståhlberg J, Correlation of structure, function and protein dynamics in GH7 cellobiohydrolases from Trichoderma atroviride, T. reesei and T. harzianum. *Biotechnology for Biofuels* **11**: 5 (2018).
61. Dotsenko AS, Rozhkova AM, Gusakov AV and Sinitsyn AP, Improving the efficiency of the bioconversion of plant raw materials with mutant cellulases of Penicillium verruculosum. *Catalysis in Industry* **9**: 71-76 (2017).
62. Randhawa A, Ogunyewo OA, Eqbal D, Gupta M and Yazdani SS, Disruption of zinc finger DNA binding domain in catabolite repressor Mig1 increases growth rate, hyphal branching, and cellulase expression in hypercellulolytic fungus Penicillium funiculosum NCIM1228. *Biotechnology for Biofuels* **11**: 15 (2018).
63. Wang J, Gong Y, Zhao S and Liu G, A new regulator of cellulase and xylanase in the thermophilic fungus Myceliophthora thermophila strain ATCC 42464. *3 Biotech* **8**: 160 (2018).
64. Liu Q, Gao R, Li J, Lin L, Zhao J, Sun W and Tian C, Development of a genome-editing CRISPR/Cas9 system in thermophilic fungal Myceliophthora species and its application to hyper-cellulase production strain engineering. *Biotechnology for Biofuels* **10**: 1 (2017).

65. Várnai A, Mäkelä MR, Djajadi DT, Rahikainen J, Hatakka A and Viikari L, Chapter Four - Carbohydrate-Binding Modules of Fungal Cellulases: Occurrence in Nature, Function, and Relevance in Industrial Biomass Conversion, in *Advances in Applied Microbiology*, ed by Sariaslani S and Gadd GM. Academic Press, pp. 103-165 (2014).
66. Menezes DB, Brazil OAV, Romanholo-Ferreira LF, de Lourdes T. M. Polizeli M, Ruzene DS, Silva DP, Costa LP and Hernández-Macedo ML, Prospecting fungal ligninases using corncob lignocellulosic fractions. *Cellulose* **24**: 4355-4365 (2017).
67. Santos CA, Ferreira-Filho JA, O'Donovan A, Gupta VK, Tuohy MG and Souza AP, Production of a recombinant swollenin from *Trichoderma harzianum* in *Escherichia coli* and its potential synergistic role in biomass degradation. *Microbial cell factories* **16**: 83 (2017).
68. Santiago TR, Pereira VM, de Souza WR, Steindorff AS, Cunha B, Gaspar M, Favaro LCL, Formighieri EF, Kobayashi AK and Molinari HBC, Genome-wide identification, characterization and expression profile analysis of expansins gene family in sugarcane (*Saccharum spp.*). *Plos One* **13** (2018).
69. Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM and Henrissat B, The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research* **42**: D490-D495 (2014).
70. Sharma A, Tewari R, Rana SS, Soni R and Soni SK, Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **179**: 1346-1380 (2016).
71. Kleywegt GJ, Zou JY, Divne C, Davies GJ, Sinning I, Stahlberg J, Reinikainen T, Srisodsuk M, Teeri TT and Jones TA, The crystal

- structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes. *J Mol Biol* **272**: 383-397 (1997).
72. Liu Y-J, Liu S, Dong S, Li R, Feng Y and Cui Q, Determination of the native features of the exoglucanase Cel48S from *Clostridium thermocellum*. *Biotechnology for Biofuels* **11**: 6 (2018).
73. Mariano DCB, Leite C, Santos LHS, Marins LF, Machado KS, Werhli AV, Lima LHF and de Melo-Minardi RC, Characterization of glucose-tolerant beta-glucosidases used in biofuel production under the bioinformatics perspective: a systematic review. *Genetics and Molecular Research* **16** (2017).
74. Chuenchor W, Pengthaisong S, Robinson RC, Yuvaniyama J, Oonanant W, Bevan DR, Esen A, Chen C-J, Opassiri R, Svasti J and Cairns JRK, Structural Insights into Rice BGlu1 β -Glucosidase Oligosaccharide Hydrolysis and Transglycosylation. *Journal of Molecular Biology* **377**: 1200-1215 (2008).
75. Ezeilo UR, Zakaria II, Huyop F and Wahab RA, Enzymatic breakdown of lignocellulosic biomass: the role of glycosyl hydrolases and lytic polysaccharide monoxygenases. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **31**: 647-662 (2017).
76. Gilmore SP, Henske JK and O'Malley MA, Driving biomass breakdown through engineered cellulosomes. *Bioengineered* **6**: 204-208 (2015).
77. Jeraj N, Kunic B, Lenasi H and Breskvar K, Purification and molecular characterization of chitin deacetylase from *Rhizopus nigricans*. *Enzyme and Microbial Technology* **39**: 1294-1299 (2006).
78. Qin X, Su X, Luo H, Ma R, Yao B and Ma F, Deciphering lignocellulose deconstruction by the white rot fungus *Irpex lacteus*

- based on genomic and transcriptomic analyses. *Biotechnology for Biofuels* **11**: 58 (2018).
79. Bansal P, Hall M, Realff MJ, Lee JH and Bommarius AS, Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances* **27**: 833-848 (2009).
 80. Ketudat Cairns JR and Esen A, β -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**: 3389-3405 (2010).
 81. Rosales-Calderon O, Trajano HL and Duff SJB, Stability of commercial glucanase and β -glucosidase preparations under hydrolysis conditions. *PeerJ* **2**: e402 (2014).
 82. Yoo CG, Li M, Meng X, Pu Y and Ragauskas AJ, Effects of organosolv and ammonia pretreatments on lignin properties and its inhibition for enzymatic hydrolysis. *Green Chemistry* **19**: 2006-2016 (2017).
 83. Ran H, Zhang J, Gao Q, Lin Z and Bao J, Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. *Biotechnology for Biofuels* **7**: 51 (2014).
 84. Española DdlRA, Definición de sinergia (2018).
 85. Eriksson T, Karlsson J and Tjerneld F, A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7A) and endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **101**: 41-60 (2002).
 86. Viikari L, Alapuranen M, Puranen T, Vehmaanperä J and Siikaaho M, Thermostable Enzymes in Lignocellulose Hydrolysis, in *Biofuels*, ed by Olsson L. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 121-145 (2007).

87. Meng X and Ragauskas AJ, Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Current Opinion in Biotechnology* **27**: 150-158 (2014).
88. Gao D, Haarmeyer C, Balan V, Whitehead TA, Dale BE and Chundawat SP, Lignin triggers irreversible cellulase loss during pretreated lignocellulosic biomass saccharification. *Biotechnology for Biofuels* **7**: 175 (2014).
89. Hoeger IC, Nair SS, Ragauskas AJ, Deng Y, Rojas OJ and Zhu JY, Mechanical deconstruction of lignocellulose cell walls and their enzymatic saccharification. *Cellulose* **20**: 807-818 (2013).
90. Hu G, Heitmann JA, Zhong B, Lucia LA and Argyropoulos DS, Quantitative Study of the Interfacial Adsorption of Cellulase to Cellulose. *Journal of Physical Chemistry C* **119**: 14160-14166 (2015).
91. Toyosawa Y, Ikeo M, Taneda D and Okino S, Quantitative analysis of adsorption and desorption behavior of individual cellulase components during the hydrolysis of lignocellulosic biomass with the addition of lysozyme. *Bioresource Technology* **234**: 150-157 (2017).
92. Pihlajaniemi V, Sipponen MH, Kallioinen A, Nyysölä A and Laakso S, Rate-constraining changes in surface properties, porosity and hydrolysis kinetics of lignocellulose in the course of enzymatic saccharification. *Biotechnology for Biofuels* **9**: 18 (2016).
93. Dutta SK and Chakraborty S, Pore-scale dynamics of enzyme adsorption, swelling and reactive dissolution determine sugar yield in hemicellulose hydrolysis for biofuel production. *Scientific Reports* **6** (2016).
94. Du J, Cao Y, Liu G, Zhao J, Li X and Qu Y, Identifying and overcoming the effect of mass transfer limitation on decreased

- yield in enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high solid concentrations. *Bioresource Technology* **229**: 88-95 (2017).
95. Michaelis L, Menten ML, Johnson KA and Goody RS, The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* **50**: 8264-8269 (2011).
96. Schell DJ, Ruth MF and Tucker MP, Modeling the enzymatic hydrolysis of dilute-acid pretreated Douglas Fir. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **77**: 67-81 (1999).
97. Kadam KL, Rydholm EC and McMillan JD, Development and Validation of a Kinetic Model for Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. *Biotechnology Progress* **20**: 698-705 (2004).
98. Liao W, Liu Y, Wen Z, Frear C and Chen S, Kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of cellulose in differently pretreated fibers from dairy manure. *Biotechnology and Bioengineering* **101**: 441-451 (2008).
99. Zheng Y, Pan Z, Zhang R and Jenkins BM, Kinetic Modeling for Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Creeping Wild Ryegrass. *Biotechnology and Bioengineering* **102**: 1558-1569 (2009).
100. Wang Z and Feng H, Fractal kinetic analysis of the enzymatic saccharification of cellulose under different conditions. *Bioresource Technology* **101**: 7995-8000 (2010).
101. Gupta R, Kumar S, Gomes J and Kuhad RC, Kinetic study of batch and fed-batch enzymatic saccharification of pretreated substrate and subsequent fermentation to ethanol. *Biotechnology for Biofuels* **5**: 16 (2012).
102. Ruiz HA, Vicente AA and Teixeira JA, Kinetic modeling of enzymatic saccharification using wheat straw pretreated under autohydrolysis and organosolv process. *Industrial Crops and Products* **36**: 100-107 (2012).

103. Zhang Y, Xu J-L, Xu H-J, Yuan Z-H and Guo Y, Cellulase deactivation based kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw. *Bioresource Technology* **101**: 8261-8266 (2010).
104. Aguiar RS, Luciano Silveira MH, Pitarelo AP, Corazza ML and Ramos LP, Kinetics of enzyme-catalyzed hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* **147**: 416-423 (2013).
105. Neto JM, Garcia DdR, Gomez Rueda SM and da Costa AC, Study of kinetic parameters in a mechanistic model for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse subjected to different pretreatments. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **36**: 1579-1590 (2013).
106. Tian S-Q, Ma S, Wang X-W and Zhang Z-N, Fractal kinetic analysis of the enzymatic saccharification of CO₂ laser pretreated corn stover. *Carbohydrate Polymers* **98**: 618-623 (2013).
107. Kopelman R, Fractal Reaction-Kinetics. *Science* **241**: 1620-1626 (1988).
108. Robert ET, Operaciones de transferencia de masa. *Mc Graw-Hill México* (1980).
109. Sinha A and De P, Mass transfer: principles and operations. PHI Learning Pvt. Ltd. (2012).
110. Asano K, Mass transfer: from fundamentals to modern industrial applications. John Wiley & Sons (2007).
111. Tien-Cuong N, Anne-Archard D, Coma V, Cameleyre X, Lombard E, Binet C, Nouhen A, Kim Anh T and Fillaudeau L, In situ rheometry of concentrated cellulose fibre suspensions and relationships with enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology* **133**: 563-572 (2013).

112. Fockink DH, Urio MB, Chiarello LM, Sanchez JH and Ramos LP, Principles and Challenges Involved in the Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials at High Total Solids, in Green Fuels Technology: Biofuels, ed by Soccol CR, Brar SK, Faulds C and Ramos LP, pp. 147-173 (2016).
113. Modenbach AA and Nokes SE, Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review. *Biomass and Bioenergy* **56**: 526-544 (2013).
114. Nguyen TC, Anne-Archard D and Fillaudeau L, Rheology of Lignocellulose Suspensions and Impact of Hydrolysis: A Review, in Filaments in Bioprocesses, ed by Krull R and Bley T. Springer International Publishing, Cham, pp. 325-357 (2015).
115. Nguyen QA and Saddler JN, An integrated model for the technical and economic evaluation of an enzymatic biomass conversion process. *Bioresource Technology* **35**: 275-282 (1991).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Biomasa lignocelulósica y sustrato empleado

Para la realización de los trabajos que forman en esta Tesis Doctoral, se han utilizado varios tipos diferentes de biomásas lignocelulósicas, así como varios tipos de sustratos sintéticos que se detallan a continuación.

1.1. Paja de maíz pre-tratada

La paja de maíz pre-tratada (*pre-treated corn stover*, o PCS en inglés) se compone de todos los restos provenientes del cultivo de maíz, es decir, toda la planta recolectada exceptuando el grano. En este trabajo, se utilizaron dos tipos diferentes de paja de maíz pre-tratada: Una suministrada por la empresa Abengoa, pre-tratada en la instalación de Biocombustibles de Castilla y León, y una segunda procedente del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Alimentarias (INIA).

Ambos sólidos fueron sometidos a un pre-tratamiento fisicoquímico. El sólido suministrado por Abengoa fue pre-tratado por medio de explosión por vapor con ácido, si bien las condiciones en las que fue ejecutado este pre-tratamiento están protegidas bajo secreto industrial. Por otro lado, el sólido cedido por el INIA fue acondicionado utilizando un método de disolución con etanol y agua con recirculación (conocido como *organosolv*), usando 33 % en volumen de etanol con un 1 % en peso de ácido sulfúrico a 160 °C de temperatura durante 45 minutos, usando una relación en peso entre líquido y sólido de 20 a 1. La composición de ambos sólidos, determinada por medio de los análisis establecidos por el Laboratorio Nacional de Energías Renovables de Estados Unidos (*National Renewable Energy Laboratory*, o NREL)¹⁻⁶, resultado de la caracterización, se recoge en la Tabla 1.

Tabla 5. Análisis composicional de la biomasa lignocelulósica empleada

Componente	Paja de maíz pre-tratada		Paja de trigo pre-tratada
	INIA	Abengoa	
Glucanos	39.5	39.7	32.9
Xilanos	11.2	9.1	26.3
Arabinanos	0.8	0.7	3.6
Grupos acetilo	1.5	0.9	2.4
Lignina	25.6	23.8	13.1
Extractos	19.3	21.3	17.9

Toda la composición se da en porcentaje en peso sobre base seca

1.2. Paja de trigo pre-tratada

La paja de trigo (*wheat straw* en inglés), se compone de todos los restos provenientes de la cosecha del trigo, y que no son empleados para obtener productos relacionados con el propio grano de trigo. De naturaleza y composición similar a la paja de maíz, para la realización de la Tesis se empleó una paja de trigo proveniente de un cultivo de Salamanca, suministrada y pre-tratada en el INIA.

La paja de trigo fue pre-tratada empleando el mismo procedimiento que el descrito para la paja de maíz, mediante el empleo de una mezcla etanol-agua, pero empleando diferentes condiciones de operación: 190 °C de temperatura, 1 hora de operación con un 25 % en volumen de etanol y un 1 % en peso de ácido sulfúrico. La composición del sólido pre-tratado se muestra en la Tabla 1 y se obtuvo empleando la misma metodología que en los casos anteriores.

1.3. Sustratos sintéticos

De cara a la obtención de un conocimiento más profundo del sistema, en ocasiones ha sido necesario emplear productos de composición conocida

que permiten reducir de forma controlada el número de factores que influyen en la cinética del proceso.

Para la realización de esta Tesis se utilizó celobiosa comercial (Sigma-Aldrich, Alemania) para la descripción de la reacción llevada a cabo por las enzimas β -glucosidasas, así como un reactivo colorimétrico (para-nitrofenil- β -D-glucopiranosido, o pNPG) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), que se empleó durante la determinación de la actividad de estas mismas enzimas ya que, al ser degradado por la acción de las β -glucosidasas, genera un producto de color amarillo (para-nitrofenil), que puede ser analizado mediante espectrofotometría visible⁷, determinando así la evolución de su concentración con el tiempo.

2. Equipo experimental. Reactores y equipos de análisis

2.1. Reactores y equipos de reacción

Para los experimentos que se muestran en esta Tesis Doctoral, se han empleado varios tipos diferentes de sistemas de reacción, dependiendo de la escala de reacción (es decir, cantidad de sustrato) empleada. Los equipos utilizados para cada escala, así como los equipos auxiliares necesarios para la realización de estos experimentos se muestran en las Tablas 2 y 3.

2.2. Equipos de análisis

2.2.1. Análisis de reactantes en fase líquida

El análisis de la fase líquida se hizo con varios equipos. En primer lugar, se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance*

Liquid Chromatography, o HPLC), así como espectrofotometría ultravioleta-visible.

Tabla 6. Tipos de reactores empleados

Escala de reacción	Tipo de reactor	Volumen	Sistema de agitación	Parámetros controlables
Pequeña	Matraz <i>Erlenmeyer</i>	100/250 mL	Orbital	Temperatura, agitación
	Matraz fondo redondo	50 mL	Turbina palas planas	Temperatura, agitación
Media	Tanque agitado	1 L	Turbina <i>rushton</i>	Temperatura, agitación, pH

Tabla 3. Equipos auxiliares

Nombre	Descripción	Equipo asociado
Baño de agua con agitación lineal	Agitador lineal con baño de agua termostatzada que permite mantener temperatura y agitación	Matraces <i>Erlenmeyer</i>
Motor/Agitador	Sistema de turbina acoplado a un motor con velocidad regulable y con agitador de palas planas	Matraz fondo redondo
Manta calefactora	Permite mantener la temperatura constante del matraz de fondo redondo	Matraz fondo redondo
Estación de control de fermentadores	Equipo acoplado a los tanques agitados que permite el control de las variables del proceso y su registro	Tanque agitado
Motor de tanque agitado	Suministra energía al agitador incluido en el tanque agitado	Tanque agitado
Refrigerador	Sistema de refrigeración con agua desionizada para controlar la temperatura en el reactor tanque	Tanque agitado

En cuanto al cromatógrafo de alta resolución, se utilizó un equipo de la marca Agilent modelo 1100 series, compuesto de diferentes módulos.

- Degasificador. Encargado de eliminar posibles restos de aire en forma de burbuja que hayan sido incluidos en la corriente líquida de la fase móvil.
- Bomba cuaternaria. Encargada de establecer el flujo, el modelo empleado permite la utilización de cuatro canales diferentes combinados. Permite el empleo tanto de flujos isocráticos como la programación para utilizar distintos caudales a lo largo de la determinación de la muestra.
- Inyector automático. Sistema de inyección programable que permite la mezcla de diferentes muestras, así como el empleo de secuencias de muestras que son tratadas de forma automática.
- Horno de columna. Compartimento termostatzado, fija y mantiene una temperatura determinada para las columnas de cromatografía.
- Columnas de cromatografía. Conducciones cilíndricas empaquetadas con un relleno específico que permite la separación a través de diferentes mecanismos de los componentes de una muestra. Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron tres columnas diferentes, todas ellas de la marca comercial Phenomenex: Columna de relleno polimérico con protones (Rezex RHM Monosaccharide), plomo (Rezex RPM Monosaccharide) y plata (Rezex RSO Oligosaccharide) como catión de intercambio. Las condiciones en las que fueron empleadas, así como el método y su empleo se recogen en la metodología de cada artículo publicado.
- Detectores. Se emplearon dos tipos diferentes de detectores: Medidor del índice de refracción (*Refractive Index Detector*, o RID) y detector de diodos ordenados (*Diode Array Detector*, o DAD). Las condiciones

experimentales empleados en cada caso se especifican en cada artículo.

En cuanto al espectrofotómetro empleado, se trata del modelo V-730 UV-Visible de la empresa Jasco, empleando para las medidas cubetas de cuarzo con sistema de termostatación y empleando agitadores magnéticos para mantener la homogeneidad de la medida. Los resultados de la absorbancia fueron registrados de forma automática en un ordenador asociado al espectrofotómetro, usando las condiciones indicadas en cada artículo.

2.2.2. Análisis de sólido remanente

De forma análoga a la mostrada en la descripción de los sustratos lignocelulósicos, la composición y las características fundamentales de la fracción sólida de las muestras tomadas a lo largo de los experimentos fue determinada empleando la metodología propuesta por el NREL ¹⁻⁶.

La humedad, por su parte, se calculó empleando una balanza gravimétrica con capacidad de determinar humedad modelo KERN-Sohn MLS-D 503C, equipada con un horno infrarrojos que permite realizar un secado controlado de la muestra sólida analizada a través de diferentes programas de deshidratación.

3. Determinación de la actividad enzimática

Para la obtención de la actividad enzimática de la enzima β -glucosidasa se utilizó el método estándar de reacción con un patrón colorimétrico. Para el trabajo recogido en este documento, se utilizó como sustrato patrón el p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (*p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside*, o pNPG). Este sustrato, al ser digerido por la enzima, libera p-nitrofenil cuyo color es amarillo, permitiendo ser evaluada la

concentración del mismo a través de la medida directa por espectrofotometría del espectro visible. De esta manera, la actividad de la enzima se expresó en términos de la concentración de p-nitrofenil liberada respecto al tiempo de reacción. La descripción pormenorizada del protocolo experimental se recoge en los artículos incluidos en el anexo, así como en trabajos previamente publicados ⁸.

Por otro lado, se determinó el contenido en proteína del cóctel enzimático. Para ello, se empleó el método descrito por Bradford ⁹, que permite obtener la concentración de proteína a través de una reacción colorimétrica que tiñe la muestra líquida de forma más o menos intensa en función de la cantidad de proteínas presentes. De esta manera, combinando ambos ensayos, es posible obtener la actividad específica por peso de proteína para la enzima estudiada.

4. Observación de la estructura microscópica y determinación elemental mediante microscopio electrónico de barrido

Para la observación de la estructura a nivel microscópico de los residuos lignocelulósicos, se empleó un microscopio electrónico de barrido (*Scanning Electron Microscope*, o SEM) perteneciente al Centro Nacional de Microscopía Electrónica. El modelo de microscopio utilizado fue el JEOL JSM 6335F, cuyas características principales son las siguientes¹⁰:

- Dispone de un cañón de electrones de cátodo frío de emisión de campo.
- El detector de electrones secundarios permite emplear resoluciones de 1.5 a 5.0 nm, y ampliaciones de 10 X a 500000 X, mientras que el detector de electrones retrodispersados permite una resolución de 2 nm.

- Dispone de un medidor de energía dispersada por espectroscopía de rayos X (*Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy*, o EDS), que permite obtener la composición elemental de la muestra observada. El modelo utilizado pertenece a la marca Oxford Instruments, y es el X-Max de 80 mm² con una resolución de 127 eV a 5.9 KeV.

La preparación de las muestras para el análisis microscópico se realizó eliminando el agua de cada una de ellas. Para cumplir con ese objetivo, las muestras sólidas, centrifugadas y separadas del líquido, se pusieron en contacto sucesivo con disoluciones de acetona en agua con proporciones crecientes de acetona (10, 20, 30, 40, 60, 80, 90 y 100 %). Tras estar en contacto con la disolución durante diez minutos para cada mezcla de acetona y agua, el sólido se volvió a centrifugar y a suspender en la siguiente proporción mayor de acetona.

Una vez totalmente seco el material, la muestra fue recubierta con una pátina de oro para favorecer el flujo electrónico a través de la muestra.

5. Programas informáticos empleados para el cálculo de parámetros y los ajustes cinéticos

Para la realización de los diferentes cálculos de las variables del proceso, así como para el ajuste de los datos experimentales a los diferentes modelos cinéticos, se emplearon diferentes programas informáticos, que se describirán brevemente a continuación.

Para el cálculo de ajustes sencillos de una sola variable independiente, se usó el programa OriginLab 8. Este programa permite, a partir del almacenamiento de los datos experimentales obtenidos, el tratamiento matemático sencillo de los mismos, así como ajustes multi-paramétricos unidimensionales.

Para la determinación de los modelos cinéticos más complejos, se utilizó el Aspen Custom Modeler. Este programa permite resolver ecuaciones diferenciales multivariable, lo que permite obtener los parámetros necesarios para la determinación de las ecuaciones cinéticas necesarias para cada tipo de modelo cinético. Además, Aspen Custom Modeler permite simular a su vez los resultados obtenidos para un conjunto de parámetros cinéticos, permitiendo determinar la idoneidad de estos mismos parámetros, así como obtener su consistencia estadística.

La información detallada sobre los diferentes parámetros calculados por los programas informáticos descritos se recoge en cada uno de los artículos que componen esta tesis.

6. Bibliografía

1. Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter A, Sluiter J and Templeton D, Preparation of samples for compositional analysis. *Laboratory Analytical Procedure (LAP) National Renewable Energy Laboratory* (2008).
2. Sluiter A, Determination of Insoluble Solids in Pretreated Biomass Material: Laboratory Analytical Procedure (LAP): Issue Date, 03/21/2008. *National Renewable Energy Laboratory* (2008).
3. Sluiter A, Hames B, Hyman D, Payne C, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D and Wolfe J, Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. *National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, NREL Technical Report No NREL/TP-510-42621* (2008).
4. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J and Templeton D, Determination of sugars, byproducts, and degradation products in

- liquid fraction process samples. *National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO* (2006).
5. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D and Crocker D, Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. vol. Version 2010. *National Renewable Energy Laboratory, USA* (2008).
 6. Sluiter A, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J and Templeton D, Determination of extractives in biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)* **1617** (2005).
 7. Saha BC and Bothast RJ, Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. *Applied and environmental microbiology* **62**: 3165-3170 (1996).
 8. Christakopoulos P, Goodenough PW, Kekos D, Macris BJ, Claeysens M and Bhat MK, Purification and Characterisation of an Extracellular β -Glucosidase with Transglycosylation and Exo-glucosidase Activities from *Fusarium oxysporum*. *The FEBS Journal* **224**: 379-385 (1994).
 9. Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254 (1976).
 10. Electrónica ICNdM, Microscopio JEOL JSM 6335F: Características, ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica (2018).

**JUSTIFICACIÓN DE LA
UNIDAD TEMÁTICA DEL
TRABAJO**

1. Resumen de resultados y trabajos realizados

En esta sección del presente trabajo se describen brevemente los resultados más relevantes obtenidos a lo largo del desarrollo de la Tesis Doctoral. Estos resultados, a su vez, se encuentran recogidos en las diversas publicaciones que se han realizado a partir de los resultados experimentales, y que se encuentran en el Anexo del presente documento.

Si bien cada uno de los trabajos que componen esta Tesis Doctoral posee una entidad propia, es posible agruparlos en dos secciones diferentes.

- Trabajos realizados sobre sólido empleado en la industria, cuyos resultados se recogen en las publicaciones 1 a 3.
- Trabajos cuyo objetivo es la descripción del sistema de múltiples reacciones de la hidrólisis enzimática a partir de un modelo segregado en dos partes; los resultados más relevantes son recogidos en las publicaciones 4 a 6.

En cada una de estas publicaciones se da cuenta de forma detallada de la metodología, de los resultados obtenidos, así como de las conclusiones derivadas de los mismos. A continuación, se muestra una relación de todos los artículos incluidos en esta Tesis.

2. Relación de publicaciones

Publicación 1: Influencia de la agitación en la velocidad del proceso

Autores: Mateusz Wojtusik, Mauricio Zurita, Juan Carlos Villar, Miguel Ladero, Félix García-Ochoa.

Título: Influence of fluid dynamic conditions on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Effect of mass transfer rate.

Revista: Bioresource Technology (2016), 216: 28-35.

Publicación 2: Inhibición de actividad enzimática

Autores: Mateusz Wojtusik, Mauricio Zurita, Juan Carlos Villar, Miguel Ladero, Félix García-Ochoa.

Título: Study of the enzymatic activity inhibition on the saccharification of acid pretreated corn stover.

Revista: Biomass and Bioenergy (2017), 98: 1-7.

Publicación 3: Modelo cinético fractal de la hidrólisis de celulosa

Autores: Mateusz Wojtusik, Mauricio Zurita, Juan Carlos Villar, Miguel Ladero, Félix García-Ochoa.

Título: Enzymatic saccharification of acid pretreated corn stover. Empirical and fractal kinetic modelling.

Revista: Bioresource Technology (2016), 220: 110-116.

Publicación 4: Modelo cinético de la hidrólisis de celobiosa

Autores: Mateusz Wojtusik, Clara Yepes, Juan Carlos Villar, Arno Cordes, Miguel Arroyo, Félix García-Ochoa, Miguel Ladero.

Título: Kinetic modelling of cellobiose by β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*.

Revista: Chemical Engineering Research and Design (2018)

Publicación 5: Desactivación de las enzimas glucosidasas

Autores: Mateusz Wojtusik, Priscilla Vergara, Juan Carlos Villar, Félix García-Ochoa, Miguel Ladero.

Título: Study of thermal and operational deactivation of *Aspergillus fumigatus* β -glucosidase in ethanol/water pre-treated wheat straw saccharification.

Revista: Chemical Engineering Research and Design (2018)

Publicación 6: Modelo cinético fisico-químico de la hidrólisis de celulosa

Autores: Mateusz Wojtusik, Juan Carlos Villar, Miguel Ladero, Félix García-Ochoa.

Título: Physico-chemical kinetic modelling of hydrolysis of a steam-explosion pre-treated corn stover: A two-step approach.

Revista: Bioresource Technology (2018).

3. Justificación de la unidad temática del trabajo

Tal y como se indicó en el apartado de objeto y alcance del trabajo, los resultados obtenidos se pueden dividir en dos secciones diferentes. Por un lado, en la primera parte de la Tesis se completó el estudio de la descripción de la hidrólisis enzimática de paja de maíz pre-tratada, producida en condiciones reales en una instalación industrial (Abengoa, Biocombustibles de Castilla y León, Salamanca). Como resultado de este estudio, se obtuvo un modelo cinético empírico capaz de relacionar la energía suministrada al sistema en forma de agitación con la evolución del producto principal, la glucosa.

3.1. Hidrólisis enzimática de paja de maíz pre-tratada de origen industrial

Publicación 1: Influencia de la agitación en la velocidad del proceso

La descripción fenomenológica es una herramienta importante desde el punto de vista de la obtención de las mejores condiciones operativas posibles que permitan la mejor producción posible asociada al proceso

estudiado. Dentro de todos los fenómenos que pueden influenciar este tipo de procesos, en los que existe una reacción heterogénea (sustrato sólido, con el catalizador disuelto en la fase acuosa líquida que rodea el sustrato), la transferencia de materia es clave para conseguir unos valores de producción óptimos.

Si bien existen otras maneras de influenciar la velocidad de transferencia de materia, el parámetro operacional que más influye en este tipo de sistemas de reacción, un tanque agitado, es la velocidad de agitación. Por lo tanto, en un primer término, se realizaron varios experimentos de hidrólisis enzimática de paja de maíz pre-tratada en reactores tipo tanque agitado, cambiando la velocidad de agitación entre 50 y 500 rpm. Todos los experimentos se llevaron a cabo manteniendo el resto de parámetros constantes, es decir, la temperatura de operación se mantuvo a 50 °C, con una proporción de sólido del 20 %, fijando el pH inicial en un valor de 5.9. Asimismo, se empleó la misma dosis de cóctel enzimático (Zylase, Abengoa) de $15.5 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{glucano}}^{-1}$.

De esta manera, se pudo estudiar el efecto de la agitación sobre la glucosa liberada durante la hidrólisis enzimática. De los resultados obtenidos, se pudo comprobar que existen tres zonas diferenciadas. Para agitaciones elevadas, por encima de 200 rpm, los resultados no se ven influenciados por la variación de la velocidad de agitación. Es decir, que el aumento de la velocidad de transferencia de materia asociada al aumento de la velocidad de agitación no repercute en un aumento de la velocidad global del proceso; por lo tanto, la transferencia de materia no es la etapa limitante en ese caso. Para agitaciones bajas, de 50 a 100 rpm, se produce el efecto contrario, ya que se observó una bajada sustancial tanto en la velocidad de liberación de glucosa así como en la cantidad final de glucosa obtenida. Al contrario que para el caso de agitaciones elevadas,

Justificación de la unidad temática del trabajo

esta tendencia indica que la transferencia de materia controla la velocidad global del proceso de liberación de glucosa. Por último, entre ambas zonas, hay unas condiciones de agitación para las que el comportamiento del sistema es intermedio.

A partir de los datos obtenidos en los experimentos previamente descritos, se pasó a estimar la velocidad de transferencia de materia máxima, con el objetivo de sustentar los resultados obtenidos. Para ello, se calcularon en primer lugar los parámetros reológicos del sistema estudiado, para poder determinar la reología del mismo a través del número adimensional de Reynolds. Teniendo en cuenta las características físicas de la enzima, así como del sistema de reacción (sustrato y reactor), se evaluó a partir de la información reológica el valor del coeficiente de transferencia de materia en el sólido. Teniendo en cuenta que la transferencia de materia en este sistema se produce cuando la enzima difunde en el interior del sustrato, y que la máxima velocidad ocurre cuando la concentración de enzima en el líquido es máxima, es posible estimar un valor de velocidad de transferencia máximo para cada tiempo experimental. Este valor es posible compararlo con la velocidad de reacción global, con el objetivo de comprobar si la velocidad de transferencia de materia es lo suficientemente baja, incluso al evaluar la velocidad máxima, como para controlar la velocidad global del proceso. Los resultados obtenidos muestran que las tendencias corresponden con las descritas al evaluar los resultados obtenidos en primera instancia.

Por último, para ahondar en la importancia de la transferencia de materia sobre la velocidad de hidrólisis enzimática a velocidades de agitación baja (50 rpm), se realizaron tres experimentos adicionales comparativos. En los dos primeros, las condiciones de operación se variaron a un tiempo medio del experimento. En el primero, la agitación se subió hasta

un valor lo suficientemente alto para asegurar que la influencia de la transferencia de materia es máxima (400 rpm). En el segundo, se dobló la dosis de enzima volviendo a añadir el equivalente a la dosis inicial. Por último, en el tercero se empleó una dosis doble de enzima desde el momento inicial de la reacción. De los resultados que se obtuvieron de estos experimentos se puede deducir que la variación de la concentración de enzima empleada apenas modifica dichos resultados, mientras que el aumento de la velocidad de transferencia llevaba aparejado un aumento de producción de glucosa, haciendo que la cantidad final obtenida fuera comparable a los valores que se produjeron en los experimentos realizados con la velocidad de transferencia de materia máxima desde un inicio. De esta manera, queda acreditado el efecto importante de la transferencia de materia sobre la velocidad de producción de glucosa en la hidrólisis enzimática del residuo estudiado.

Publicación 2: Inhibición de actividad enzimática

Si bien la transferencia de materia tiene un papel importante, debido al proceso de pre-tratamiento al que fue sometido el sólido lignocelulósico (explosión por vapor con ácido sulfúrico) se producen compuestos que tienen un efecto potencialmente inhibitorio sobre la reacción enzimática. Por lo tanto, de cara a conocer con mayor profundidad el comportamiento del sistema, es interesante describir el efecto de estas sustancias sobre la reacción enzimática.

Por lo tanto, se planteó realizar experimentos añadiendo determinada cantidad de los compuestos detectados durante el análisis de los experimentos recogidos en la publicación 1, de manera que fuera posible estudiar el efecto que la presencia de estos compuestos tenía sobre la producción de glucosa obtenida tanto a lo largo del experimento como al final. Asimismo, se utilizaron las condiciones experimentales descritas en

Justificación de la unidad temática del trabajo

la publicación 1, empleando una velocidad de agitación en la que no existe un efecto controlante de la velocidad de transferencia de materia.

Se probaron como posibles inhibidores los siguientes:

- glucosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, que corresponden a los azúcares producidos en mayor proporción durante la hidrólisis enzimática,
- furfural y 5-hidroximetilfurfural, conocidos inhibidores tanto de las enzimas como de los microorganismos posteriormente empleados para obtener diferentes productos a partir de los azúcares,
- ácido acético proveniente de los grupos acetilo,
- y lignina, que posee la capacidad de desactivar la acción de las enzimas por medio del atrapamiento de las mismas.

A partir de los resultados obtenidos de los diferentes experimentos llevados a cabo para la realización de este estudio, se puede deducir que la mayor parte de los compuestos probados, en las concentraciones en las que se realizaron las pruebas, no poseen un efecto inhibitorio directo. Sin embargo, es cierto que en varias circunstancias se observaron ciertos efectos negativos sobre la reacción enzimática.

Se observó que para altas concentraciones de glucosa (superior a $70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa inicial), la concentración final de producto obtenido, así como la velocidad a la que se produce la glucosa, se ven sensiblemente afectados. Asimismo, la lignina ejerce un efecto claramente inhibitorio, incluso en las cantidades más pequeñas empleadas. Este hecho, además, ha sido contrastado repetidamente en los trabajos relacionados aparecidos en la literatura disponible al efecto.

Publicación 3: Modelo cinético fractal de la hidrólisis de celulosa

Por lo tanto, aunando la información obtenida tanto en la publicación 1 como en la publicación 2, se planteó la formulación de un modelo

cinético simplificado, considerando como esquema de reacción la conversión directa de celulosa en glucosa, para la descripción de la hidrólisis enzimática de paja de maíz pre-tratada. Para ello, además, se propuso emplear la aproximación fractal.

En este tipo de modelos cinéticos, se produce una evolución en la velocidad de reacción causada por la variabilidad de la superficie susceptible a la reacción en un sistema de reacción heterogéneo. Es decir, debido a impedimentos espaciales, la reacción no se puede producir en todas las direcciones libres del espacio, no pudiéndose cumplir de hecho la ley de acción de masas. Por lo tanto, en las ecuaciones cinéticas de este tipo de modelos se recoge este hecho añadiendo términos en las constantes cinéticas que reflejan la caída de la velocidad de reacción a lo largo del tiempo. Estos términos, a su vez, incluyen parámetros empíricos conocidos como dimensiones fractales que permiten conocer cuán ajustado está el sistema a la ley de acción de masas.

Para el caso estudiado en esta Tesis Doctoral, se decidió emplear una ecuación cinética empírica sencilla, similar a la utilizada por otros autores anteriormente. De esta manera, se propuso una ecuación tipo potencial de orden uno, en la que la constante cinética adoptaba el valor esperable para un sistema no fractal en el primer choque efectivo, y posteriormente disminuiría potencialmente con el tiempo, en función de la dimensión fractal h . El valor del parámetro h , por lo tanto, puede considerarse como el nivel de interferencia de la superficie del sólido sobre la velocidad de reacción efectiva. Por lo tanto, a mayor valor de h , mayor ralentización de la velocidad de reacción causada por la estructura del sólido.

Una vez establecido el tipo de modelo cinético a emplear, se decidió ajustar el modelo previamente descrito a los resultados experimentales descritos en la publicación 1. Asimismo, de forma comparativa, se

decidió ajustar los datos experimentales a diferentes modelos cinéticos potenciales de orden n , siendo este orden variable en función del experimento tratado.

Empezando por los resultados obtenidos al ajustar estos experimentos a las ecuaciones cinéticas correspondientes al modelo cinético potencial de orden n , se descubrió que, para velocidades de agitación bajas, el valor de orden de reacción se disparaba, llegando a alcanzar un valor de 13 para la menor agitación. Este tipo de evolución concuerda con la presencia de fenómenos de impedimento de la transferencia de materia durante la reacción química, o mejor de acceso de los sustratos a las enzimas. Para valores de agitación elevados, el orden de reacción tendió a alcanzar el número 2, evidenciando a su vez que para valores de agitación mayores a 250 rpm no se apreciaron variaciones notables en los parámetros cinéticos, tal y como se observó en los resultados obtenidos en la publicación 1.

En cuanto al ajuste al modelo fractal, cabe destacar que la evolución de los datos experimentales predicha por este modelo superó en precisión, tanto para velocidades altas como bajas de agitación, a la obtenida con los modelos cinéticos empíricos potenciales anteriormente utilizados, siguiendo el criterio de información de Akaike. En cuanto a la evolución del parámetro h , se observó una disminución drástica del mismo al aumentar la velocidad de agitación empleada, pasando de un valor mayor a 0.6 a un valor asintótico en torno a 0.2 para velocidades de agitación superiores a 200 rpm. Es decir, tal y como se dedujo de los resultados analizados en la publicación 1, la influencia de la transferencia de materia es máxima para valores de agitación entre 50 y 100 rpm, mientras que para valores superiores a en torno a 200 rpm, la velocidad

de reacción global pasa a estar controlada por la propia velocidad de reacción de la hidrólisis enzimática.

Finalmente, es preciso señalar que el empleo de la aproximación fractal para la descripción de este tipo de sistemas resultó ser una herramienta sencilla y potente que permitió evaluar de una forma precisa el comportamiento del proceso de hidrólisis enzimática de paja de maíz pre-tratada.

3.2. Descripción de la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos en dos etapas diferentes: Hacia un modelo cinético más complejo

Publicación 4: Modelo cinético de la hidrólisis de celobiosa

Aunque se trata de un proceso extremadamente complejo, debido a la multitud de diferentes tipos de enzimas y de reacciones que transcurren tanto en serie como en paralelo, es posible describir el proceso de la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos en un conjunto de dos etapas que ocurren en serie. En primer lugar, se produce la despolimerización de la matriz celulósica, proceso en el que se liberan oligosacáridos como producto principal, siendo el oligosacárido final producido la celobiosa. Esta celobiosa, subsecuentemente sufre una posterior transformación en glucosa.

Debido a que la transformación de celobiosa en glucosa se produce por medio de las enzimas β -glucosidasas, y a que esta reacción transcurre en fase homogénea ya que la celobiosa es soluble en el medio de reacción, en los trabajos recogidos en la publicación 4 se propuso la determinación de un modelo cinético capaz de describir la evolución de la hidrólisis enzimática de celobiosa, empleando para ello un cóctel enzimático

mayoritariamente compuesto por β -glucosidasas, obtenidas del hongo *Aspergillus fumigatus*, suministrada por ASA Specialenzyme GmbH. Con el objetivo de describir este proceso sin la interferencia de otros factores presentes durante la degradación completa de la biomasa lignocelulósica, se propusieron una serie de experimentos a pequeña escala empleando celobiosa pura como sustrato.

En primer lugar, previamente a la realización estos experimentos, se determinaron las características fundamentales del cóctel enzimático empleado. Para ello, se determinó la masa molecular media del mismo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (*Sodium Dodecyl Sulphate – PolyacrylAmide Gel Electrophoresis*, o SDS-PAGE), observándose dos bandas de masa molecular en torno a 70 y 109 kDa, similar al valor de masa molecular obtenida en literatura para otras enzimas similares. A continuación, se determinó la concentración de proteína presente en el cóctel mediante el análisis Bradford, alcanzando un valor de $63.3 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{ml}^{-1}$, que junto a la actividad enzimática obtenida aplicando el ensayo estándar con p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (*p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside*, o pNPG), cuyo valor ascendió a $1326 \text{ IU} \cdot \text{ml}^{-1}$, la actividad específica combinada es de $20.9 \text{ IU} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}}^{-1}$.

Una vez caracterizada la enzima, se plantearon una serie de experimentos con el objetivo de desarrollar un modelo cinético capaz de describir la hidrólisis de celobiosa. Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando matraces *Erlenmeyer*, con un volumen de trabajo de 20 mL, usando tampón acetato a pH de 4.9, con una concentración de citrato de 50 mM. Asimismo, se utilizaron diferentes concentraciones iniciales de enzima, sustrato y distintas temperaturas, con el objetivo de conseguir datos experimentales lo suficientemente amplios como para proponer un

modelo cinético robusto. Todos los experimentos, excepto en aquellos en los que se evaluó el efecto de la temperatura, se realizaron a 50 °C. Para mantener la temperatura constante, se utilizó un baño de agua termostatzado, con agitación lineal.

En primer lugar, aplicando la información obtenida de los experimentos realizados a diferente concentración de enzima y sustrato, se aplicó el método diferencial para determinar, de forma inicial, tanto la forma de la ecuación cinética del modelo cinético, como para evaluar la influencia de la concentración de enzima en esta reacción. De los resultados obtenidos se dedujo que la concentración de enzima influye de forma lineal sobre la velocidad de reacción enzimática. Más aún, se obtuvo un comportamiento de la velocidad inicial de hidrólisis enzimática coherente con una inhibición de tipo acompetitiva con respecto a la presencia de sustrato. También se evaluó el efecto de la concentración de producto, obteniéndose una clara relación entre la presencia de la glucosa y la disminución de las velocidades de reacción iniciales observadas.

Teniendo en cuenta ambos factores, se aplicó el método integral para terminar de definir el modelo cinético más adecuado para describir la hidrólisis de celobiosa, utilizando además datos experimentales obtenidos a diferentes temperaturas. Posteriormente, se probaron varios modelos cinéticos teniendo en cuenta tanto los resultados obtenidos en el desarrollo del método diferencial como la información presente en la bibliografía. Además, se supuso que el valor de los diferentes parámetros cinéticos que describen los diferentes fenómenos de inhibición presentes durante la hidrólisis enzimática se mantienen constantes a las diferentes temperaturas ensayadas. Finalmente, para discriminar entre los distintos modelos cinéticos, se emplearon criterios estadísticos así como termodinámicos.

De esta manera, de las diferentes ecuaciones cinéticas planteadas se escogió aquella que asume tanto inhibición acompetitiva por sustrato como competitiva por producto, con la particularidad de que esta inhibición por producto se produce con la entrada de hasta dos moléculas de glucosa en el interior del centro activo. Este resultado es coherente con la descripción estructural de las enzimas β -glucosidasas, cuyo centro activo tiene el tamaño suficiente como para alojar hasta 5 moléculas de glucosa en su interior.

Por último, es necesario señalar que el modelo cinético formulado no sólo es el mejor de los probados desde el punto de la estadística, sino que todos sus parámetros poseen un valor y un intervalo de confianza correctos desde el punto de vista termodinámico y estadístico. Asimismo, el modelo es muy robusto, capaz de describir la evolución de los reactivos para diversas concentraciones de sustrato (de 2.5 a 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de celobiosa inicial) y de temperatura (de 40 a 50 $^{\circ}\text{C}$).

Publicación 5: Desactivación de las enzimas glucosidasas

Una vez obtenido un modelo cinético adecuado para la descripción de la hidrólisis de celobiosa por medio de la acción de las enzimas β -glucosidasas, se planteó evaluar la posible influencia tanto de la temperatura como de la presencia de sólido real sobre esta etapa de la degradación de la biomasa lignocelulósica.

Para ello, se realizaron experimentos con las condiciones óptimas de concentración de sustrato (10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de celobiosa), así como de concentración de enzima (0.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ del cóctel enzimático empleado para la anterior publicación) empleados para la realización del modelo cinético previamente descrito.

Una vez obtenidos estos resultados experimentales, se propuso un modelo de desactivación enzimática. Para ello, se calculó la evolución de la actividad enzimática residual con el tiempo de reacción. Asimismo, para observar la estabilidad de la enzima, para cada punto de actividad evaluado, se realizó un ensayo de actividad añadiendo una alícuota del sistema estudiado a un sistema con celobiosa fresca. De esta manera, si la enzima es capaz de conservar la actividad, es esperable obtener no sólo una velocidad inicial de hidrólisis alta sino que este comportamiento se mantenga en el tiempo.

A partir de los resultados obtenidos, se formuló un modelo de desactivación parcial, en el que la enzima tiende a una actividad residual relativa marcada por el parámetro β . A su vez, la velocidad de desactivación corresponde a un modelo de primer orden marcado por la constante cinética k_D . Este modelo cinético de desactivación fue capaz de predecir la evolución de la actividad relativa para la enzima estudiada.

Por otro lado, se evaluó el efecto que tenía la presencia de paja de maíz pre-tratada sobre la enzima estudiada. Para ello, se realizó un experimento de hidrólisis enzimática de la mencionada paja de trigo añadiendo, además de la enzima β -glucosidasa, el cóctel enzimático completo necesario para la hidrólisis enzimática, que consiste en la adición de una cóctel comercial (Celluclast 1.5L, fabricada por la compañía Novozymes). De estos experimentos se dedujo, que si bien la enzima perdía una parte apreciable de actividad, seguía teniendo una actividad estable a lo largo de todo el tiempo de reacción estudiado.

Finalmente, aplicando la información obtenida de la evolución de la actividad enzimática con el tiempo para diferentes temperaturas, se amplió el modelo cinético de la publicación 4 para que fuera extrapolable a las temperaturas estudiadas en este trabajo. Como resultado, se ha

obtenido un modelo cinético más robusto aún, capaz de describir la influencia de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática de la celobiosa, tanto para temperaturas de trabajo normales como para temperaturas más elevadas.

Publicación 6: Modelo cinético físico-químico de la hidrólisis de celulosa

Una vez descrito el comportamiento de la segunda parte de la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos, se propuso el desarrollo de un modelo cinético capaz de explicar de una manera basada en los fenómenos que parecen tener lugar que fuera capaz de describir de una forma fehaciente la evolución de los compuestos a lo largo de la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos.

En este caso, se empleó paja de maíz pre-tratada empleando etanol como disolvente, con ácido sulfúrico como catalizador de la descomposición de la estructura interna. El sólido pre-tratado fue suministrado por el Instituto Nacional de Investigación y tecnología Agraria y alimentaria (INIA). Para el desarrollo del modelo cinético, los experimentos se llevaron a cabo en un sistema de pequeña escala, utilizando un matraz de fondo redondo con un agitador de palas como sistema de reacción, teniendo un volumen máximo de 50 mL. Asimismo, y con objeto de potenciar la información obtenida de la primera parte del proceso (despolimerización), se utilizó un cóctel enzimático (Celluclast 1.5L, de Novozymes) cuyo contenido en enzimas β -glucosidasas es muy bajo (cerca del 1 % en peso). Todos los experimentos se llevaron a cabo con la misma proporción de sólido y líquido, siendo la paja de maíz pre-tratada un 10 % en peso del total del sistema de reacción. Para tratar de desarrollar un modelo cinético robusto, se utilizaron datos experimentales obtenidos con cuatro concentraciones diferentes de enzima.

Como información adicional, además, se utilizó una técnica de seguimiento microscópico para la determinación de la evolución morfológica del sólido durante la hidrólisis enzimática. Para esto, se utilizó un microscopio electrónico de barrido con capacidad de realizar un análisis elemental por medio de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X.

En primer lugar, analizando los resultados obtenidos al observar las muestras de hidrólisis a través del microscopio, se puede observar que las estructuras principales más grandes se mantienen a lo largo de toda la hidrólisis, si bien la evolución de la relación de carbono y oxígeno de estas estructuras van perdiendo contenido en celulosa, enriqueciéndose por lo tanto en lignina. Esto indica una degradación de la estructura celulósica a lo largo de la reacción, si bien no se produce un colapso total de la misma. Este factor indica que los procesos de atrapamiento de las enzimas en la estructura del sustrato cobran importancia, especialmente para tiempos avanzados de reacción.

Aunando la información obtenida en las publicaciones 4 y 5, así como lo observado en la evolución de la estructura deducida de las imágenes obtenidas del microscopio, es posible plantear un modelo cinético físico-químico válido para la descripción general del proceso. Tal y como se ha ido indicando anteriormente, el modelo se planteó con un esquema de reacción formado por un proceso con dos etapas en serie. En la primera etapa, la celulosa sólida se transforma en celobiosa, soluble en el medio líquido. Esta transformación la llevan a cabo las enzimas endo y exoglucanasas. En la segunda etapa, la celobiosa se transforma en glucosa por medio de la acción de las enzimas β -glucosidasa.

Si bien el ajuste de la ecuación cinética correspondiente a la segunda parte de la reacción se hizo con los resultados obtenidos en las

publicaciones 4 y 5, es necesario plantear una ecuación cinética válida para describir la primera parte del proceso. Teniendo en cuenta los resultados presentes en la bibliografía, así como lo observado en las imágenes del microscopio, se puede deducir que la ecuación más adecuada era un modelo tipo Michaelis-Menten, asumiendo una inhibición competitiva por producto, en este caso celobiosa. Además, se añadió una ecuación de pérdida de actividad relativa, asociada a la adsorción de las enzimas endo y exo-glucanasas en la superficie del sólido reactivo, cuyo efecto se agrava para mayores concentraciones enzimáticas, dando lugar a un fenómeno conocido como congestamiento (en inglés, *overcrowding*). Este efecto de pérdida de actividad se observó, además, comparando la velocidad de reacción a distintos tiempos experimentales para diferentes dosis de enzima; así se observó una caída de actividad mucho más pronunciada para experimentos con mayor contenido inicial de enzima.

Una vez obtenidos los parámetros cinéticos a través del ajuste del modelo a los datos experimentales, se observó que el modelo cinético es capaz de reproducir todos los datos para las diferentes condiciones probadas. Además, los parámetros cinéticos obtenidos son válidos tanto desde el punto de vista estadístico, teniendo un intervalo de confianza bastante estrecho, como desde el punto de vista termodinámico, adoptando valores físicos válidos.

Finalmente, para comprobar la versatilidad del modelo cinético global, se utilizaron los experimentos recogidos en la publicación 3 para realizar el ajuste de los parámetros. De esta manera, el modelo cinético fue probado para un sólido lignocelulósico de naturaleza parecida, pero de origen diferente (cultivo y pre-tratamiento) así como hidrolizado con un cóctel enzimático distinto al empleado para los resultados descritos en la

publicación 6. Debido a que este cóctel (Zylase) presenta una concentración mucho más elevada de enzimas β -glucosidasas, y siendo esta reacción mucho más rápida que la degradación de celulosa a celobiosa, se consideró que la transformación de celobiosa en glucosa transcurría de forma prácticamente inmediata. Este hecho fue contrastado, además, con la observación experimental, ya que no se detectó cantidad apreciable de celobiosa a lo largo de los experimentos recogidos en las publicaciones 1 a 3. Como consecuencia, la velocidad de reacción del sistema se considera ligada a la velocidad de reacción de la primera etapa de reacción, siendo por lo tanto calculada sólo la primera parte del modelo cinético correspondiente a la despolimerización.

Los resultados del ajuste fueron, de nuevo, correctos tanto desde el punto de vista físico-químico como desde el punto de vista estadístico. Por lo tanto, se obtuvo un modelo cinético capaz de predecir con un grado de precisión elevado el comportamiento del sistema, pudiéndose decir así que el modelo cinético obtenido es robusto y versátil, adaptándose a la utilización de diferentes residuos y de cócteles enzimáticos.

CONCLUSIONES

Como consecuencia del trabajo desarrollado en esta Tesis doctoral se han podido establecer unas conclusiones que se describen a continuación por apartados. Hay que tener en cuenta que, tanto los resultados como las conclusiones derivadas de su interpretación, se recogen en cada uno de los seis artículos publicados o en proceso de publicación que se recogen en el Anexo.

Hidrólisis enzimática de un residuo lignocelulósico industrial

1. Efecto de la velocidad de agitación

- Para velocidades altas de agitación (250 rpm o mayores), la reacción química es la etapa limitante de la velocidad del proceso global.
- Para velocidades bajas de agitación (100 rpm o menor), la transferencia de materia es la controlante de la velocidad global. Un incremento de la velocidad de agitación repercute directamente en la cantidad de glucosa liberada con el tiempo de reacción, aumentando sensiblemente la velocidad del proceso global.
- Para velocidades intermedias de agitación se observa lógicamente un comportamiento intermedio entre los anteriormente descritos.

2. Estimación de la velocidad de transferencia de materia

- Calculada la velocidad de transferencia de materia a través de la estimación del coeficiente de transporte sólido-líquido, se llega a valores estimados razonables en los que se observa la misma tendencia en ambas magnitudes, que está marcada por el valor de la velocidad de agitación empleada.
- El cálculo del valor máximo de la velocidad de transferencia de materia en función del tiempo pone de manifiesto que, para las velocidades de agitación bajas, dicho valor es similar a la velocidad

global del proceso obtenida experimentalmente, determinada a partir de la evolución de la glucosa con el tiempo.

- Se comprobó, de acuerdo a los resultados anteriores, que el cambio de la velocidad de transporte (por aumento de la velocidad de agitación), en condiciones fluido-dinámicas en que la transferencia de materia es la etapa limitante de la velocidad, tiene un efecto inmediato de aumento de la velocidad de reacción, mientras que el aumento de la concentración de enzimas no tiene ninguna acción en la velocidad del proceso global.

3. Inhibición de la actividad enzimática por diferentes compuestos

- De todos los compuestos evaluados, sólo la glucosa (en altas concentraciones), y la lignina (en cualquier concentración) demostraron tener un efecto inhibitorio significativo sobre la velocidad del proceso de hidrólisis. Asimismo, se detectó un efecto inhibitorio menor causado por el ácido acético, si bien su efecto puede ser achacado al descenso provocado en el pH.

4. Modelo cinético fractal de la hidrólisis de paja de maíz pre-tratada

- Se probaron dos modelos cinéticos empíricos, uno potencial de orden n y otro utilizando el concepto de cinética fractal. Tanto el modelo potencial como el fractal son capaces de describir de forma adecuada los datos experimentales a agitaciones elevadas. Sin embargo, sólo el modelo fractal es capaz de describir de forma correcta los resultados de los experimentos a bajas agitaciones, con influencia de la transferencia de materia.
- El modelo empírico potencial proporciona dos parámetros cinéticos: el orden de reacción n que evoluciona de aproximadamente 2 para los experimentos a agitación superior a 200 rpm a 13 para el experimento realizado a 50 rpm, y la constante cinética k que tiene un valor medio

de 0.055 h⁻¹ para el primer caso y 0.082 h⁻¹ para el segundo, siendo la ecuación cinética final obtenida la siguiente.

$$\frac{dx}{dt} = k \cdot (1 - x)^n$$

- El modelo fractal proporciona un parámetro, la dimensión fractal h , con una tendencia ajustada a la influencia de la transferencia de materia sobre la velocidad del proceso global, que varía entre 0.2 para experimentos con más de 300 rpm de agitación a 0.61 para el experimento con menor agitación (50 rpm). Asimismo, la constante cinética del modelo (k') varía entre 0.055 h⁻¹ y 0.021, respectivamente. Las ecuaciones cinéticas obtenidas se muestran a continuación.

$$R_G = \frac{dx}{dt} = k' \cdot (1 - x)$$

$$k' = k \cdot t^{-h} \quad \forall t \geq 1$$

$$k' = k \quad \forall 0 \leq t \leq 1$$

Estudio de las etapas de hidrólisis de lignocelulosas

5. Modelo cinético de la hidrólisis de celobiosa con enzimas β -glucosidasas

- Aplicando el método diferencial y, posteriormente, el método integral, se determinó un modelo cinético para la sacarificación de celobiosa, basado en un modelo tipo Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por sustrato y competitiva por producto, con la participación de dos moléculas de glucosa en el proceso inhibitorio, de acuerdo a las siguiente ecuación:

$$\frac{dC_G}{dt} = \frac{(1.0 \pm 0.7) \cdot 10^6 \cdot e^{\frac{(4.8 \pm 0.2) \cdot 10^4}{R \cdot T}} \cdot C_E \cdot C_C}{(2.8 \pm 0.9) \cdot 10^{-3} \cdot \left(1 + \frac{C_G}{(5.1 \pm 0.4) \cdot 10^{-4}}\right)^2 + C_C \cdot \left(1 + \frac{C_C}{(8 \pm 3) \cdot 10^{-2}}\right)}$$

- Este modelo cinético cumple con los criterios estadísticos y fisicoquímicos y es capaz de describir los datos experimentales de una forma excelente.

6. Actividad de las enzimas β -glucosidasas en función de la temperatura

- Se ha propuesto un modelo cinético de desactivación térmica de las enzimas citadas. Este modelo considera una caída de la actividad de primer orden con una actividad residual remanente asintótica (β). Dicho modelo es capaz de reproducir la evolución de la actividad para el intervalo de temperatura de 40 a 70 °C, cumpliendo los parámetros físicos y estadísticos, viene dado por la siguiente ecuación:

$$\frac{C_E}{C_{E0}} = ((4.02 \pm 1.03) + (1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-2} \cdot T) + (1 - ((4.02 \pm 1.03) + (1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-2} \cdot T)) \cdot e^{-(7 \pm 3) \cdot 10^9 \cdot e^{\frac{(7 \pm 3) \cdot 10^6}{R \cdot T}} \cdot t}$$

- Como el modelo predice, se comprobó que la enzima β -glucosidasa empleada es capaz de mantener una actividad muy alta aún a tiempos largos de operación.
- Una vez tenido en cuenta el efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima en el modelo cinético, se amplió el modelo general para describir el efecto de la temperatura sobre la sacarificación de celobiosa. Este modelo cinético, una vez más, cumplió con los parámetros tanto estadísticos como físicos necesarios para su validación.

$$\frac{dC_G}{dt} = \frac{(2.2 \pm 0.2) \cdot 10^7 \cdot e^{\frac{(4.9 \pm 0.3) \cdot 10^4}{R \cdot T}} \cdot C_E \cdot C_C}{(2.8 \pm 0.9) \cdot 10^{-3} \cdot \left(1 + \frac{C_G}{(5.1 \pm 0.4) \cdot 10^{-4}}\right)^2 + C_C \cdot \left(1 + \frac{C_C}{(8 \pm 3) \cdot 10^{-2}}\right)}$$

7. Efecto del sólido real sobre la actividad de las enzimas β -glucosidasas

- La enzima β -glucosidasa empleada en este estudio mantiene un nivel elevado de actividad después de un largo tiempo en contacto con el sólido lignocelulósico. La ecuación de actividad para este caso se indica a continuación.

$$\frac{C_E}{C_{E0}} = ((0.78 \pm 0.08) + (1 - (0.78 \pm 0.08)) \cdot e^{-(9 \pm 1) \cdot 10^{-4} \cdot t})$$

8. Modelo cinético para la despolimerización de la celulosa

- La evolución morfológica y estructural del sólido, observada a través de imágenes SEM y espectroscopía de dispersión de rayos X, puso de una disminución en el contenido de celulosa, aunque se mantenía su morfología incluso para tiempos elevados de reacción.
- Se ha propuesto un modelo cinético con inhibición competitiva por producto (celobiosa), y con una ecuación cinética de inactivación de la enzima posiblemente causada por adsorción. Este modelo cinético se resume en las siguientes ecuaciones:

$$-\frac{dC_{Cel}}{dt} = r_1 = \frac{(1.2 \pm 0.3) \cdot 10^{-2} \cdot C_{E1} \cdot C_{Cel}}{(1.5 \pm 0.1) \cdot \left(1 + \frac{C_C}{(1.0 \pm 0.7) \cdot 10^{-2}}\right) + C_{Cel}}$$

$$C_{E1} = C_{E10} \cdot (\beta + (1 - \beta) \cdot e^{-(8 \pm 3) \cdot 10^{-2}})$$

9. Modelo cinético físico-químico de la hidrólisis enzimática

- Se ha propuesto un modelo cinético con un esquema de reacción con dos reacciones en serie, una primera etapa de despolimerización de la celulosa hasta celobiosa y una segunda etapa de conversión de celobiosa en glucosa. Los parámetros cinéticos obtenidos al ajustar los datos experimentales fueron y coherentes desde el punto de vista

estadístico y fisicoquímico. Este modelo cinético es capaz de describir las tendencias experimentales observadas.

$$\begin{aligned} \frac{dC_G}{dt} &= r_2 \\ &= \frac{(6 \pm 1) \cdot 10^{-1} \cdot C_{E2} \cdot C_C}{(3 \pm 1) \cdot 10^{-1} \cdot \left(1 + \frac{C_G}{(2.3 \pm 0.8) \cdot 10^{-2}}\right)^2 + C_C \cdot \left(1 + \frac{C_C}{(9 \pm 4) \cdot 10^{-5}}\right)} \\ C_{E2} &= C_{E20} \cdot e^{-(4 \pm 1) \cdot 10^{-2}} \end{aligned}$$

10. Aplicación del modelo cinético a otros sólidos y cócteles enzimáticos.

- Para evaluar la robustez y versatilidad del modelo cinético obtenido, se aplicaron las ecuaciones cinéticas del mismo para ajustar los parámetros cinéticos correspondientes a la hidrólisis enzimática de la paja de maíz descrita al inicio de la presente Tesis.
- Aplicando las correcciones necesarias, el modelo cinético descrito en el punto anterior fue capaz, cambiando el valor de los parámetros, de reproducir adecuadamente la evolución de los compuestos clave en la hidrólisis enzimática empleando otro sólido pre-tratado y un distinto cóctel enzimático, en ambos casos los primeros utilizados en este trabajo, con características industriales reales.

$$\begin{aligned} -\frac{dC_{Cel}}{dt} &= r_1 = \frac{(1.19 \pm 0.07) \cdot 10^{-2} \cdot C_{E1} \cdot C_{Cel}}{(1.5 \pm 0.1) \cdot \left(1 + \frac{C_C}{(1.0 \pm 0.7) \cdot 10^{-2}}\right) + C_{Cel}} \\ C_{E1} &= C_{E10} \cdot \left((0.18 \pm 0.03) + (1 - (0.18 \pm 0.03)) \cdot e^{-(4.8 \pm 0.9) \cdot 10^{-2}} \right) \end{aligned}$$

Conclusiones generales de la tesis doctoral

- La hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos es un proceso muy complejo en el que concurren, de forma simultánea, varios fenómenos fisicoquímicos: varias reacciones químicas catalizadas por distintas enzimas, acople con la transferencia de materia externa y seguramente también interna en los poros o huecos generados en el sólido por el pre-tratamiento y el ataque de las enzimas glucanasas.
- La transferencia de materia es especialmente importante cuando la sacarificación se lleva a cabo en condiciones industriales, con un alto contenido inicial en sólidos. Se trata de un fenómeno poco y mal estudiado en la literatura, cuya descripción y caracterización permite obtener una mejora sustancial en el conocimiento del proceso y, por ende, en la viabilidad del mismo, al no consumir mayor cantidad de enzimas.
- Aunque la modelización cinética es compleja para este tipo de sistemas (reacciones sólido-líquido, fuertemente influidas por la transferencia de materia), el empleo de modelos cinéticos resulta ser una herramienta eficaz para la descripción del proceso, tanto con los modelos cinéticos más complejos, con un enfoque fenomenológico, como con los modelos empíricos más simples, destacando especialmente los modelos fractales.

Si bien existen otros factores, la factibilidad de este proceso a escala industrial sigue dependiendo en gran medida del coste del catalizador enzimático. Por ello, un conocimiento profundo del mecanismo de acción de estos catalizadores permitirá desarrollar tecnologías más adecuadas para un aprovechamiento más eficaz de los mismos.

CONCLUSIONS

As a consequence of the work developed on the present thesis, it was possible to establish certain conclusions, which are described ahead separately. However, it is important to note that both results and information achieved with results interpretation are described in each of the six published or in review-process articles, all of which are present in the annexed section.

Enzymatic hydrolysis of an industrial lignocellulosic residue

1. Stirrer speed effect

- For high stirrer speeds (more than 250 rpm), kinetic reaction rate is the limiting step of the global process rate.
- For low stirrer speeds (less than 100 rpm), mass transfer rate exerts control over global process rate. An increment of the mass transfer rate increases dramatically the the glucose amount released during reaction time and the global process rate.
- As it is logical, in the case of intermediate stirrer speeds, it has been observed an intermediate behaviour on the reaction system.

2. Mass transfer rate estimation

- After mass transfer rate calculation, conducted by means of the solid-liquid mass transport coefficient, the evolution of both parameters was consistent with the previously described tendencies, heavily influenced by the stirrer speed rate.
- Mass transfer rate calculation pointed out that, for low stirrer speeds rates; global reaction rate (calculated by means of the amount of glucose released through the experimental time) was similar to this mass transfer rate.
- It has been proved that, for experimental conditions that involve mass transfer rate control, an increase on mass transfer rate (increasing

stirrer speed) renders subsequently an immediate effect rising glucose concentration. However, this effect was not observed by augmenting the amount of enzyme employed.

3. Enzymatic activity inhibition caused by different compounds

- Through all the compounds that have been proved, only glucose (in high concentrations), and lignin (in every concentration) have demonstrated to had a measurable inhibitory effect over the hydrolysis process rate. Likewise, it was detected a minor inhibitory effect caused by acetic acid, even though this effect may be explained by pH decreasing produced by its presence.

4. Fractal kinetic model of pre-treated corn stover enzymatic hydrolysis

- Two different empiric kinetic models were proved, a potential kinetic model with a reaction order of n , and another one employing fractal kinetics approach. Both of them were able to describe adequately experimental data in experiments in which the stirrer speed was high. However, only the fractal model was capable to describe correctly the experimental results obtained for low stirrer speed values, with the influence of mass transfer phenomena.
- Potential empiric kinetic model rends two different kinetic parameters: reaction order n with a value that evolves from 2 for the experiments at stirrer speed higher than 200 rpm to 13 for the experiments conducted with 50 rpm of stirrer speed, and the kinetic constant k which has a mean value of 0.055 h^{-1} for the first aforementioned experiments, and 0.082 h^{-1} for the last example cited, being the kinetic equation achieved the following one.

$$\frac{dx}{dt} = k \cdot (1 - x)^n$$

- Fractal model provides the fractal dimension h , with an observed tendency that can be adjusted to the influence of the mass transfer rate over the global process rate, varying from 0.2 for experiments with an agitation superior to 300 rpm to 0.61 for the experiment with the less stirring speed (50 rpm). In a similar way, kinetic constant (k') evolves from 0.055 to 0.021 h^{-1} , respectively. Kinetic equations achieved are shown below.

$$R_G = \frac{dx}{dt} = k' \cdot (1 - x)$$

$$k' = k \cdot t^{-h} \quad \forall t \geq 1$$

$$k' = k \quad \forall 0 \leq t \leq 1$$

Study of the lignocellulosic biomass hydrolysis stages

5. Kinetic modelling of the cellobiose hydrolysis with β -glucosidase enzymes

- Employing differential method and, later, integral method, it has been determined a kinetic model for the cellobiose saccharification, based on a Michaelis-Menten with an acompetitive inhibition by the substrate and competitive inhibition by the product, with the involvement of two glucose models in the inhibitory process, accordingly to the next equation:

$$\frac{dC_G}{dt} = \frac{(1.0 \pm 0.7) \cdot 10^6 \cdot e^{\frac{(4.8 \pm 0.2) \cdot 10^4}{R \cdot T}} \cdot C_E \cdot C_C}{(2.8 \pm 0.9) \cdot 10^{-3} \cdot \left(1 + \frac{C_G}{(5.1 \pm 0.4) \cdot 10^{-4}}\right)^2 + C_C \cdot \left(1 + \frac{C_C}{(8 \pm 3) \cdot 10^{-2}}\right)}$$

- This kinetic model satisfies statistical and physicochemical criteria, being able to describe precisely the experimental data obtained.

6. Thermal dependency of the enzymatic activity of β -glucosidase enzymes

- It has been proposed a thermal inactivation kinetic model of the aforementioned enzymes. This model takes into account a first order decay of the enzyme activity with an asymptotic final residual activity (β). This model has the ability to reproduce the evolution of the enzymatic activity for temperatures between 40 and 70 °C, fulfilling physical and statistical parameters. The kinetic equations are shown in the equation below.

$$\frac{C_E}{C_{E0}} = ((4.02 \pm 1.03) + (1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-2} \cdot T) + (1 - ((4.02 \pm 1.03) + (1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-2} \cdot T)) \cdot e^{-(7 \pm 3) \cdot 10^9 \cdot e^{\frac{(7 \pm 3) \cdot 10^6}{R \cdot T}} \cdot t}$$

- As the model predicts, it has been proved that the β -glucosidase enzyme employed is able to maintain very high activity even with larger operational time.
- After taking into account the effect of temperature over enzyme activity into previously obtained kinetic model, it has been widen in order to describe the effect of temperature over cellobiose saccharification. Once more, this kinetic model met up with statistical and physical parameters necessities to validate it.

$$\frac{dC_G}{dt} = \frac{(2.2 \pm 0.2) \cdot 10^7 \cdot e^{\frac{(4.9 \pm 0.3) \cdot 10^4}{R \cdot T}} \cdot C_E \cdot C_C}{(2.8 \pm 0.9) \cdot 10^{-3} \cdot \left(1 + \frac{C_G}{(5.1 \pm 0.4) \cdot 10^{-4}}\right)^2 + C_C \cdot \left(1 + \frac{C_C}{(8 \pm 3) \cdot 10^{-2}}\right)}$$

7. Effect of a real solid over β -glucosidase enzymes activity

- The β -glucosidase enzyme studied in this work was able to maintain a huge activity after long contacting time with lignocellulosic biomass. The activity equation for this instance is shown below.

$$\frac{C_E}{C_{E0}} = ((0.78 \pm 0.08) + (1 - (0.78 \pm 0.08)) \cdot e^{-(9 \pm 1) \cdot 10^{-4} \cdot t})$$

8. Kinetic model for cellulose depolymerisation

- Morphologic and structural evolution of the studied solid, observed by means of a SEM-EDS imaging-spectrometry technology, shown a diminishing of the cellulose content of the studied samples, although the morphology and structure was maintained even for long reaction times.
- A kinetic model was determined with competitive inhibition provoked by the product (cellobiose), and with an inactivation kinetic equation, being that inactivation caused probably by adsorption processes. This kinetic model can be resumed in the next equations.

$$-\frac{dC_{Cel}}{dt} = r_1 = \frac{(1.2 \pm 0.3) \cdot 10^{-2} \cdot C_{E1} \cdot C_{Cel}}{(1.5 \pm 0.1) \cdot \left(1 + \frac{C_C}{(1.0 \pm 0.7) \cdot 10^{-2}}\right) + C_{Cel}}$$

$$C_{E1} = C_{E10} \cdot (\beta + (1 - \beta) \cdot e^{-(8 \pm 3) \cdot 10^{-2}})$$

9. Physical-chemical kinetic model for enzymatic hydrolysis

- It has been proposed a kinetic model with a reaction scheme composed by two consecutive reactions, a first cellulose depolymerisation step into cellobiose and a second stage of cellobiose conversion into glucose. Kinetic parameters achieved after experimental data adjustment were statistically and physicochemically consistent. Furthermore, this kinetic model is able to describe experimental observed tendencies.

$$\frac{dC_G}{dt} = r_2$$

$$= \frac{(6 \pm 1) \cdot 10^{-1} \cdot C_{E2} \cdot C_C}{(3 \pm 1) \cdot 10^{-1} \cdot \left(1 + \frac{C_G}{(2.3 \pm 0.8) \cdot 10^{-2}}\right)^2 + C_C \cdot \left(1 + \frac{C_C}{(9 \pm 4) \cdot 10^{-5}}\right)}$$

$$C_{E2} = C_{E20} \cdot e^{-(4\pm 1) \cdot 10^{-2}}$$

10. Kinetic model usage for other solids and enzymatic cocktails.

- To evaluate the sturdiness and versatility of the reached kinetic model, kinetic equations obtained for this model were employed to evaluate the kinetic parameters corresponding to an enzymatic hydrolysis of a pre-treated corn stover previously described in the present work.
- Applying the necessary corrections to the kinetic model previously described, and recalculating the value of the kinetic parameters, the developed kinetic model was able to reproduce properly the evolution of the key compounds of the enzymatic hydrolysis employing different pre-treated solid and enzymatic cocktail, both of them employed in previously described experiments in this work, with real industrial characteristics.

$$-\frac{dC_{Cel}}{dt} = r_1 = \frac{(1.19 \pm 0.07) \cdot 10^{-2} \cdot C_{E1} \cdot C_{Cel}}{(1.5 \pm 0.1) \cdot \left(1 + \frac{C_C}{(1.0 \pm 0.7) \cdot 10^{-2}}\right) + C_{Cel}}$$

$$C_{E1} = C_{E10} \cdot \left((0.18 \pm 0.03) + (1 - (0.18 \pm 0.03)) \cdot e^{-(4.8\pm 0.9) \cdot 10^{-2}} \right)$$

General conclusions of doctoral thesis

- Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials is a very complex process in which there are involved, simultaneously, many physical and chemical processes, such as various chemical reactions coupled with external and, probably, internal mass transfer through pores or cavities generated by the pre-treatment techniques employed and glucanase enzymes attack.

- Mass transfer is especially relevant when the saccharification reaction is carried out in industrial conditions, with high initial solids content. Mass transfer is a phenomenon not usually described in the literature for this process, and its description and characterization may lead to a deepening on the knowledge of the reaction and, therefore, to an increase of the viability of the global process by reducing the economic costs associated to the enzyme consumption.
- Although kinetic modelling is complex for this type of processes (solid-liquid reactions, heavily influenced by the mass transfer process), it can be a powerful tool for the process description, both for more complex phenomenological models and far less complicated empirical models, in which fractal models stand out.
- Even though there are other important factors that may have weight over the process, industrial viability still depends on enzymatic cocktail costs. Thus, a deeper understanding of the action mechanism of these catalysts will lead to develop more suitable technologies for a better exploitation of the enzymes.

ANEXO (PUBLICACIONES)

Publicación 1

Autores: Mateusz Wojtusik, Mauricio Zurita, Juan Carlos Villar, Miguel Ladero, Félix García-Ochoa.

Título: Influence of fluid dynamic conditions on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Effect of mass transfer rate.

Revista: Bioresource Technology (2016), 216: 28-35.

Índice de impacto: 5.651

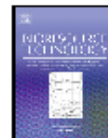
Categoría: Ingeniería agrícola, biotecnología y microbiología aplicada, combustibles y energía.

Resumen: El efecto de las condiciones fluidodinámicas sobre la hidrólisis enzimática de paja de maíz pre-tratada con un pre-tratamiento de ácido diluido. Los experimentos se llevaron a cabo en tanques agitados utilizando distintas velocidades de agitación, manteniendo el resto de los parámetros experimentales bajo las condiciones típicas para la hidrólisis enzimática de este tipo de residuos: Una temperatura de 50 °C, un pH de 4.8 y una carga de sólidos de un 20 % en masa respecto de la masa total del sistema. El cóctel enzimático empleado, Zylase, compuesto por una mezcla compleja de celulasas, xilanasas y manasas, fue suministrado por la empresa Abengoa. Tras el cálculo de la velocidad de transferencia de materia a través de la determinación del coeficiente de transporte sólido-líquido, se observó la existencia de tres zonas diferenciadas desde el punto de vista de la agitación. A velocidades de agitación bajas (inferior a 150 rpm), el transporte de materia ejerce control sobre la velocidad global del proceso, mientras que para valores superiores a 300 rpm, el efecto es el contrario, observándose un comportamiento intermedio entre ambas agitaciones. Esta influencia se ve reflejada, además, en el efecto diferencial que posee sobre el sistema la variación tanto de la agitación

como de la cantidad de catalizador empleado, ya que un aumento de la velocidad de agitación se ve reflejado directamente en una mayor liberación de glucosa, alcanzándose resultados similares a los obtenidos en los experimentos sin control de la transferencia de materia, mientras que un incremento en la concentración de catalizador (tanto inicial como durante el experimento) apenas tiene un influjo positivo sobre la cantidad de glucosa liberada.

Enlace:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852416306824>



Influence of fluid dynamic conditions on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Effect of mass transfer rate



Mateusz Wojtusik^a, Mauricio Zurita^b, Juan C. Villar^c, Miguel Ladero^a, Felix Garcia-Ochoa^{a,*}

^a Chemical Engineering Department, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Abengoa Research, Campus de Palmas Altas, 41014 Sevilla, Spain

^c Laboratory of Cellulose and Paper, INIA, Forest Research Center, Ctra. de la Coruña km 7.5, 28040 Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- Influence of stirring speed on lignocellulose hydrolysis in a STBR is studied.
- Overall hydrolysis process and estimated mass transfer rates are compared.
- Enzyme mass transfer is the controlling step when the stirrer speed is under 150 rpm.
- Enzymatic hydrolysis rate controls at stirrer speeds higher than 250 rpm.
- Stirring speed influences much more overall rate than enzyme concentration.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 March 2016

Received in revised form 12 May 2016

Accepted 13 May 2016

Available online 14 May 2016

Keywords:

Enzymatic hydrolysis

Lignocellulosic biomass

Mass transfer

Stirrer speed

Fluid dynamic

ABSTRACT

The effect of fluid dynamic conditions on enzymatic hydrolysis of acid pretreated corn stover (PCS) has been assessed. Runs were performed in stirred tanks at several stirrer speed values, under typical conditions of temperature (50 °C), pH (4.8) and solid charge (20% w/w). A complex mixture of cellulases, xylanases and mannanases was employed for PCS saccharification. At low stirring speeds (<150 rpm), estimated mass transfer coefficients and rates, when compared to chemical hydrolysis rates, lead to results that clearly show low mass transfer rates, being this phenomenon the controlling step of the overall process rate. However, for stirrer speed from 300 rpm upwards, the overall process rate is controlled by hydrolysis reactions. The ratio between mass transfer and overall chemical reaction rates changes with time depending on the conditions of each run.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bioethanol production is gaining importance nowadays as a renewable, sustainable, and economically viable fuel (Mood et al., 2013). Global production of biofuels has dramatically increased in recent years, from 18.2 billion litres in 2000 to 60.6 billion litres in 2007, with about 85% of this amount being due to bioethanol (Saini et al., 2015). Bioethanol is mainly produced from sugar and starch-rich materials (first generation bioethanol), with USA and Brazil as the leading producers in the world (from corn and sugarcane, respectively) with 89% of the total global production (Morales et al., 2015). However, the biofuel generated using food crops has the main disadvantage of competing with food production for the arable land (Gupta and Verma, 2015).

In recent years, many different types of lignocellulosic biomass (see Table 1) have been used as a feedstock for the industrial production of bioethanol, being this biofuel named second-generation bioethanol. Despite of its many advantages: e.g. availability, low price if not transported for long distances, non-competitiveness with the food chain, waste valorization (Paulova et al., 2015), the production of biofuels employing lignocellulosic biomass as the raw material presents several technical issues. Lignocellulose structure has evolved through the ages to resist natural degradation, so it is inherently resistant to chemical or enzymatic degradation (Isikgor and Becer, 2015). The main components of lignocellulosic biomass are cellulose (a $\beta(1-4)$ linked D -glucose high molecular weight polymer), hemicellulose (a xylose and mannose polymer in most cases), lignin (a complex phenolic polymer), and extractives (Saini et al., 2015).

Accordingly, the process involving the transformation of the raw material into bioethanol is more difficult for second- than for first-generation feedstocks. Although there are various ways to

* Corresponding author.

E-mail address: fgchoa@ucm.es (F. Garcia-Ochoa).

Publicación 2

Autores: Mateusz Wojtusik, Mauricio Zurita, Juan Carlos Villar, Miguel Ladero, Félix García-Ochoa.

Título: Study of the enzymatic activity inhibition on the saccharification of acid pretreated corn stover.

Revista: Biomass and Bioenergy (2017), 98: 1-7.

Índice de impacto: 3.219

Categoría: Ingeniería agrícola, biotecnología y microbiología aplicada, combustibles y energía.

Resumen: Durante la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos, la presencia de diversos compuestos procedentes tanto del pre-tratamiento como de la propia hidrólisis puede influir negativamente tanto en la velocidad de producción de azúcares como en la cantidad final de producto liberado. Por ello, en este trabajo se planteó analizar el posible efecto inhibitorio de los compuestos detectados durante la sacarificación de paja de maíz pre-tratada empleada en el artículo previamente descrito. Empleando condiciones experimentales en las que no existe control de la transferencia de materia, se probó a añadir tres cantidades diferentes de glucosa (hasta $110 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), celobiosa (hasta $24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), xilosa (hasta $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), arabinosa (hasta $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), furfural (hasta $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 5-hidroximetilfurfural (hasta $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y lignina (hasta $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). De todos los potenciales inhibidores estudiados, sólo la glucosa en altas concentraciones (cantidades superiores a las observadas en ninguno de los experimentos realizados) y la lignina a cualquier concentración ejercen un efecto claramente negativo tanto sobre la cantidad final de glucosa como a la velocidad de liberación de la misma

Enlace:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953417300107>



Research paper

Study of the enzymatic activity inhibition on the saccharification of acid pretreated corn stover

Mateusz Wojtusik ^a, Juan C. Villar ^b, Mauricio Zurita ^c, Miguel Ladero ^a, Felix Garcia-Ochoa ^{a,*}^a Chemical Engineering Department, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain^b Laboratory of Cellulose and Paper, INIA, Forest Research Centre, Ctra.de la Coruña km 7,5, 28040 Madrid, Spain^c Abengoa Research, Campus de Palmas Altas, 41014 Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 June 2016

Received in revised form

17 October 2016

Accepted 4 January 2017

Available online 12 January 2017

Keywords:

Enzymatic hydrolysis

Enzymatic inhibition

Lignocellulosic biomass

Corn stover

ABSTRACT

The inhibition of the enzymatic saccharification of acid pretreated corn stover (PCS) biomass due to several compounds either present in PCS or produced during saccharification has been studied. The prospective inhibitors tested were glucose (≤ 110 g L⁻¹), cellobiose (≤ 24 g L⁻¹), xylose (≤ 50 g L⁻¹), arabinose (≤ 1.5 g L⁻¹), furfural (≤ 2 g L⁻¹), hydroxymethylfurfural (≤ 1 g L⁻¹), acetic acid (≤ 4 g L⁻¹), and lignin (≤ 50 g L⁻¹). Each of these compounds was added at three different concentrations, being the concentration intervals different according to standard maximum concentrations of such compounds in the reaction medium, previously measured and described in literature. In addition, these experiments were employed to evaluate the standard error present during the evaluation of the results obtained in the inhibition reactions. Those results show that significant inhibition was only detected for lignin (more than 25 g L⁻¹) and it was also appreciable for glucose at high concentrations (above 75 g L⁻¹), although it was not remarkable at medium concentrations (40 g L⁻¹). On the other hand, neither of the remaining compounds tested presented any significant inhibitory effect at the usual process concentration range.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Currently, lignocellulosic biomass has become one of the most important renewable sources for biofuels and chemicals production through its conversion to short-chained sugars [1,2]. Contrary to production of sugars employing food crops, which compete with food and animal feed crops [3], this new industrial technology involves the use of agroforestry waste, among other non-edible feedstock. In the latter years, an industrial process gaining increasing importance is the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass [4]. However, lignocellulosic biomass consists of cellulose surrounded by a hemicellulose-lignin matrix, being lignin recalcitrant to decomposition [4]. There are different pretreatment methods that can be used to facilitate enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass (Table 1). Their purpose is to disrupt lignocellulosic biomass structure so as to yield several fractions of it and render it more accessible and reactive to enzymatic

degradation. However, pretreatments may produce several compounds able to act as inhibitors for the subsequent enzymatic hydrolysis [4–6].

This enzymatic degradation is carried out by a complex mixture of enzymes [7]. Although there are many different industrial enzyme cocktails, the main cellulase activities present in this kind of formulations are endoglucanases, exoglucanases, and β -glucosidases. It appears that these enzymes show interaction among them leading to a synergistic effect, for each of them creates substrates for the others or remove oligosaccharides and disaccharides that are inhibitors of another cellulases [3]. Moreover, the compounds released during pretreatment of lignocellulosic biomass may cause inhibitory effects to one or more of these enzymes or disrupt synergistic effects among the different enzymes present in enzymatic cocktail formulations [2].

Lignin has been found to be one of the most reported compounds in literature as an important inhibitor of enzymatic hydrolysis, jointly with its oligomers and monomers [5,8–11]. Lignin is a cross-linked aromatic polymer composed of hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl units [11], which can interfere in the activity of cellulases. Although the mechanism of lignin-related inhibition

* Corresponding author.

E-mail address: fgchoa@ucm.es (F. Garcia-Ochoa).

Publicación 3

Autores: Mateusz Wojtusik, Mauricio Zurita, Juan Carlos Villar, Miguel Ladero, Félix García-Ochoa.

Título: Enzymatic saccharification of acid pretreated corn stover. Empirical and fractal kinetic modelling.

Revista: Bioresource Technology (2016), 220: 110-116.

Índice de impacto: 5.651

Categoría: Ingeniería agrícola, biotecnología y microbiología aplicada, combustibles y energía.

Resumen: A través de los resultados obtenidos en la publicación correspondiente al estudio del efecto de la transferencia de materia, se planteó describir el sistema de la hidrólisis enzimática de paja de maíz pre-tratada con pre-tratamiento tipo ácido diluido a través de la modelización cinética, planteando un esquema de reacción de una sola etapa (de celulosa a glucosa). Para ello, se utilizaron dos tipos diferentes de modelos cinéticos. En primer lugar, se empleó un modelo empírico potencial, en el que se calculó el valor de orden de reacción n . Para valores altos de agitación (mayores de 250 rpm), el valor de n se aproximó a 2, mientras que para valores bajos (menores de 150 rpm), se obtuvo un valor de n muy elevado, llegando incluso a ser superior a 10. Asimismo, si bien el modelo era capaz de describir de forma correcta los experimentos con alta agitación, no fue así con los que se realizaron en condiciones desfavorables respecto a la transferencia de materia. En cuanto al segundo modelo utilizado, se recurrió a una cinética de tipo fractal, que considera que no se cumple la ley de acción de masas debido a la imposibilidad de transcurrir la reacción en las tres dimensiones del espacio debido a impedimentos estéricos causados por la evolución de la

superficie del sólido. Para reflejar esta influencia, se define un parámetro fractal h (dimensión fractal) que afecta a la constante cinética de reacción. Cuanto mayor es el valor de h , la constante cinética del modelo fractal (en este caso, basado en un modelo potencial de orden 1) la velocidad de reacción decrece de forma más abrupta, reflejando el influjo de la superficie del sólido y por ende de la transferencia de materia sobre la cinética de la reacción. Este hecho se ve contrastado con los resultados obtenidos, en los que se observa que el valor de h es mínimo para altas agitaciones (en torno a 0.2), mientras que se dispara para aquellos experimentos en los que la transferencia de materia ejerce control sobre el proceso global, llegando a valer 0.63 para 50 rpm de agitación. Adicionalmente, el modelo fractal cumplió con todos los criterios estadísticos y termodinámicos consultados.

Enlace:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241631197X>



Enzymatic saccharification of acid pretreated corn stover: Empirical and fractal kinetic modelling



Mateusz Wojtusik^a, Mauricio Zurita^b, Juan C. Villar^c, Miguel Ladero^{a,*}, Felix Garcia-Ochoa^a

^a Chemical Engineering Department, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Abengoa Research, Campus de Palmas Altas, 41014 Sevilla, Spain

^c Laboratory of Cellulose and Paper, INIA, Forest Research Center, Ctra. de la Coruña km 7.5, 28040 Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- Corn stover enzymatic saccharification is studied under mass transfer and biochemical reaction control regimes.
- Empirical potential and fractal kinetic models are applied and compared.
- Fractal kinetic model fits better to experimental data.
- Global order exponentially decreases to two as stirring speed is increased.
- Fractal exponent drops down to 0.19 with increasing stirring speed.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 June 2016

Received in revised form 16 August 2016

Accepted 17 August 2016

Available online 20 August 2016

Keywords:

Enzymatic hydrolysis

Corn stover

Kinetic modelling

Fractal model

Empirical model

Stirrer speed

ABSTRACT

Enzymatic hydrolysis of corn stover was studied at agitation speeds from 50 to 500 rpm in a stirred tank bioreactor, at high solid concentrations (20% w/w dry solid/suspension), 50 °C and 15.5 mg_{cellulase}/g_{cellulose}. Two empirical kinetic models have been fitted to empirical data, namely: a potential model and a fractal one. For the former case, the global order dramatically decreases from 13 to 2 as agitation speed increases, suggesting an increment in the access of enzymes to cellulose in terms of chemisorption followed by hydrolysis. For its part, the fractal kinetic model fits better to data, showing its kinetic constant a constant augmentation with increasing agitation speed up to a constant value at 250 rpm and above, when mass transfer limitations are overcome. In contrast, the fractal exponent decreases with rising agitation speed till circa 0.19, suggesting higher accessibility of enzymes to the substrate.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The depletion of oil reserves is encouraging research efforts focused on sustainable and renewable fuels and chemicals based on biomass as starting raw material, with bioethanol as a traditional biofuel gaining more and more importance. Competition with food markets is shifting feedstocks from corn grains and sugar cane to lignocellulosic biomass, obtaining what is widely known as second generation bioethanol (2G) (Klein-Marcuschamer and Blanch, 2015; Paulova et al., 2015; Srivastava et al., 2015). Although there are different processes to produce 2G bioethanol from lignocellulosic biomass, fractionation is the most usual one and involves three consecutive steps: pre-treatment, enzymatic hydrolysis, and fermentation (Saini et al., 2015).

Describing enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass by kinetic models is currently one of the most challenging subjects in bioreactor engineering science. These kind of models must deal with several phenomena and aspects, including: the complexity of the substrate structure, the intricate reaction network due to parallel and consecutive reactions, the synergistic action of several enzymes (endoglucanases, cellobiohydrolases and β -glucosidases, apart from the auxiliary enzymes), and the existence of enzyme-substrate and enzyme-effector interactions (chemisorption, physisorption, mass transfer, inhibition and deactivation) (Galeano Suarez et al., 2014; Hsieh et al., 2014; Jalak and Våljamäe, 2014; Moran-Mirabal et al., 2013). According to the approach followed by different authors to deal with these problems, Zheng et al. (2009) has established four different model categories: nonmechanistic empirical models; semimechanistic models with respect to substrate or with respect to enzyme, based on simple adsorption phenomena and functionally based models

* Corresponding author.

E-mail address: mladero@ucm.es (M. Ladero).

Publicación 4

Autores: Mateusz Wojtusik, Clara Yepes, Juan Carlos Villar, Arno Cordes, Miguel Arroyo, Félix García-Ochoa, Miguel Ladero.

Título: Kinetic modelling of cellobiose by β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*.

Revista: Chemical Engineering Research and Design (2018)

Índice de impacto: 2.538

Categoría: Ingeniería química

Resumen: La última etapa de la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos es la conversión de la celobiosa a glucosa llevada a cabo por las enzimas β -glucosidasas. En este trabajo, un nuevo cóctel enzimático suministrado por la empresa ASA-Spezialenzyme de enzimas β -glucosidasas ha sido analizado y caracterizado (resultando tener una actividad de $1326 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ y una masa molecular de 70 kDa para la banda TrBg11 y 114 kDa para TrBg12), y se ha utilizado en las condiciones óptimas de trabajo (pH de 4.9, mantenido con tampón citrato 50 mM, y un rango de temperaturas entre 40 y 50 °C) a diferentes concentraciones iniciales de sustrato (celobiosa comercial) y producto (glucosa) con el objetivo de obtener un modelo cinético robusto. Para ello, se ha aplicado una metodología secuencial, primero empleando los datos de velocidades iniciales de reacción para aplicar el método diferencial, donde se observó una tendencia lineal de la concentración de enzima con la velocidad de reacción así como una posible presencia de inhibición acompetitiva por sustrato. A partir de estos datos, se procedió a escoger el modelo cinético más adecuado para el sistema, discriminando entre seis tipos de modelos cinéticos. El modelo cuyo ajuste fue mejor desde el punto de vista termodinámico y estadístico resultó ser aquel que ponía

en consideración una ecuación cinética tipo Michaelis-Menten con una inhibición acompetitiva por sustrato y competitiva por producto, dándose en este caso una unión doble entre producto y centro activo, debido al tamaño relativo entre molécula de inhibidor (glucosa) y punto de unión producto-enzima (centro activo).

Kinetic modeling of cellobiose by a β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*

Mateusz Wojtusik¹, Clara M. Yepes^{1,2}, Juan C. Villar³, Arno Cordes³, Miguel Arroyo², Felix Garcia-Ochoa¹, Miguel Ladero^{1,*}

¹Chemical Engineering Department, Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid, Spain

²Biochemistry and Molecular Biology I Department, Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid, Spain

³Laboratory of Cellulose and Paper.INIA.Forest Research Center. 28040 Madrid, Spain.

⁴ASA Spezialenzyme. 38302Wolfenbüttel, Germany

*To whom correspondence must be addressed (tel: +34 913944164;mladerog@ucm.es)

ABSTRACT

The final step in lignocellulose enzymatic saccharification is the cellobiose conversion to glucose by β -glucosidases (BG). In this work, a valid kinetic model to describe cellobiose degradation for an industrial mixture of BG enzymes present in *Aspergillus fumigatus* is selected. Firstly, the enzyme mixture was characterised in terms of protein content and enzymatic activity on p-NPG (1326 U·mL_{preparation}⁻¹), determining the molecular weight of the main BGs by SDS-PAGE: 70 kDa for TrBgl1 and 114 kDa for TrBgl2. Subsequently, to select the correct kinetic model for the enzymatic hydrolysis of cellobiose, a combined strategy was performed: Firstly, non-linear regressions were applied to initial hydrolysis rate data for different enzyme concentrations and initial substrate and product concentrations, observing inhibition by cellobiose and glucose. Secondly, the optimal kinetic model was discriminated by a

coupled non-linear regression-DOE numerical integration approach, by fitting several possible kinetic models involving different product inhibition mechanisms to progress curve data from runs at various initial substrate concentrations and temperatures. The best kinetic model involves non-competitive substrate inhibition and product competitive inhibition with two binding sites for glucose.

KEYWORDS

Kinetic model discrimination; biorefinery; cellobiose; β -glucosidase; enzymatic hydrolysis; glucose

NOMENCLATURE

2GBE	Second generation bio-ethanol.
AA	Auxiliary activities
AIC	Akaike's information criterion
ASI	Acompetitive substrate inhibition
BG	β -glucosidase enzyme
BPI	Competitive by-product inhibition
BSA	Bovine serum albumina
C_E	Enzyme concentration ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
C_P	Product concentration (glucose) ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
C_S	Substrate concentration (cellobiose) ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
CAZy	Carbohydrate-active enzymes
CE	Carbohydrate esterase enzymes
CLD	Chain length distribution
CPI	Competitive product inhibition
E_{kcat}	Activation energy of the catalytic constant ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$)
EDG	Endoglucanase enzyme
EXG	Exoglucanase enzyme
F	Fischer's statistical parameter
GH	Glycoside hydrolase enzyme
GT	Glycoside transferase enzyme
HPLC	High performance liquid chromatography
k_{cat}	Catalytic constant ($\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}_E^{-1}$)
k_{cat0}	Prexponential factor of the catalytic constant ($\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}_E^{-1}$)

K_i	Acompetitive substrate inhibition constant ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
K_M	Substrate affinity constant ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
K_{NC}	Non-competitive product inhibition ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
K_P	Competitive product inhibition constant ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
K_X	Xylose competitive product inhibition constant ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
M-M	Michaelis-Menten kinetic model
N	Number of experimental data
NPI	Non-competitive product inhibition
P	Number of parameter evaluated on kinetic model
P_1	Empirical parameters of experimental data adjusting (numerator)
P_2	Empirical parameters of experimental data adjusting (denominator)
PAGE	Polyacrylamide gel elec-trophoresis
PL	Polysaccharide lyase enzyme
pNPG	4-nitrophenyl β -D-glucopyranoside
r	Reaction rate ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
r_0	Initial reaction rate ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
R	Ideal gas constant ($8.314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$)
R_P	Glucose production rate ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
R_S	Cellobiose hydrolysis rate ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
RID	Refraction index detector
RMSE	Residual mean square error
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SQR	Sum of quadratic residues
SSQ	Sum of squares
T	Temperature (K)
VE	Percentage of variation explained
v_{\max}	Maximum reaction rate ($\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$)
X_C	Conversion of cellobiose into glucose
γ_1	Heteroscedasticity parameter for VE determination

1. INTRODUCTION

In the years to come, biorefinery processes and products will be of utmost importance, being a more environmentally-friendly and renewable alternative or complement to the usual counterparts derived from petroleum. One of the best-known processes in biorefineries is the production of ethanol, widely used as a fuel additive (Choi et al., 2015). In 2015, 86 million tons of bioethanol from starch or sugar sources were produced (first generation bioethanol or 1GBE). To increase bioethanol sustainability and avoid interaction with food markets, lignocellulosic biomass feedstocks are envisaged as a more abundant and convenient raw material for bioethanol processing (second generation bioethanol or 2GBE). To this end, lignocellulosic biomass is pretreated, hydrolyzed with acids and/or enzymes and fermented with yeasts (Aditiya et al., 2016). The enzymatic saccharification step is key to achieve large amounts of economically feasible 2GBE (Gupta and Verma, 2015; Hasunuma et al., 2013). Hydrolysis releases glucose and other soluble sugars from cellulose by the action of endoglucanases (EDG), exoglucanases (EXG), β -glucosidases (BG) and other auxiliary enzymes (Hasunuma et al.,

2013). Cellulose is depolymerised by EDG and EXG into cellobiose and other cello-oligosaccharides, which are substrates for BG, that catalyses their subsequent transformation into glucose (Singh et al., 2015).

BG acts on the hydrolysis of glycosidic bonds, which produces the release of nonreducing terminal glucosyl residues from glycoside or oligosaccharide molecules: thus, BG is active on many different substrates where this type of bond is present, including cellobiose, glucosyl ceramide, salicin or laminaribiose (Ketudat Cairns and Esen, 2010; Singh et al., 2015).

Therefore, these enzymes are present in all domains of living organisms, comprising Archaea, Eubacteria and Eukaryotes, in which they have proven an enormous variety of functions (Ketudat Cairns and Esen, 2010). According to the role developed by the enzymes involved in the carbohydrate polymer decomposition, a Carbohydrate-Active Enzymes database was elaborated in 1998, named CAZy (Cantarel et al., 2009), which classifies the different involved enzymes in five activities: glycoside hydrolases (GH), glycoside transferases (GT), polysaccharide lyases (PL), carbohydrate esterases (CE), and auxiliary activities (AA) (Cantarel et al.,

2009). BGs, responsible for cellobiose hydrolysis, are classified as glycoside hydrolysis enzymes in the clan GHA, which contains families with similar conserved catalytic amino acids and catalytic domain structure. The most abundant family in BGs is GH1, yet they are also included in families GH5 and GH30 (Singh et al., 2015).

The importance of BG action in cellulose saccharification is notable both from the technical and economic viewpoints: these enzymes yield glucose from cellobiose and low-molecular weight cellooligosaccharides and, on the other side, their technical preparations at industrial level are 2-4 times more expensive than those with a high endo- and exoglucanase activity (as these latter mixtures usually lack adequate BG activity and needs BG complementation). In this regard, strategies that are focused on the recycling of the enzymes, either by recycling the spent solid (Waeonukul et al., 2013) or by using immobilization techniques that permit a good contact enzyme-substrate and a good separation of the enzymatic support after operation (Verma et al., 2016; Verma et al., 2013b) are being developed to reduce BG cost in saccharification.

There is still much controversy and research effort regarding kinetic modelling of the depolymerisation step due to endoglucanases and cellobiohydrolases (Hosseini and Shah, 2011a, b; Jeoh et al., 2017). In addition, kinetic information on the action of β -glucosidases still lacks precision, if present, as new BGs less prone to substrate and product inhibition are sought and proper kinetic modelling, looking for optimal kinetic models, is not always performed, even in the case of the most usual β -glucosidases, as those produced by molds of the *Trichoderma* genus. This lack of optimal kinetic models is due to the mathematical tools and model discrimination approaches (linearization of non-linear models or model screening based only on reaction rate, for example). A robust approach to kinetic modelling for enzyme-driven processes is suggested by Al-Haque et al. (Al-Haque et al., 2012).

Several kinetic models have been proposed in the literature to explain the catalytic activity of BG enzymes, as compiled in Table 1. In the first model shown therein, the authors employed an initial rate approach and a Lineweaver-Burk linear regression. The model did not fit accurately to experimental data, specially after long

experimental times, but it was proved that BG suffers from product inhibition as the enzyme has a much higher affinity for the product than for the substrate: K_M is 5.6 mM, K_i is 0.0244 mM (Hong et al., 1981).

Bravo et al. (2001) employed the previous model to fit to the experimental results achieved in the enzymatic hydrolysis of cellobiose by a commercial BG. Several initial pH values were tested and, whilst fitting one run at a time, very good fits were achieved. However, neither a relationship between pH and substrate and/or product inhibition nor a complete model able to reproduce the system kinetics for different pH values could be established (Bravo et al., 2001).

Corazza et al. (2005) used the enzyme employed by the previous authors and discriminated, by hybrid neural modelling, among the six possible combinations of models based on uncompetitive and noncompetitive substrate inhibition, on one hand, and competitive, uncompetitive and noncompetitive product inhibition on the other. They used the initial rate approach, concluding that the best-fitting models include competitive inhibition by the glucose and noncompetitive or acompetitive

inhibition by the substrate (Corazza et al., 2005).

Resa and Buckin (2011) used ultrasonic technology to diminish experimental error and establish a real-time on-line monitoring of enzyme reaction on cellobiose. Its enzymatic hydrolysis was carried out with a commercial BG at 50 °C and pH 4.9. In this work, a modification in the product inhibition pattern was included: a model that included two enzyme binding sites for glucose, as well as an uncompetitive inhibition on cellobiose, were fitted to experimental data. The best-fitting results have been achieved with the two-binding sites competitive inhibition model, with significant good fitting as suggested by a r^2 value of 0.98 (Resa and Buckin, 2011).

After Resa and Buckin's paper, few works have been published on kinetic modelling of enzymatic hydrolysis of cellobiose by BG enzymes, one of the latest covering the enzymatic hydrolysis of cellobiose (Tamaki et al., 2016). In this case, the authors established the kinetic model and its parameters for a newly developed BG enzyme, which results to have higher activity than other BG enzymes reported in literature (Tamaki et al., 2016).

There are several other papers in literature analysing synergistic effects between BG enzymes and other cellulases. For example, Tsai et al. (2014) proposed a Michaelis-Menten model with competitive glucose and xylose inhibition for the cellobiose to glucose reaction, which is a part of the global model for the degradation of cellulose, so the authors only give information about the kinetic parameters of the equation and global fitting of the cellulose-to-glucose experimental concentrations (Tsai et al., 2014). Other example is the paper by Lebaz et al. (2016), which evaluates theoretically the cellulose to glucose enzymatic reaction by calculating the progress of the chain length distribution (CLD) for the cellulose to cellobiose reaction, and a Michaelis-Menten model with competitive product inhibition for the cellobiose to glucose reaction. The authors do not provide experimental measurements, as they only perform a simulation in order to reproduce the enzymatic hydrolysis (Lebaz et al., 2016). Some years before, Wang et al, in 2012, wrote a comprehensive review including the different kinetic works on the enzymatic reaction of cellobiose to glucose, and other different reaction involved in the lignocellulotic substrate

degradation. As in other works reported in the literature, these authors assume that the cellobiose degradation by BG enzymes has a competitive inhibition by the product (glucose) (Wang et al., 2012).

The aim of this work is to study the cellobiose hydrolysis employing an enzymatic BG preparation from *Aspergillus fumigatus*. Initially, the enzymatic preparation was characterised regarding protein content, activity on pNPG and molecular weight. Then, several kinetic models were formulated, according to the results previously described in literature, and the experimental results obtained when different conditions were changed: temperature, enzyme concentration, cellobiose and glucose initial concentrations. Subsequently, several kinetic models were proposed and discriminated by fitting to experimental results

2. EXPERIMENTAL

2.1. β -glucosidase characterization

The enzyme employed in this work is a *Aspergillus fumigatus* β -glucosidase EC 3.2.1.23 preparation supplied by ASA Spezialenzyme GmbH. The protein content was evaluated employing Bradford method (Bradford, 1976), with a commercial Coomassie Plus® solution

(Thermo Scientific), and a protein standard solution (bovine serum albumina, BSA) (Sigma-Aldrich) for the calibration line. Bradford assays were carried out in a microtiter plate with 96 samples well (Thermo Scientific), and absorbance was measured with a Rayto RT-6100 microplate reader. The activity of the preparation was evaluated by means of a colorimetric reaction, employing 4-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (pNPG, Sigma-Aldrich) as substrate. Reactions were carried out at 40 °C and 5.0 pH, with a 100 mM citrate buffer solution as described below. Finally, a sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was made to identify the molecular weight of the proteins present in the preparation. A mini-protean Tetra Cell (Bio-Rad) reactor was employed, using a 12.5 % polyacrylamide gel (Fluka) of 1 mm thickness and a well for up to 10 samples. Protein separation was performed at a constant electric intensity of 25 mA. Samples were prepared with 10 % (v/v) of buffer (60 mM 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol (Tris) (Fluka) buffer, with a pH of 6.8), 2 % SDS (w/v) (Sigma-Aldrich), 0.01 % (w/v) of bromophenol blue (Sigma-Aldrich) and 5 % (v/v) of 2-mercaptoethanol (Sigma-

Aldrich) diluted in deionized water. After centrifugation, samples were charged on polyacrylamide-gel. The gel was stained with a solution 25 % (w/v) of Coomassie® G-250 blue brilliant colorant diluted in methanol at 50 % (w/w) (Sigma-Aldrich) and 10 % of acetic acid (Fluka). Coloration was stopped with a 5 % (w/w) methanol (Sigma-Aldrich) and 10 % (w/w) acetic acid solution (Fluka). Broad Range (BioRad) were used as molecular weight markers SDS-PAGE Molecular Weight Standards.

Further characterisation was performed by running zymograms at several temperatures. For these analysis, SDS-PAGE was performed as previously mentioned, but using polyacrylamide gels at 10% and without heating samples before the electrophoretic analysis. Samples were analysed in duplicate using the same conditions, treating one of them as previously described, and leaving the other to released all SDS in Tris-HCl buffer 20 mM pH 8.0 so to renaturised the protein (and reactivate it). These renatured bands were afterwards incubated with 10 mL pNPG 10 mM in citrate buffer 100 mM pH 5 at several times (5, 10, 15 y 20 minutes) and at 37°C in an to-and-fro agitated platform. After washing, gels were immersed in

buffer glycine-NaOH 400 mM pH 10.8 to get them stained with a yellow color if β -glucosidase activity was present in a given band.

Finally, retrieved bands showing BG activity were subjected to further analysis by MALDI-TOF techniques (peptide mass fingerprinting), using a first fragmentation (only one mass spectroscopy -MS- analysis) or double fragmentation of given peptides (MS/MS) in a 4800 Proteomics Analyzer (AB SCIEX). Fragments in the first case were compared to SwissProt without taxonomic restriction database (Spall) and to the NCBI database restricted to fungi.

2.2. Enzymatic hydrolysis experiments

Firstly, activity of the enzymatic preparation was determined by measuring the 4-nitrophenol (pNP, Sigma-Aldrich) released during the hydrolysis of 4-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (pNPG), following the procedure described by Verma et al. (2013) with some modifications (Verma et al., 2013a). Enzyme activity was determined in a 300 μ L incubation mixture containing the enzyme and 5 mM pNPG in 100 mM citrate buffer pH 5.0 for 10 minutes at 40°C. The reaction was stopped by the addition of 100 μ L

of 0.5 N NaOH, and the final volume was transferred to a microtiter plate with 96 samples well (Thermo Scientific). Then the absorbance at 405 nm was recorded using a Rayto RT-6100 microplate reader, thus allowing the estimation of the concentration of pNP from a calibration curve obtained under the same assay conditions. All measurements were carried out by triplicate and the maximum error was below 5%. In the assays, the enzymatic preparation was diluted in order to check that the change in absorbance at 405 nm was linear during the selected reaction time. One international activity unit (IU) was defined as the amount of enzyme producing 1 μ mol/min of pNP under the assay conditions described above.

On the other hand, commercial cellobiose (Sigma-Aldrich) was also employed as substrate, at different initial concentrations. A 50 mM citrate buffer 4.9 was used to maintain the pH level constant. Unless otherwise stated, enzyme dosage employed for all experiments was 5.23 U \cdot mL⁻¹ (0.25 g \cdot L⁻¹). Experiments were performed in 50 mL Erlenmeyer flasks, with a working volume of 20 mL, ensuring that they remained closed throughout experimentation work using a rubber plug. Samples (0.5 mL) were collected

at initial time, 5, 15, 30 and 60 minutes after enzyme addition. Temperature was kept constant using a water bath, with and agitation of 150 rpm for all experiments, unless otherwise stated.

2.3. Analytical methods

Cellobiose and glucose were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) equipped with a refraction index detector (RID) using an Agilent 1100 series, with a Rezex RHM-Monosaccharide H⁺ (8%) column (150mm x 7.88mm) supplied by Phenomenex. The column was kept at 80 °C, and RID detector at 55 °C and the mobile phase used was a sulphuric acid (H₂SO₄) solution (1.1 mM) at 0.6 ml min⁻¹. Commercial glucose and cellobiose (Sigma-Aldrich) were used for calibration purposes.

2.4. Mathematics and calculations

Results were expressed in terms of cellobiose conversion (X_C), which was calculated employing the following equation:

$$X_C = \frac{C_{S0} - C_{St}}{C_{S0}} = \frac{C_{Pt}}{2 \cdot C_{S0}} \quad (1)$$

where C_{St} is the cellobiose concentration and C_{Pt} is the glucose concentration at each experimental time, while C_{S0} is the initial cellobiose concentration (all them expressed in g·L⁻¹). In order to diminish experimental error and simplify further

calculations, temporal evolution of C_{Pt} was smoothed adjusting experimental results to an adequate hyperbolic function (interpolation function), using OriginPro 9.0 software.

Considering that only one reaction occurs (cellobiose hydrolysis into glucose), the reaction rate can be described in terms of cellobiose disappearance rate, as follows:

$$r = \frac{R_P}{(2)} = \frac{1}{2} \frac{dC_P}{dt} = - \frac{dC_S}{dt} = \frac{R_S}{(-1)} \quad (2)$$

To calculate the cellobiose consumption rate, numerical differentiation was carried out employing OriginLab software. Aspen Custom Modeler® v9.0 software was employed to adjust every kinetic model tested in this work to experimental results. For validation of the different calculated models and to calculate the goodness of fit achieved, several statistical parameters were evaluated. These parameters are both integral and, therefore, referred to glucose concentration (Fisher's F, Akaike's information criterion-AIC-, sum of residuals -SQR- and its root referred to the degrees of freedom -RMSE-) or to its evolution with time (VE, the percentage of explained variance).

Firstly, Fischer's F was determined employing equation (3). F value is based on a null hypothesis that

advocates for the adequacy of the model to the observed values of the measured value.

$$F = \frac{\sum_{i=1}^N \frac{(y_{i,calc})^2}{P}}{\sum_{i=1}^N \frac{SQR}{N-P}} \quad (3)$$

Where N is the number of experimental data, P the number of parameters and SQR is the sum of quadratic residues:

$$SQR = \sum_{i=1}^N (y_{i,exp} - y_{i,calc})^2 \quad (4)$$

Another statistical parameter used in this work was the residual mean square error (RMSE), which measures the difference of the predicted values of the variable and the experimental observations (Esteban et al., 2015), and it can be defined by the following equation:

$$RMSE = \sqrt{\frac{SQR}{N-P}} \quad (5)$$

As a representative of information criteria, the most classical one was used: Akaike's information criterium (AIC). As all information criteria (and the previous parameters shown in this annex), AIC serves to compare the quality of fit of a model to a given set of data, indicating, as other information criteria, the information lost due to the use of the model to represent the reality. In doing so, AIC takes into account the complexity of the model expressed as degrees of freedom: the difference between the number of data

and the number of estimated parameters in the model. AIC is shown by the next equation:

$$AIC = N \cdot \ln\left(\frac{SQR}{N}\right) + 2 \cdot K \quad (6)$$

Finally, the goodness of the fit can be evaluated with the percentage of variation explained (VE), a differential parameter that is based on the percentage of the trend of the dependent variable with the independent one. This parameter can be described with the following equations:

$$VE = 100 \cdot \left(1 - \frac{\sum_{i=1}^L SSQ_1}{\sum_{i=1}^L SSQ_{mean_1}}\right) \quad (7)$$

$$SSQ_1 = \sum_{i=1}^N \frac{(y_{i,exp} - y_{i,calc})^2}{y_{i,calc}^{\gamma_1}} \quad (8)$$

$$SSQ_{mean_1} = \sum_{i=1}^N \frac{(y_{i,exp} - \bar{y}_{i,calc})^2}{y_{i,calc}^{\gamma_1}} \quad (9)$$

Where γ_1 is the heteroscedasticity parameter, a measure of the type of error in the measured variable, fixed by default by Aspen Custom Modeler in 1 (Esteban et al., 2015).

3. RESULTS and DISCUSSION

3.1. Enzyme preparation characterization

The protein content of the preparation studied in this work as evaluated by the Bradford method was 63.3 mg_{protein}·mL_{preparation}⁻¹. Also, the activity of this preparation using standard analysis with pNPG was 1326

IU·mL_{preparation}⁻¹. Combining both factors, the specific activity is estimated to be 20.9 IU·mg_{protein}⁻¹. Regarding the electrophoretic profile, all proteins content in studied preparation have a molecular weight between 23 and 114 kDa (see Figure 1), according to the molecular weight standard used.

Further analysis by activity measurements at several reaction time values in separated bands (zymograms) permitted to detect that the band at 94 kDa showed BG activity (after correcting for temperature, as SDS-PAGE and zymograms are performed at different temperatures and this variable affects protein migration in electrophoresis). Several bands showing BG activity were separated from the gel and analysed by MS and MS-MS analysis (protein fingerprinting), showing a notable match in NCBI and SwissProt Databases to a β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, la BGL3 (Score: 88% and 77% in both databases). Subsequent fragmentation of the two majoritary peptides (molecular weights: 2892.4 and 3400.6 Da) in a secondary mass spectrometric analysis confirmed this extreme (data showed in supplementary material). This enzyme, present in ASA 1000 preparation, shows an optimal performance at 50 °C and

pH 6.0, withstanding temperatures as high as 60 °C (Liu et al., 2012).

3.2. Kinetic model determination

In order to determine a valid kinetic model, it is necessary to employ a robust methodology to discriminate between all possible models that could explain the dynamic behaviour of the studied system. A good robust strategy in the kinetic model parameter estimation methodology for enzymatic reaction is the one proposed by Al-Haque et al., where the initial rate approach is used for k_{cat} and K_M determination, while the progress curve strategy is utilized to estimate the inhibition or inhibitions constants, finally optimising all parameters by using their initial estimates and all available experimental data for a final non-linear regression coupled to numerical integration (Al-Haque et al., 2012). Based on this work, a working scheme has been proposed to select the most proper kinetic model, calculate its parameters and validate the results achieved (see Figure 2).

Initially, it is necessary to gather as much information as possible about applied kinetics and kinetic modelling for BG based cellobiose hydrolysis reactions previously published in literature. According to the models shown in Table 1, it can be assumed

that the basic kinetic model for BG enzymes hydrolysis of cellobiose is a Michaelis-Menten equation, as shown in equation (10) for the initial reaction rate r_0 :

$$r_0 = \frac{1}{(-1)} \frac{dC_S}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot C_E \cdot C_S}{K_M + C_S} \quad (10)$$

where k_{cat} is the hydrolysis kinetic constant, C_E is the enzyme preparation concentration, and K_M is the Michaelis-Menten constant for cellobiose. The latter is an indicator of the affinity of the enzyme for the substrate, since, in several cases, it can be regarded as the inverse of the adsorption equilibrium constant for the substrate. Additionally, most of the works retrieved shown that both substrate (cellobiose) and product (glucose) are able to exert a negative influence on the enzymatic hydrolysis rate. There are three different inhibition mechanisms for BG enzyme reactions described in literature: competitive, uncompetitive and non-competitive inhibitions.

In order to determine a possible inhibition of the BG studied on this work, several experiments have been carried out, employing the methodology described in Figure 2, and developed by Al-Haque et al. (Al-Haque et al., 2012).

3.2.1. Application of the differential or reaction rate method

First, influence of initial amount of preparation was assessed in order to obtain enzyme concentration effect over reaction rate. For this purpose, several experiments were carried out varying enzymatic preparation concentration, from 0.1 to 0.5 $\text{g}_{\text{preparation}} \cdot \text{L}^{-1}$, at an initial concentration of cellobiose of 0.029 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). In Figure 3A, initial reaction rate results, achieved after derivation, are shown. As can be seen, there is a lineal dependence between r_0 and the enzyme activity or concentration, C_E .

Secondly, substrate inhibition was evaluated in order to determine the inhibition kinetic mechanism. To evaluate this inhibition, different initial cellobiose concentrations were tested, ranging from 0.008 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (2.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) to 0.086 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), at a constant temperature of 50 °C. Results achieved are shown in terms of initial reaction rate *versus* initial cellobiose concentration in Figure 3B. As can be deduced from this figure, the evolution of the initial reaction rate when substrate augments responds to an evolution defined by a non competitive substrate inhibition. Firstly, cellobiose concentration provokes an increase of the initial reaction rate up to a

maximum is reached, beyond which r_0 decreases steadily to an asymptotic value. These results indicate that it is necessary to take into account substrate acompetitive inhibition, which has also been implemented in many of the works dealing with kinetic modelling of this particular process (Bravo et al., 2001; Corazza et al., 2005; Hong et al., 1981; Resa and Buckin, 2011).

With these result in mind, an initial value of the kinetic parameters were determined using a simple response nonlinear multiple regression, using equation (11) to adjust initial reaction rate to initial substrate concentration.

$$r_0 = \frac{k_{cat} \cdot C_E \cdot C_{S0}}{K_M + C_{S0} \cdot \left(1 + \frac{C_{S0}}{K_i}\right)} \quad (11)$$

Also, k_{cat} as is a purely kinetic constant, and it is highly influenced by temperature according to the Arrhenius equation. Consequently, k_{max} can be defined as it is shown on equation (12).

$$k_{cat} = k_{cat0} \cdot e^{\frac{-E_{kcat}}{R \cdot T}} \quad (12)$$

The results of that adjustment, performed with Aspen Custom Modeler ®, are shown on Figure 4 as well. Despite of the big calculation error associated to differential method, it can be assured that the fitting of the experimental data is good enough to determine a preliminar value for the kinetical parameters k_{cat0} , E_{kcat} , K_M and

K_i , established at $1.8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, $1.6\cdot 10^4 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, 4.2 mM and 0.13 mM , respectively. The value obtained for K_M is in accordance with different works present in literature (Resa and Buckin, 2011).

Finally, to analyse the effect of the product in the reaction rate, several experiments at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ were carried out at several initial glucose concentrations from 0.004 to $0.108 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (2 to $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). As may be seen in the results shown in Figure 3B, initial glucose content exerts a clearly negative effect on initial reaction rate. With only $0.004 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of glucose, reaction rate decreases to $0.001 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Consequently, the selected model must take into account glucose inhibition, a phenomenon usually considered in the relevant scientific literature (Bravo et al., 2001; Corazza et al., 2005; Hong et al., 1981; Lebaz et al., 2016; Resa and Buckin, 2011; Tsai et al., 2014; Wang et al., 2012).

3.2.2. Integral method calculation

Taking into account all the information retrieved from bibliography and our previous experimental results, it is possible to propose several kinetic models able to explain the system evolution found in experimental results. For the formulation of these

kinetic models, several assumptions have been taken into account, namely:

- Temperature has no significant effect into substrate and product inhibition for the narrow interval of temperatures herein studied, as well as for the parameter K_M , which has been established as constant in the temperature values studied.
- For initial values of the parameter, the results achieved in differential calculation was employed in order to gain more robustness in the determination of the parameters, using the methodology previously described in this work.

In order to obtain a robust and interpolable model and validate it, several experiments were performed at different temperatures, with the objective of evaluating the fluctuation of the kinetic parameters with temperature. Bearing this idea in mind, the results achieved in the substrate inhibition experiments were compared to runs realized at two different temperatures, 40 and 45 °C. Cellobiose initial content were fixed at the same values for each run that in the experiments previously carried out at 50 ° C to determine the influence of temperature.

Further important consideration for this study is the dimension relates to the morphology of the enzyme. According to the different studies focused on the BG derived from *Trichoderma* strains, the size of the enzymatic active center allows to accommodate up to five glucose molecules (Ahmad Khairudin and Mazlan, 2013; Kim et al., 2006). Therefore, more than one molecule of product can hold inhibition effects by means of a competitive inhibition mechanism. Subsequently, various different kinetic models based on a competitive inhibition mechanism due to the product can be proposed, as displayed in Table 2. Model fitting to experimental progress curves was carried out employing Aspen Custom Modeler software, and the results obtained for each model are also collected in Table 2.

The achieved results evidence that there are several kinetic models which are not valid to describe the enzymatic reaction studied in this work. For instance, the model assuming that the inhibition mechanism for the product is a competitive inhibition (PAC) presents invalid kinetic parameters (with value or confidence interval including zero values for these parameters) and fits poorly to experimental data (has the lowest VE and F values and the greatest

RMSE and AIC values). Similar results are obtained for the model where the inhibition of glucose is considered to be caused by a competitive mechanism with four glucose molecules involved (PC4). In this kinetic model, the parameter v_{max0} has a negative value, which is not acceptable from a physicochemical point of view.

Furthermore, a first glimpse into all the other kinetic models indicates that all them are valid kinetic models to be fitted to data contained in this work. However, statistical goodness-of-fit criteria allow discriminating among these models. Although one of the best models is the non-competitive inhibition of the product (glucose), statistical parameters obtained for this model are slightly worse than those achieved for the models in which the product inhibition is of the competitive type. All these criteria point out that the most probable mechanism for product inhibition for the studied enzymatic reaction is the competitive inhibition, a fact also remarked in many other works found in bibliography for enzymatic reactions of other BGs (see Table 1).

Once the type of inhibition is defined, in view of the active site morphology of the studied enzyme, it is necessary to define if the inhibition effect is caused by a single glucose unit, or by more

than one. As previously discussed, the model PC4 was invalid, due to the negative value of one of its kinetic parameters. To choose the best kinetic model among the remaining three models, statistical parameters were compared using Figure 5, in which VE and F are represented *versus* the number of glucose involved on enzymatic hydrolysis inhibition process. Observing this figure, it is evident that the most satisfactory model, with the highest value both of F and VE, is the one considering that two glucose units exert inhibition effect upon enzymatic reaction rate (PC2) (a model that also retrieves the lowest value, most negative, for the Akaike information criterium, AIC). Actually, it is reasonable to indicate that two or more units of glucose bind to the active center of the enzyme, since all the kinetic models with more than one binding glucose have a better value for the goodness-of-fit statistical parameters.

According to Ahmad Khairuding and Mazlan (2015), GH1 β -glucosidases are able to profoundly interact with glucose reducing moieties in cello-oligosaccharides, mostly with the first three ones starting from the reducing end (and less with the fourth and subsequent reducing units). As the

cleaving action of the enzyme takes place between the non-reducing glucose (glycone moiety) and the first unit in the reducing oligosaccharide (aglycon subsite), it is evident that the interaction between the substrate and the active center is due to the aglycon subsite. The higher the number of glucose units in this part of the celooligosaccharide, the more intense this interaction becomes in these active centres with multiple consecutive binding subsites, up to three or four glucose moieties, depending on the enzyme source (Saha and Bothast, 1996; Saha et al., 1994). In recent years, a great deal of research is being performed on the quest for new β -glucosidases that have low inhibition due to glucose or, even, activation by this monosaccharide. Insights into their action suggests that glucose binding to sites along the active center, near or far from the catalytic zone, is responsible for such behaviours, including reasons why glucose acts as a competitive inhibitor, such as the fact that it also binds near this zone, competing with cellobiose for it (Yang et al., 2015). However, following this argument, it is evident that the active center is ample and can allocate more than one glucose in the vicinity of the catalytic zone. Thus, there are several mechanistic

reasons that could explain competitive inhibition by more than one molecule of glucose (Ahmad Khairudin and Mazlan, 2015). In fact, in the case of β -D-xylosidase from *Selenomonas ruminantium*, it is reported that the ample, single-access, two subsites, active centre, can accommodate two molecules of competitive inhibitors; D-ribose, D-arabinose, D-erythrose, and L-arabinose act as double-binding inhibitors, binding in both subsite simultaneously (D-ribose and D-arabinose), with no inhibition due to substrates. In comparison, L-arabinose and D-erythrose are double- and single-binding non-competitive inhibitors and, when they are present, substrates can act as a competitive inhibitors (Jordan and Braker, 2007; Jordan and Wagschal, 2010; Jordan et al., 2013).

Finally, to validate the selected kinetic model (PC2), experimental data *versus* modelled data were compared on Figures 6A (corresponding to experiments carried out at 40 °C), 6B (experiments with temperature of 45 °C) and 6C (whose temperature was fixed at 50 °C). It is obvious, from this figure, that the model reproduces with great precision the experimental data, for all evaluated initial cellobiose concentration at every tested temperature, which indicates that the

specified model (PC2) has sufficient robustness in the tested interval.

To describe the full action of enzymes of the cellulase complex, kinetic equations of this type should be coupled to others for the action of glucanases, enzymes that act mainly on cellulose, a solid substrate, to depolymerise it (endoglucanases) and to reduce the molecular weight of elemental chains of cellulose by producing cellobiose from the chain ends (cellobiohydrolases or exoglucanases) (Jeoh et al., 2017). In the end, kinetic models should aid to the design and control of saccharification processes, specially when aiming to high glucose concentration, which needs of a high-solid content either working in batch or fed-batch conditions (Hodge et al., 2008).

4. CONCLUSIONS

A BG preparation from *Aspergillus fumigatus* was partially characterised and tested for cellobiose hydrolysis. The reaction rate stage for kinetic model discrimination demonstrates that the most probable mechanism for this enzymatic hydrolysis is an acompetitive substrate inhibition and competitive product inhibition. Finally, five different kinetic model were fitted by using the progress curve method to

numerous experimental results, the best of which, based on statistical criteria, implies a competitive substrate inhibition and double competitive product inhibition.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by MINECO under contracts CTQ2013-45970-C2-1-R, PCIN-2013-021-C02-01 and BSCH-UCM, GR35/10-A 910134.

6. CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

7. BIBLIOGRAPHY

- Aditiya, H.B., Mahlia, T.M.I., Chong, W.T., Nur, H., Sebayang, A.H., 2016. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66, 631-653.
- Ahmad Khairudin, N.B., Mazlan, N.S., 2013. Molecular docking study of beta-glucosidase with cellobiose, cellotetraose and cellotriose. *Bioinformation* 9, 813-817.
- Ahmad Khairudin, N.B., Mazlan, N.S., 2015. Binding mode study of cellopentaose in β -glucosidase B via

- docking simulation. *Journal of Engineering Science and Technology* 10, 86-95.
- Al-Haque, N., Santacoloma, P.A., Neto, W., Tufvesson, P., Gani, R., Woodley, J.M., 2012. A robust methodology for kinetic model parameter estimation for biocatalytic reactions. *Biotechnology progress* 28, 1186-1196.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bravo, V., Páez, M.P., Aoulad, M., Reyes, A., García, A.I., 2001. The Influence of pH upon the kinetic parameters of the enzymatic hydrolysis of cellobiose with Novozym 188. *Biotechnology progress* 17, 104-109.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B., 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic acids research* 37, D233-238.
- Corazza, F., Calsavara, L., Moraes, F., Zanin, G., Neitzel, I., 2005. Determination of inhibition in the enzymatic hydrolysis of cellobiose using hybrid neural modeling. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 22, 19-29.
- Choi, S., Song, C.W., Shin, J.H., Lee, S.Y., 2015. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. *Metabolic Engineering* 28, 223-239.
- Esteban, J., Fuente, E., Blanco, A., Ladero, M., Garcia-Ochoa, F., 2015. Phenomenological kinetic model of the synthesis of glycerol carbonate assisted by focused beam reflectance measurements. *Chemical Engineering Journal* 260, 434-443.
- Gupta, A., Verma, J.P., 2015. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 41, 550-567.
- Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K.Y., Ishii, J., Kondo, A., 2013. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource Technology* 135, 513-522.
- Hodge, D.B., Karim, M.N., Schell, D.J., McMillan, J.D., 2008. Model-Based Fed-Batch for High-Solids Enzymatic Cellulose Hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 152, 88.
- Hong, J., Ladisch, M.R., Gong, C.S., Wankat, P.C., Tsao, G.T., 1981. Combined product and substrate inhibition equation for cellobiase.

- Biotechnology and Bioengineering 23, 2779-2788.
- Hosseini, S.A., Shah, N., 2011a. Enzymatic hydrolysis of cellulose part II: Population balance modelling of hydrolysis by exoglucanase and universal kinetic model. *Biomass and Bioenergy* 35, 3830-3840.
- Hosseini, S.A., Shah, N., 2011b. Modelling enzymatic hydrolysis of cellulose part I: Population balance modelling of hydrolysis by endoglucanase. *Biomass and Bioenergy* 35, 3841-3848.
- Jeoh, T., Cardona, M.J., Karuna, N., Mudinoor, A.R., Nill, J., 2017. Mechanistic kinetic models of enzymatic cellulose hydrolysis—A review. *Biotechnology and Bioengineering* 114, 1369-1385.
- Jordan, D.B., Braker, J.D., 2007. Inhibition of the two-subsite β -D-xylosidase from *Selenomonas ruminantium* by sugars: Competitive, noncompetitive, double binding, and slow binding modes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 465, 231-246.
- Jordan, D.B., Wagschal, K., 2010. Properties and applications of microbial β -D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 1647-1658.
- Jordan, D.B., Wagschal, K., Grigorescu, A.A., Braker, J.D., 2013. Highly active β -xylosidases of glycoside hydrolase family 43 operating on natural and artificial substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 4415-4428.
- Ketudat Cairns, J.R., Esen, A., 2010. β -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67, 3389-3405.
- Kim, D., Park, B.H., Jung, B.W., Kim, M.K., Hong, S.I., Lee, D.S., 2006. Identification and molecular modeling of a family 5 endocellulase from *Thermus caldophilus* GK24, a cellulolytic strain of *Thermus thermophilus*. *International Journal of Molecular Sciences* 7, 571-589.
- Lebaz, N., Cockx, A., Spérandio, M., Liné, A., Morchain, J., 2016. Application of the Direct Quadrature Method of Moments for the modelling of the enzymatic hydrolysis of cellulose: I. Case of soluble substrate. *Chemical Engineering Science* 149, 306-321.
- Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Zhang, Z., Song, S., Miao, Y., Shen, Q., 2012. Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. *Microbial Cell Factories* 11, 25.

- Resa, P., Buckin, V., 2011. Ultrasonic analysis of kinetic mechanism of hydrolysis of cellobiose by β -glucosidase. *Analytical Biochemistry* 415, 1-11.
- Saha, B.C., Bothast, R.J., 1996. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. *Applied and environmental microbiology* 62, 3165-3170.
- Saha, B.C., Freer, S.N., Bothast, R.J., 1994. Production, purification, and properties of a thermostable beta-glucosidase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *Applied and environmental microbiology* 60, 3774-3780.
- Singh, G., Verma, A.K., Kumar, V., 2015. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. *3 Biotech* 6, 3.
- Tamaki, F.K., Araujo, É.M., Rozenberg, R., Marana, S.R., 2016. A mutant β -glucosidase increases the rate of the cellulose enzymatic hydrolysis. *Biochemistry and Biophysics Reports* 7, 52-55.
- Tsai, C.-T., Morales-Rodriguez, R., Sin, G., Meyer, A.S., 2014. A dynamic model for cellulosic biomass hydrolysis: a comprehensive analysis and validation of hydrolysis and product inhibition mechanisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172, 2815-2837.
- Verma, M.L., Chaudhary, R., Tsuzuki, T., Barrow, C.J., Puri, M., 2013a. Immobilization of β -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: Application in cellobiose hydrolysis. *Bioresource Technology* 135, 2-6.
- Verma, M.L., Puri, M., Barrow, C.J., 2016. Recent trends in nanomaterials immobilised enzymes for biofuel production. *Critical Reviews in Biotechnology* 36, 108-119.
- Verma, M.L., Rajkhowa, R., Wang, X., Barrow, C.J., Puri, M., 2013b. Exploring novel ultrafine Eri silk bioscaffold for enzyme stabilisation in cellobiose hydrolysis. *Bioresource Technology* 145, 302-306.
- Waeonukul, R., Kosugi, A., Prawitwong, P., Deng, L., Tachaapaikoon, C., Pason, P., Ratanakhanokchai, K., Saito, M., Mori, Y., 2013. Novel cellulase recycling method using a combination of *Clostridium thermocellum* cellulosomes and *Thermoanaerobacter brockii* β -glucosidase. *Bioresource Technology* 130, 424-430.
- Wang, G., Post, W.M., Mayes, M.A., Frerichs, J.T., Sindhu, J., 2012. Parameter estimation for models of ligninolytic and cellulolytic enzyme

kinetics. *Soil Biology and Biochemistry* 48, 28-38.

Yang, Y., Zhang, X., Yin, Q., Fang, W., Fang, Z., Wang, X., Zhang, X., Xiao, Y.,

2015. A mechanism of glucose tolerance and stimulation of GH1 beta-glucosidases. *Scientific reports* 5, 17296.

8. TABLES AND FIGURES CAPTIONS

Table 1. Kinetic models for the hydrolysis of cellobiose by α -glucosidases proposed in literature

Table 2. Kinetic and statistical parameters achieved in the fitting of the kinetic model

Figure 1. Leftside image: Electroforetic profile of enzymatic preparation: Profile 1 corresponds to the sample (the band that shows activity in BG SDS-PAGE zymograms- is within a red arrow); Profile 2 corresponds to protein standards (known molecular weight proteins, ordered from highest to lowest: myosin, β -galactosidase, phosphorylase b , bovine serum albumin, ovoalbumin, carbonic anhydrase, trypsin soybean inhibitor and lysozyme). Rightside image: Peptide fingerprinting MS result. MW for the analysed protein is 94009 Da, showing a perfect match for 12 peptides with protein code gi|323473065 in NCBI database: the α -glucosidase BGL3 from *Aspergillus fumigatus*.

Figure 2. Scheme of methodology employed for kinetic model determination

Figure 3. A) Initial reaction rate versus enzyme preparation concentration
B) Initial reaction rate versus glucose initial concentration

Figure 4. Initial reaction rate versus initial cellobiose concentration: Experimental data (black filled circles for 40 °C, black empty circles for 45 °C and black filled triangles for 50 °C) and results calculated with PC2SA model (straight line for 40 °C, dashed line for 45 °C and pointed line for 50 °C)

Figure 5. F-value and VE parameters of competitive models proved in this article, with 1 glucose molecule binding to enzyme active center (PC1SA), 2 glucose molecules per active center (PC2SA), 3 glucose molecules per active center (PC3SA) and 4 glucose molecules per active center (PC4SA)

Figure 6. Experimental conversion *versus* modelled conversion for runs at several temperatures (A) 40 °C, (B) 45 °C and (C) 50 °C, with different initial cellobiose concentrations: 2.5 g·L⁻¹ (■, fitting curve 1), 5.0 g·L⁻¹ (□, fitting curve 2), 7.5 g·L⁻¹ (●, fitting curve 3), 10 g·L⁻¹ (○, fitting curve 4), 15 g·L⁻¹ (▲, fitting curve 5), 20 g·L⁻¹ (△, fitting curve 6) and 30 g·L⁻¹ (★, fitting curve 7)

Table 1a. Kinetic models for the hydrolysis of cellobiose by β -glucosidases proposed in literature

Author	Enzyme Source	Model type	Equation
(Hong et al., 1981)	<i>Trichoderma viride</i> (Miles Lab.)	SI + CPI + NPI	$r_0 = \frac{V_{\max} \cdot \left(\frac{C_s}{k_i}\right)}{K_M \cdot \left[1 + \frac{C_p}{K_{p,2}}\right] + \left[1 + \frac{C_p}{K_{i,1}}\right] + \frac{C_s}{K_S}} + \frac{C_s}{K_S}$
(Bravo et al., 2001)	<i>Aspergillus niger</i> (Novozymes 188)	SI + CPI + NPI	$r = \frac{V_{\max} \cdot C_s + K'}{K_M + C_s + K_i \cdot C_s + K_i \cdot C_s^2 + K_{IAP} \cdot C_s \cdot C_p}$

Note: Where SI refers to acompetitive substrate inhibition, CPI to competitive product inhibition, NPI to non-competitive product inhibition, BPI to by-product competitive inhibition.

Table 1b. Kinetic models for the hydrolysis of cellobiose by β -glucosidases proposed in literature

Author	(Corazza et al., 2005)	(Wang et al., 2012)	(Resa and Buckin, 2011)
Enzyme Source	<i>Aspergillus niger</i> (Novozymes 188)	Various microorganisms	<i>Aspergillus niger</i> (Novozymes 188)
Model type	6 different inhibitions	CPI	SI+CPI
Equation	Hybrid neural modelling	$v = \frac{V_{\max} \cdot C_s}{K_M \cdot \left(1 + \frac{C_p}{K_P}\right) + C_s}$	$r = \frac{2 \cdot V_{\max} \cdot C_s}{K_M \cdot \left(1 + \frac{C_p}{K_{CP}}\right)^2 + C_s \cdot \left(1 + \frac{C_s}{K_{US}}\right)}$

Note: Where SI refers to acompetitive substrate inhibition, CPI to competitive product inhibition, NPI to non-competitive product inhibition, BPI to by-product competitive inhibition.

Table 1b. Kinetic models for the hydrolysis of cellobiose by β -glucosidases proposed in literature

Author	Enzyme source	Model type	Equation
(Tsai et al., 2014)	<i>Aspergillus niger</i> (Novozymes 188)	CPI + BPI	$r = \frac{k_{3r} \cdot E_{2r} \cdot C_{p2}}{K_{3M} \cdot \left(1 + \frac{C_p}{K_{3IP}} + \frac{C_x}{K_{3IX}}\right) + C_{p2}}$
(Lebaz et al., 2016)	N.S	CPI	$r = \frac{2 \cdot V_{max} \cdot C_s}{K_M \cdot \left(1 + \frac{C_p}{K_{IP}}\right) + C_s}$
(Tamaki et al., 2016)	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf β glY: AF052729)	Michaelis and Menten	$r = k_{cat} \cdot \frac{C_E \cdot C_S}{K_M + C_S}$

Note: Where SI refers to acompetitive substrate inhibition, CPI to competitive product inhibition, NPI to non-competitive product inhibition, BPI to by-product competitive inhibition.

Table 2a. Kinetic and statistical parameters achieved in the fitting of the kinetic model

Model name			PAC	PNC
Kinetic equation			$\frac{dC_G}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot C_E \cdot C_G}{K_M + C_C \cdot \left(1 + \frac{C_C}{K_i} + \frac{C_G}{K_P}\right)}$	$\frac{dC_G}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot C_E \cdot C_G}{K_M \cdot \left(1 + \frac{C_G}{K_P}\right) + C_S \cdot \left(1 + \frac{C_C}{K_i} + \frac{C_G}{K_P}\right)}$
Kinetic parameters	$k_{cat0} (\cdot 10^{-6})$	$[\text{mol} \cdot \text{g}_E^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$	6±5	1.0±0.9
	$E_{kcat} (\cdot 10^{-4})$	$[\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}]$	4.9±0.4	4.0±0.3
	$K_M (\cdot 10^3)$	$[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	N/A*	1.3±0.9
	$K_i (\cdot 10^2)$	$[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	N/A*	56±9
	$K_P (\cdot 10^4)$	$[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	5.9±0.5	0.3±0.2
Statistical parameters	VE (%)		90.44	97.32
	F		39310	103591
	RMSE		13.75	3.85
	AIC		0.083	0.044

Note: Where PAC is acompetitive product inhibition, PNC is non-competitive product inhibition, PC1, PC2, PC3 and PC4 are competitive product inhibition with 1, 2 3 and 4 glucose molecules. N/A refers to kinetics parameters with very high standard errors.

Table 2b. Kinetic and statistical parameters achieved in the fitting of the kinetic model

Model name			PC1	PC2
Kinetic equation			$\frac{dC_G}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot C_E \cdot C_C}{K_M \cdot \left(1 + \frac{C_G}{K_P}\right) + C_C \cdot \left(1 + \frac{C_C}{K_i}\right)}$	$\frac{dC_G}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot C_E \cdot C_C}{K_M \cdot \left(1 + \frac{C_G}{K_P}\right)^2 + C_C \cdot \left(1 + \frac{C_C}{K_i}\right)}$
Kinetic parameters	$k_{cat0} (\cdot 10^{-6})$	$[\text{mol} \cdot \text{g}_E^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$	3±1	1.0±0.7
	$E_{kcat} (\cdot 10^{-4})$	$[\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}]$	4±1	4.8±0.2
	$K_M (\cdot 10^3)$	$[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	1.4±0.8	2.8±0.9
	$K_i (\cdot 10^2)$	$[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	N/A*	8±3
	$K_P (\cdot 10^4)$	$[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	N/A*	5.1±0.4
Statistical parameters	VE (%)		97.10	97.45
	F		45554	109265
	RMSE		4.16	3.66
	AIC		0.045	0.043

Note: Where PAC is acompetitive product inhibition, PNC is non-competitive product inhibition, PC1, PC2, PC3 and PC4 are competitive product inhibition with 1, 2 3 and 4 glucose molecules. N/A refers to kinetics parameters with very high standard errors.

Table 2c. Kinetic and statistical parameters achieved in the fitting of the kinetic model

Model name			PC3	PC4
Kinetic equation			$\frac{dC_G}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot C_E \cdot C_C}{K_M \left(1 + \frac{C_G}{K_P}\right)^3 + C_C \left(1 + \frac{C_G}{K_I}\right)}$	$\frac{dC_G}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot C_E \cdot C_C}{K_M \left(1 + \frac{C_G}{K_P}\right)^4 + C_C \left(1 + \frac{C_G}{K_I}\right)}$
Kinetic parameters	$k_{cat0} (\cdot 10^{-6})$	$[\text{mol} \cdot \text{g}_E^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$	1.0±0.8	3±2
	$E_{kcat} (\cdot 10^{-4})$	$[\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}]$	4.9±0.2	5.0±0.2
	$K_M (\cdot 10^3)$	$[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	30±10	2±1
	$K_I (\cdot 10^2)$	$[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	12±5	20±10
	$K_P (\cdot 10^4)$	$[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	12.9±0.7	22±1
Statistical parameters	VE (%)		96.97	96.73
	F		92346	85706
	RMSE		4.36	4.71
	AIC		0.047	0.048

Note: Where PAC is a competitive product inhibition, PNC is non-competitive product inhibition, PC1, PC2, PC3 and PC4 are competitive product inhibition with 1, 2, 3 and 4 glucose molecules. N/A refers to kinetics parameters with very high standard errors.

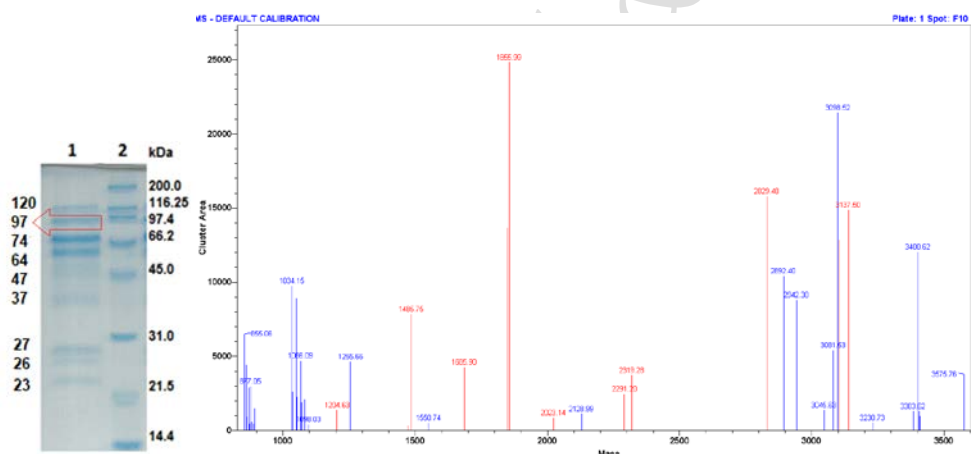


Figure 1. Leftside image: Electroforetic profile of enzymatic preparation: Profile 1 corresponds to the sample (the band that shows activity in BG SDS-PAGE –zymograms- is within a red arrow); Profile 2 corresponds to protein standards (known molecular weight proteins, ordered from highest to lowest: myosin, β -galactosidase, phosphorylase b, bovine serum albumin, ovoalbumin, carbonic anhydrase, trypsin soybean inhibitor and lysozyme). Rightside image: Peptide fingerprinting MS result. MW for the analysed protein is 94009 Da, showing a perfect match for 12 peptides with protein code gi|323473065 in NCBI database: the \square glucosidase BGL3 from *Aspergillus fumigatus*.

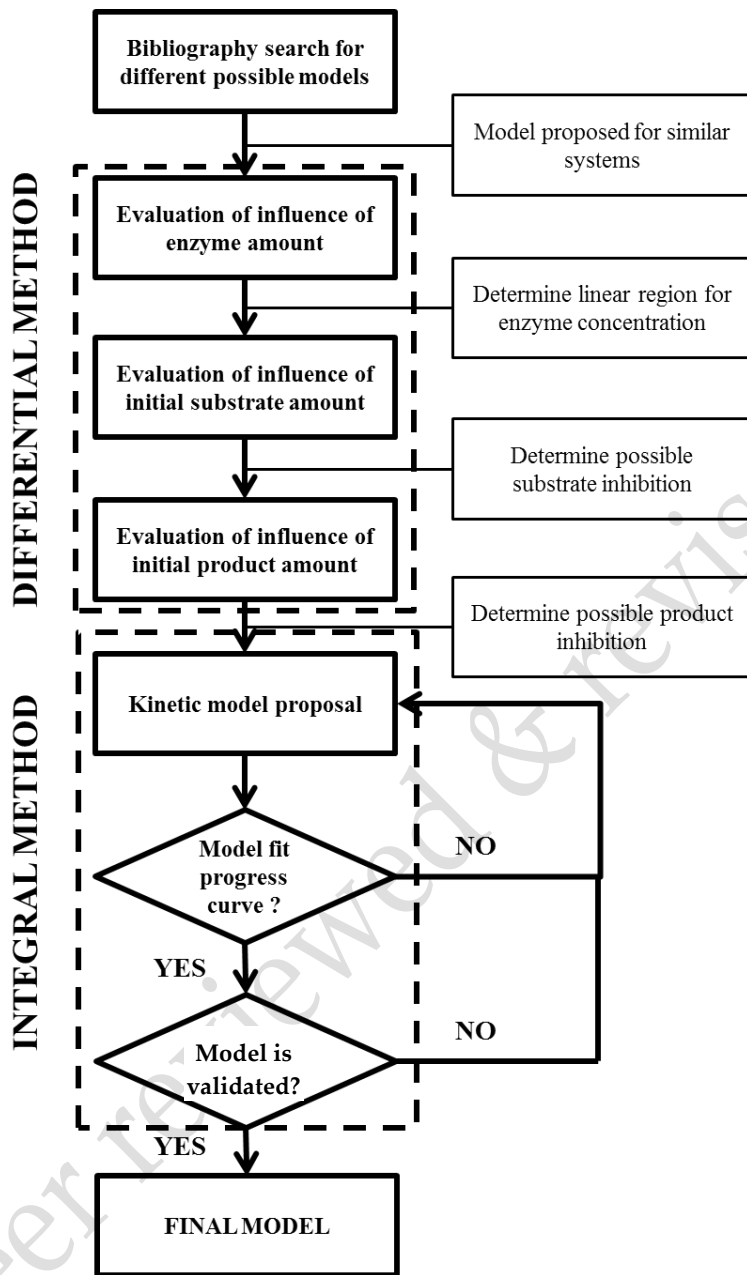


Figure 2. Scheme of methodology employed for kinetic model determination

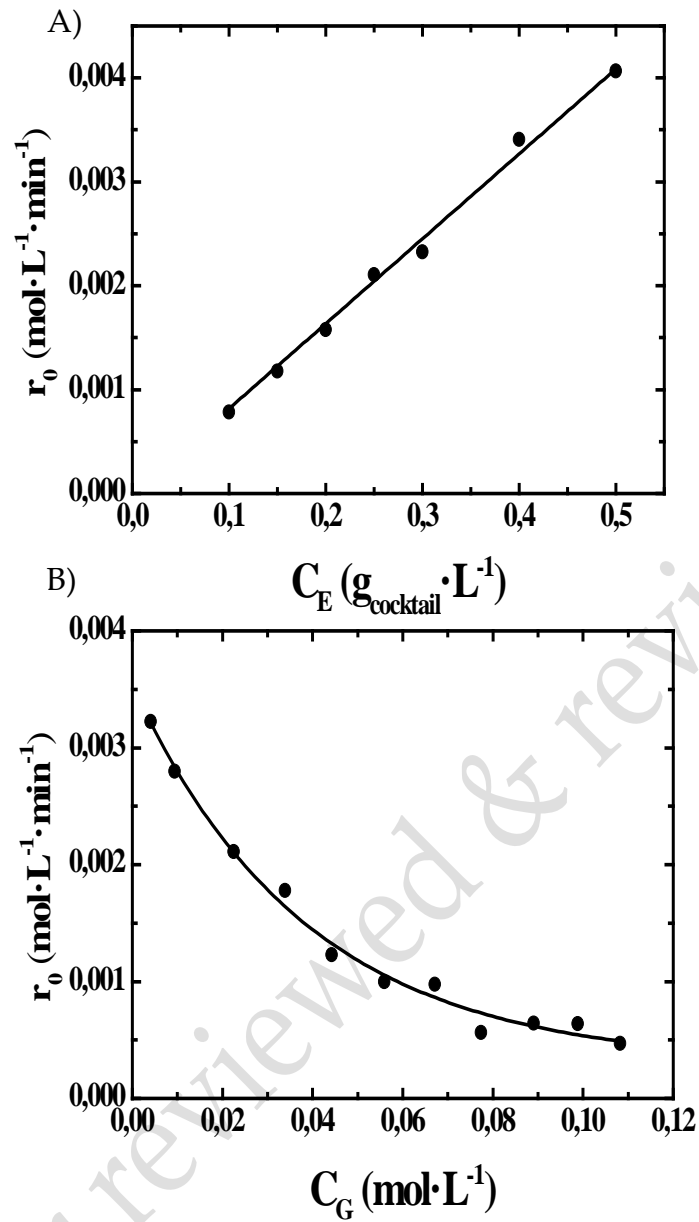


Figure 3. A) Initial reaction rate versus enzyme preparation concentration

B) Initial reaction rate versus glucose initial concentration

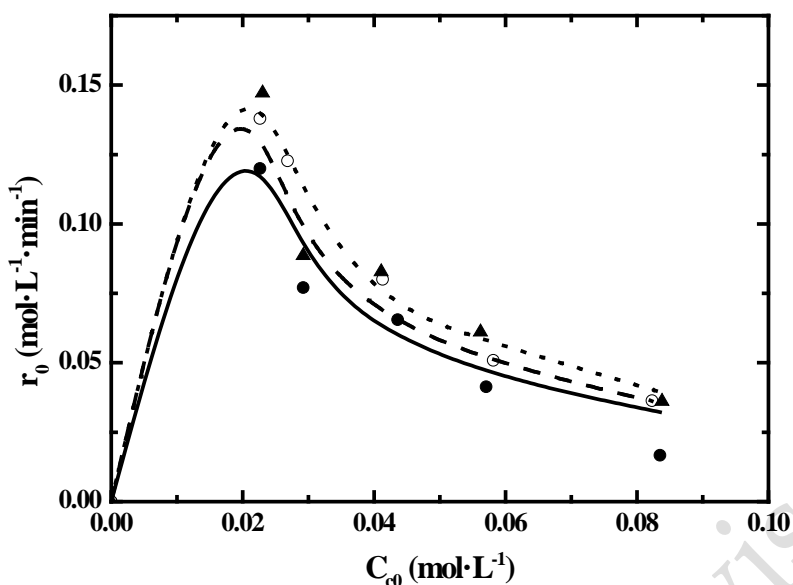


Figure 4.Initial reaction rate versus initial cellobiose concentration: Experimental data (black filled circles for 40 °C, black empty circles for 45 °C and black filled triangles for 50 °C) and results calculated with PC2SA model (straight line for 40 °C, dashed line for 45 °C and pointed line for 50 °C)

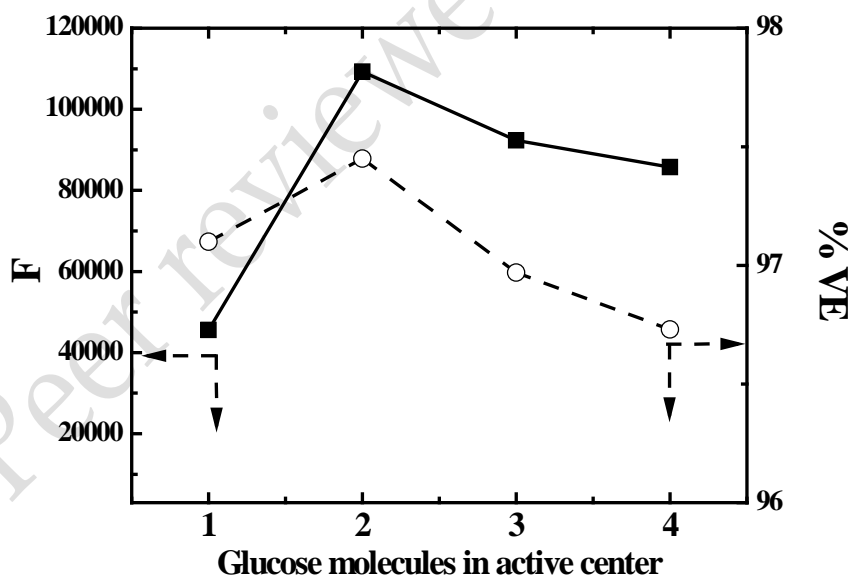


Figure 5.F-value and VE parameters of competitive models proved in this article, with 1 glucose molecule binding to enzyme active center (PC1SA), 2 glucose molecules per active center (PC2SA), 3 glucose molecules per active center (PC3SA) and four glucose molecules per active center (PC4SA).

A)

B)

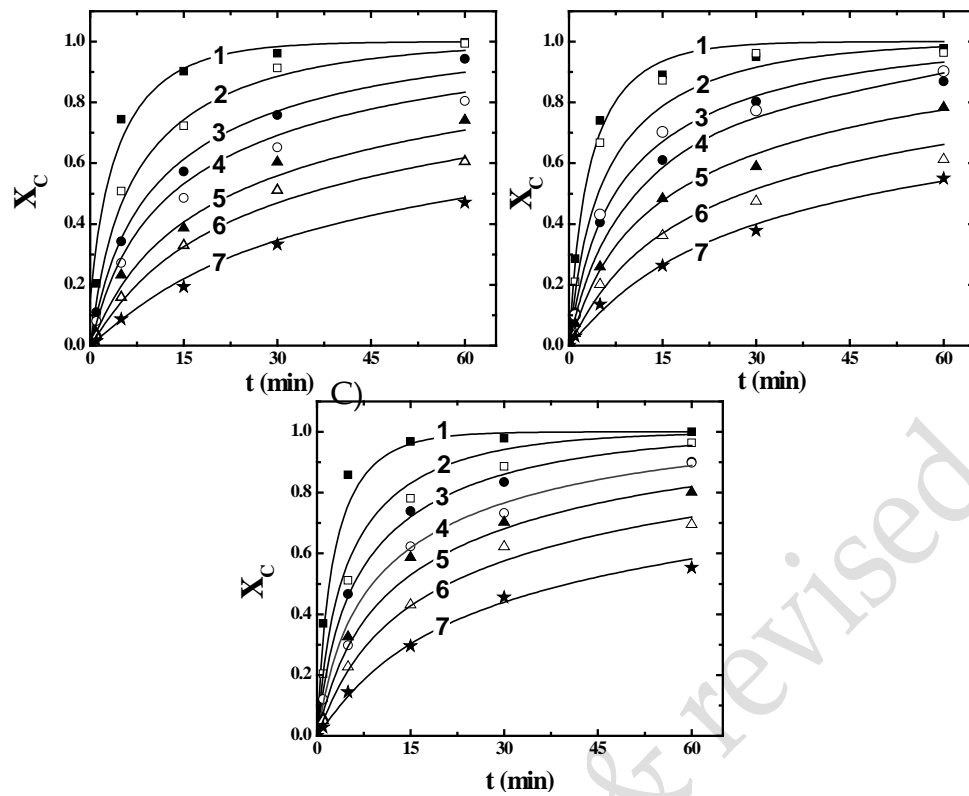


Figure 6. Experimental conversion versus modelled conversion for runs at several temperatures (A) 40 °C, (B) 45 °C and (C) 50 °C, with different initial cellobiose concentrations: 2.5 g·L⁻¹ (■, fitting curve 1), 5.0 g·L⁻¹ (□, fitting curve 2), 7.5 g·L⁻¹ (●, fitting curve 3), 10 g·L⁻¹ (○, fitting curve 4), 15 g·L⁻¹ (▲, fitting curve 5), 20 g·L⁻¹ (△, fitting curve 6) and 30 g·L⁻¹ (★, fitting curve 7)

Publicación 5

Autores: Mateusz Wojtusik, Priscilla Vergara, Juan Carlos Villar, Félix García-Ochoa, Miguel Ladero.

Título: Study of thermal and operational deactivation of *Aspergillus fumigatus* β -glucosidase in ethanol/water pre-treated wheat straw saccharification.

Revista: Chemical Engineering Research and Design (2018)

Índice de impacto: 2.538

Categoría: Ingeniería química

Resumen: En este trabajo, se midió el efecto que poseía sobre la actividad y estabilidad de una preparación enzimática de β -glucosidasas procedentes de *Aspergillus fumigatus* cuyo modelo cinético para la hidrólisis de celobiosa fue determinado en la publicación anterior. Con el objetivo de ampliar el modelo anteriormente descrito, se estudió la cinética de desactivación enzimática con la temperatura, midiendo la actividad a través de un sustrato colorimétrico específico de la enzima (pNPG). Se obtuvo un modelo de desactivación parcial de primer orden, con una actividad asintótica β . Empleando este modelo de desactivación para describir la evolución de la concentración de la enzima, el modelo previamente descrito fue ampliado para temperaturas de entre 40 y 70 °C, cumpliéndose además todos los criterios estadísticos y termodinámicos necesarios. Además, se probó la estabilidad de la enzima en condiciones reales de hidrólisis enzimática de sólido lignocelulósico (paja de trigo pre-tratada por disolución con etanol-agua ácida, suministrada por el INIA), llegándose a la conclusión de que la presencia del sólido contribuye a la estabilización de la actividad del cóctel, si bien se produce una pequeña pérdida de actividad inicial.

Thermal and operational deactivation of *Aspergillus fumigatus* β -glucosidase in ethanol/water pretreated wheat straw enzymatic hydrolysis

Mateusz Wojtusik^a, Priscilla Vergara^b, Juan C. Villar^b, Felix Garcia-Ochoa^a, Miguel Ladero^{*,a}

^aChemical Engineering Department. Faculty of Chemistry. Universidad Complutense, 28040-Madrid, Spain.

^bLaboratory of Cellulose and Paper. INIA. Forest Research Center. Ctra. de La Coruña km 7.5, 28040-Madrid, Spain.

ABSTRACT

The stabilization effects on a commercial β -glucosidase preparation from *Aspergillus fumigatus* during saccharification of ethanol-water pretreated wheat straw were analysed in comparison to this enzyme stability during cellobiose hydrolysis. For this purpose, the kinetics of β -glucosidase residual activity during cellobiose hydrolysis from 40 till 70 °C were studied, and a first-order partial deactivation model was obtained. A similar fitting procedure of released glucose data rendered a kinetic model including this first-order deactivation equation and a Michaelis-Menten equation with double competitive inhibition by glucose and a competitive inhibition by cellobiose. In both cases, kinetic models satisfied statistical and physical criteria. Finally, enzyme deactivation and its stability were evaluated at several processing times during wheat straw saccharification at 50 °C. Results suggest that the presence of a solid substrate dramatically reduces the deactivation rate of the enzyme, while there is no loss in its stability along the saccharification process, even for 72 h.

KEYWORDS

Thermal stability, β -glucosidase, cellobiose, wheat straw, saccharification

* To whom correspondence must be addressed: mladerog@ucm.es. Phone number: +34 913 944 164

1. INTRODUCTION

Nowadays, lignocellulosic biomass (LB) is gaining importance as a feedstock for many industrial processes. One of the most relevant products derived from LB is second generation bioethanol (2GBE), with a production that has constantly grown in the last years (Nguyen et al., 2017; Zabed et al., 2017). Cellulases and auxiliary enzymes and proteins have an important role in LB depolymerisation to monosaccharides mixtures that are transformed by yeasts and/or bacteria into 2GBE. Therefore, a traditional approach to 2GBE production involves three consecutive stages: biomass pre-treatment, enzymatic hydrolysis and microbial fermentation (Aditiya et al., 2016; Zabed et al., 2017).

Considering the cellulose itself, three different kinds of enzymes take part on the enzymatic reaction process during its depolymerisation to glucose: endoglucanases (EG), exoglucanases or cellobiohydrolases (EXG or CBH) and β -glucosidases (BG) (Chundawat et al., 2011; Sørensen et al., 2013). BG enzymes convert cellobiose into glucose, a key step on cellulose enzymatic hydrolysis, as it reduces the well-known cellobiose inhibition upon glucanases (Chundawat et al., 2011; Zhang et al., 2017). In consequence, it is important to

thoroughly study the behaviour of BG enzymes so to determine optimal operational conditions for the cellulose enzymatic hydrolysis. Although there are many studies in bibliography dealing with inhibitory effects affecting BG enzymes (Guo et al., 2016; Kuusk & Väljamäe, 2017; Singh et al., 2015; Teixeira da Silva Vde et al., 2016; Xu et al., 2017), only a few reports in the literature are focused on thermal and operational deactivation of BG enzymes or on their stability.

Several authors have studied thermal effects on newly obtained cocktails with BG activities. Teixeira da Silva et al. worked with the thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4., developing solid-state and submerged bioprocesses to produce a complex of cellulolytic enzymes containing BG activity (Teixeira da Silva Vde et al., 2016). After crude enzyme purification, these authors determined the effect of pH and temperature on enzyme reactivity, evaluating initial activity of BG with p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) as a colorimetric substrate. Results showed that there was a maximum in this BG initial activity for temperatures between 65 and 70 °C, depending on the method employed for BG production. Also, these authors evaluated the enzyme

stability by incubation for 60 minutes, proving that the enzyme is stable at temperatures below 65 °C (Teixeira da Silva Vde et al., 2016). Similarly, Watanabe et al. performed a purification and evaluated the optimal temperature and the thermal stability of a novel BG from *Aspergillus oryzae*, concluding that the best temperature in this case is 60 °C, while the enzyme is stable till 70 °C (Watanabe et al., 2016). Other authors have evaluated the effect of temperature on a new β -glucosidase obtained from a *Hypocrea orientalis* strain, showing an enhanced thermal stability in the presence of glucose (Xu et al., 2015). In this work, it is established that the presence of glucose and other sugars in saccharification media exerts a positive effect on the stability of the BG studied. This effect has been widely described previously on literature (Ladero et al., 2006b; Lejeune et al., 2001; Mathlouthi et al., 1989). Moreover, a molecular model to simulate the molecular docking of the substrate into the enzyme has also been developed, proving that the presence of glucose and other -similar carbohydrates improves thermal stability of the active centre of BG by the union of these molecules to the active centre by hydrogen bonds (Xu et al., 2015). Although this paper is mainly

focused on mechanistic and micro-kinetic studies, there is no kinetic model in it able to reproduce the evolution of experimental concentrations of the substrate (cellobiose) or the product (glucose) (Xu et al., 2015). Other relevant study about relationship between enzymatic activity of BG with temperature and pressure shows the effects of high pressures and temperatures on the activity of a novel enzymatic cocktail obtained from almonds (Terefe et al., 2013). These authors employed a first-order deactivation model, adjusting it to experimental results so to obtain the kinetic parameters of the deactivation process, using a test reaction with pNPG to determine how the activity of BG enzymes decreases with hydrolysis o process time. Finally, the activation energy of the inactivation reaction could be precisely determined: its value was $216.2 \pm 8.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

In a previous work, a kinetic model for an industrial BG mixture from *Aspergillus fumigatus* was formulated (Wojtusik et al., In press). Using this kinetic model as a base, the aim of this work is to determine how temperature affects activity of this BG mixture, as well as how temperature compromises enzymatic stability in a realistic scenario, including this effect in the

kinetic model not only in terms of the Arrhenius trend for kinetic parameters but also adding adequate equations to cope with the deactivation effect at high temperature or high operational time in batch operation, which is usual at industrial scale.

2. MATERIALS and METHODS

2.1. Enzyme employed

In this work, a relatively new BG enzyme mixture from *Aspergillus fumigatus* (EC 3.2.1.23) has been employed. This enzyme was kindly provided by ASA-Spezialenzyme. Its characterization and description has been performed elsewhere (Wojtusik et al., In press): this mixture has a protein concentration of 63.3 $\text{mg}_{\text{protein}} \cdot \text{mL}_{\text{preparation}}^{-1}$ and a final activity of 20.9 $\text{IU} \cdot \text{mg}_{\text{protein}}^{-1}$. Regarding molecular size, SDS-PAGE has shown several bands of proteins with molecular weight ranging between 23 and 114 kDa, while these same denaturing PAG-SDS at high temperature and room-temperature zymograms at several protein concentrations indicate that BG activity corresponds to the 95 kDa band. MALDI-TOF and MALDI-TOF-TOF results, shown elsewhere, confirms that this band is due to *Aspergillus fumigatus* BG (Wojtusik et al., In press).

2.2. Enzyme activity determination

Activity of the commercial preparation was measured by a colorimetric hydrolysis reaction, in which pNPG (Sigma-Aldrich) was employed as a substrate, at 40 °C, 5.0 pH and with thorough agitation and using a 100 mM citrate (Panreac) buffer solution, with an initial concentration of 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ of pNPG. Absorbance of the reaction was measured on-line with a Jasco V-630 spectrophotometer, working with the first 100 seconds of the reaction time to evaluate enzymatic activity as initial reaction rate. Calibration was carried out using a solution with known pNPG concentration. In order to prevent thermal oscillation, substrate was previously pre-heated to 40 °C, prior to sample addition. All assays were conducted by triplicate.

2.3. Enzymatic hydrolysis procedure

Thermal deactivation and stability of BG was studied using commercial cellobiose as substrate (Sigma-Aldrich). Unless otherwise stated, all experiments were conducted in a 50 mL screwed Erlenmeyer with 20 mL of working volume, employing an initial concentration of cellobiose of 29.21 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) and citrate buffer 50 mM pH 4.9. Temperature was maintained with a water bath, and agitation was set at 150 rpm for all the

experiments. The initial concentration of enzyme preparation was fixed at 0.25 g·L⁻¹, corresponding to an initial activity of 5.23 IU·ml⁻¹. Samples were withdrawn at different experimental times to carry out activity assays and analyse medium composition by HPLC. For statistical purposes, all experiments were conducted three times.

Regarding experiments with lignocellulosic biomass, ethanol/water pre-treated wheat straw was employed as substrate. This substrate was obtained at CIFOR-INIA by soaking milled wheat straw with ethanol/water 25/75 v/v mixed with 1% H₂SO₄ and heating the mixture to 190 °C for 1 h (H factor value of 4539). Compositional analysis of this substrate has been carried out following NREL methodology (Sluiter, 2008; Sluiter et al., 2008a; Sluiter et al., 2006; Sluiter et al., 2008b; Sluiter et al., 2005). Results achieved were the following, expressed in mass percentage in dry basis: 32.82 glucanes, 26.30 xylenes, 3.61 arabinanes, 2.29 acetyl groups, 13.10 lignin, 17.73 extractives and 4.09 ashes.

The saccharification process was carried out with a total solids load of 10 % (w/V), at 50 °C of temperature (maintained with a water bath), and 125 rpm of agitation. Two different enzymatic mixtures were employed:

Celluclast 1.5L (Novozymes) and the studied preparation (ASA-Specialenzymes), both at a dosage of 20 IU·ml⁻¹. Samples were collected at 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h, and were analysed to determine the concentration of disaccharides and monosaccharides. Such samples were also employed as an enzyme load for coupled cellobiose enzymatic degradation assays, carried out as it has been described previously, to determine enzyme remaining activity on cellobiose, and, therefore, its stability at a given operation time in pretreated wheat-straw.

2.4. Samples managing and analytical methods

During wheat straw and cellobiose hydrolysis runs, several samples were withdrawn at different reaction times. Activity assays were conducted with no further preparation. However, in order to determine the composition of reaction media, enzyme activity was inactivated. For this instance, samples were centrifuged, filtered and, after that, a 25 % (w/w) HCl solution was added to every samples in a 10 % (v/v) proportion, which diminishes pH value of every sample to a final value of 0.5. After that, samples were diluted and then analysed by HPLC; the column employed was REZEX RHM-Monosaccharide H⁺ (8%) (Phenomenex)

at 80 °C, and the eluent was acid Milli-Q water (H₂SO₄ 1.1 mM) flowing at 0.5 mL·min⁻¹. The determination of the concentrations of glucose and cellobiose was performed with a refractive index detector (RID) at 55 °C. Calibration was developed for both compounds, glucose (Panreac Aplichem) and cellobiose (Sigma-Aldrich).

2.5. Statistical methods

Data retrieved from pNPG and cellobiose hydrolysis and wheat straw saccharification were employed to fit to them simple kinetic models for the remaining activity (a_r) and holistic models coupling the evolution of remaining activity and the production of glucose. For this purpose, single-response correlation was used to fit models to the evolution of the residual activity with time using OriginLab 7.0, while multi-response fitting of the global model to glucose yield obtained in runs at several temperature values was performed with Aspen Custom Modeler v10.

As usual, goodness-of-fit statistical parameters were utilised to validate the achieved correlations (Fisher's F-value in comparison to its critical value at 95% confidence; SQR or sum of residual squares, and VE or percentage of explained variation of the dependent variable). The parameter intervals at 95

% confidence, with their related standard errors, were computed for the kinetic constants. The meaning and equations to calculate these statistical parameters are detailed elsewhere (Esteban et al., 2015).

3. RESULTS and DISCUSSION

Several experiments were conducted at temperatures from 40 to 70 °C, with cellobiose as substrate in a homogeneous system, to evaluate the influence of temperature in enzyme activity, as well as the effect of this variable in the most frequent operational conditions used in the industry for enzymatic saccharification of LB (50 °C), using wheat straw as LB substrate in a heterogeneous L-S system.

3.1. Residual activity determination at different temperatures

Residual or remaining activity of the BG preparation (a_r , expressed on percentage) was calculated as the ratio of the calculated activity (a_t) at a given reaction time and the initial activity (a_0), as follows:

$$a_r = \frac{a_t}{a_0} \cdot 100 \quad (1)$$

The activity for each time was calculated employing the evolution of p-nitrophenol concentration with time, from which the substrate pNPG concentrations were measured (C_{pNPG}).

During the first 100 seconds of activity assays, C_{pNPG} evolves proportionally with time. Consequently, a_t can be defined as the slope of C_{pNPG} evolution with time and can be calculated using small time intervals (≤ 10 min) as defined by the following equation:

$$a_t = \frac{\Delta C_{pNPG}}{\Delta t} \quad (2)$$

As the residual activity diminishes during enzymatic hydrolysis, the effective concentration of enzyme (C_E), which is proportional to its activity, does not have a constant value for all reaction times. As this activity is affected by temperature, it is possible to relate C_E evolution with it, and, therefore, with the temperature. In this work, a first order partial deactivation model, widely known and employed in bibliography (Ladero et al., 2006a; Tamayo et al., 2012), was used to describe the decay of enzyme activity caused by temperature. This model assumes that the activity of enzyme that hydrolyses cellobiose into glucose decreases due to thermal effects, reaching an asymptotic value higher than zero, so this deactivation is partial. The kinetic equation that describes evolution of C_E during enzymatic hydrolysis of cellobiose is given by the next equation:

$$C_E = C_{E0} \cdot (\beta_T + (1 - \beta_T) \cdot e^{-k_D \cdot t}) \quad (3)$$

As the residual activity can be defined in terms of enzyme concentration, as it is shown on equation (4), it is possible to express equation (3) in terms of a_r instead of C_E , calculating the former variable with equation (5).

$$a_r = \frac{C_E}{C_{E0}} \cdot 100 \quad (4)$$

$$\frac{a_r}{100} = \beta_T + (1 - \beta_T) \cdot e^{-k_D \cdot t} \quad (5)$$

Where β_T is the equilibrium residual activity reached at infinite reaction time, and k_D is the kinetic constant of the deactivation of enzyme mixture. Both these parameters are related to temperature, as it is stated by equations (6) and (7). While the relative activity of the final enzyme changes only slightly with temperature, so a linear relationship is proposed, k_D is a true kinetic constant and an exponential function of temperature, following the Arrhenius equation.

$$\beta_T = \beta_{T0} - k_{\beta T} \cdot T \quad (6)$$

$$k_D = k_{D0} \cdot e^{-\frac{E_{akD}}{RT}} \quad (7)$$

The evolution of the residual activity was evaluated for the first 60 min of enzymatic reaction, being the experimental results shown in Figure 1. It can be observed that, for every tested temperature (40, 50, 60 and 70 °C), the residual activity decreases with experimental time, reaching an asymptotic value higher than zero. Furthermore, this final value hugely

depends on the temperature employed for each enzymatic hydrolysis reaction.

According to these results, it seems that the enzyme is affected by temperature even at values as low as 40 °C, so its activity slowly decreases at this temperature, and at 50 °C, till, approximately, 85% of the initial activity. In concordance with this adaptation, the ability of the enzymatic cocktail to degrade cellobiose into glucose seems to be slightly reduced even at the usual operational temperature (50 °C). However, it is remarkable to say that, despite this drop in activity at relatively low temperatures, the stability of the enzymatic preparation makes it able to maintain the process, even at a lower saccharification rate. It is also surprising to see a very considerable stability of BG at 70 °C, being this enzyme able to maintain 60 % of the initial activity in this harsh condition.

After a preliminary single-response fit of the kinetic model to data retrieved at a given temperature, and the subsequent application of Arrhenius equation to the estimated kinetic parameters, the kinetic model represented by equations (5), (6) and (7) was fitted to all remaining activity data at the same time by a multi-response non-linear regression, so to further

verify if the model of enzyme deactivation proposed in this work is correct introducing temperature as a new independent variable in the fitting process. As can be seen in Figure 1, the proposed model is able to properly describe the trend of residual activity during enzymatic reaction process for all the temperatures employed in this work. All the estimated parameters are contained in Table 1.

With the results shown in Figure 1, kinetic parameters of equations (6) and (7) were determined adjusting experimental remaining activity to each temperature separately. The results achieved are shown on Figure 2A and 2B. As a consequence of (6) and (7) equation constants determination, it is possible to describe evolution of inhibition parameters by means of the temperature, and to compare it with the global parameter determination. As it can be seen on Figure 2A and 2B, both β_T and k_D are strongly dependent on temperature. On one hand, it is important to state that, as k_D has a pure kinetic parameter behaviour, it can be described by means of the Arrhenius equation (see equation 7). This kinetic constant is associated with the rate of deactivation which is connected to the inhibition process. On the other hand, β_T has a different behaviour compared

to k_D , as its trend with temperature only can be described with the model proposed (equation 6) for temperatures over 50 °C. Bearing in mind β_T definition, which is the remaining activity value for very long time reactions, its value is strictly related to thermal deactivation. For temperatures below 50 °C, deactivation seems to be negligible once the enzyme is adapted to the reaction environment and β_T trends to the same final value: 0.85. For this reason, for experiments below 50 °C, β_T was fixed in a constant value in order to perform further calculations and modelling, while, for higher temperatures, this parameter appears to decrease linearly.

3.2. Determination of a kinetic model for cellobiose hydrolysis

In particular, when using cellobiose as substrate, the hydrolysis reaction progress was expressed in terms of conversion to glucose (X_G), as stated on equation (2), where C_G is glucose concentration and C_{C0} is cellobiose initial concentration.

$$X_G = \frac{C_G}{2 \cdot C_{C0}} \quad (8)$$

As it has been stated before, a previously published kinetic model was employed to describe the temporal evolution of the conversion to glucose (Wojtusik et al., In press), given by equation (9).

$$R_C = -\frac{dC_C}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot C_E \cdot C_C}{K_M \cdot \left(1 + \frac{C_G}{K_P}\right)^2 + C_C \cdot \left(1 + \frac{C_C}{K_I}\right)} \quad (9)$$

Cellobiose (C_C) and glucose concentrations (C_G) are related to glucose conversion (X_G) and the initial cellobiose concentration (C_{C0}) as stated by equations (10) and (11):

$$C_C = C_{C0} \cdot (1 - X_G) \quad (10)$$

$$C_G = C_{C0} \cdot X_G \quad (11)$$

After substituting equations (10) and (11) on equation (9), the evolution of the glucose conversion with time is given by equation (12):

$$\frac{dX_G}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot C_E \cdot (1 - X_G)}{K_M \cdot \left(1 + \frac{C_{C0} \cdot X_G}{K_P}\right)^2 + C_{C0} \cdot X_G \cdot \left(1 + \frac{C - C_0}{K_I}\right)} \quad (12)$$

With the information achieved after the performance of the adjustment made for a_r , it has been clearly demonstrated that temperature plays an important role on cellobiose degradation process, especially at high temperatures. For this reason, the kinetic model reflected by equation (12) needs a further correction to take into account the effect of temperature in the enzyme ability to degrade cellobiose. Therefore, equation (3), which describes the evolution of C_E taking into account the effect of the temperature on the enzyme activity, was included on equation (12). In order to obtain the kinetic parameters on equation (12) and evaluate the ability of the model to describe experimental results, experimental data of previous publication as well as experimental

data achieved in this work were used to fit the new model (Wojtusik et al., In press).

With all other kinetic parameters fixed, k_{cat} is the estimated kinetic parameter, in terms of k_{cat0} and E_{akcat} , considering that a reduction in the average activity (or C_E), due to a reduction of the residual activity with time, will be compensated by a variation of k_{cat0} and, possibly, E_{akcat} . Therefore, by this fitting procedure, a kinetic model that takes into account most information retrieved in the single-response fitting of remaining activity and in our previous paper, will be valid for temperatures ranging from 40 to 70 °C, including the deactivation of the enzyme. Results achieved by the modelling are shown on Figure 3, comparing experimental conversion to glucose with data estimated by the proposed kinetic model. Parameters of such model are collected in Table 2. In Figure 3, some bias is observed at low values of the estimated variable, which can be explained by the higher experimental error in that region, but the model is able to fit experimental data most adequately at medium and high conversion values.

Therefore, the kinetic model proposed taking into account thermal deactivation of the enzyme is able to

reproduce the trend of the conversion to glucose during experiments employed for modelling. Furthermore, taking into account statistical parameters shown in Table 2, it can be clearly seen that the proposed kinetic model satisfies all statistical criteria related to the goodness-of-fit: calculated Fisher's F value after adjustment is clearly superior than its critical value at 95 % confidence corresponding to the degrees of freedom of the modelled equations and experimental data employed to obtain the kinetic parameters; the value of the sum of variances or square residues (SQR) is very low compared to the sum of quadratic values of the dependent variable ($6.2 \cdot 10^{-2}$ vs $2.1 \cdot 10^{-1}$), and the value of the percentage of variation of this dependent variable (VE) is very near 100%, showing that the model is able to almost explain all the variation of the conversion to glucose with the reaction time. Statistical criteria related to the significance of the values for the kinetic parameters are also correct (see Table 2), as all parameters have a narrow confidence interval and, subsequently, a low standard error.

If looking at the main reaction, only one out of the three kinetic parameters proposed in the original kinetic model (without deactivation) has

demonstrated to be dependant with temperature (v_{max}). This can be considered correct, as it is the only purely kinetic constant, and this type of parameters has an important thermal dependence. The other two kinetic parameters are related to inhibition effects exerted by product (k_p) and substrate (k_i), or to the complex formation between cellobiose and the enzyme (K_M). In these parameters, which are ratios of kinetic constants, a similar trend with temperature of such kinetic constants results in a negligible trend with this variable for K_M , k_i and k_p .

3.3. Thermal stability of enzyme during hydrolysis of lignocellulosic biomass

The stability of the β -glucosidase was determined in real enzymatic hydrolysis conditions employing pre-treated wheat straw as substrate. The overall activity of the enzyme mixture, including β -glucosidase, endoglucanases, and exoglucanases, was determined for every collected sample, observing the glucose release in terms of its concentration and conversion. Moreover, for each aforementioned sample, activity experiments were also performed off-line with cellobiose as substrate, estimating the variation of

the remaining activity from cellobiose hydrolysis tests for 60 minutes.

In Figure 4, it is possible to see the remaining activity and glucose concentration evolution during enzymatic hydrolysis of wheat straw. With the idea of comparing the activity loss to the previously determined remaining activity at the same operational conditions (50 °C) for the hydrolysis of cellobiose, a dashed rectangle was drawn: this form marks the asymptotic value of the remaining activity (the activity of the final form of the enzyme during cellobiose hydrolysis at 50 °C) and its experimental error. Moreover, in this same figure, it is possible to observe the evolution of glucose concentration during lignocellulosic biomass (wheat straw) saccharification, which indicates the ability of the mixture of enzymes to perform enzymatic hydrolysis. Bearing in mind the results shown in Figure 4, it is possible to say that the final remaining activity is slightly lower (0.80 ± 0.03) than this variable obtained at 60 minutes with cellobiose as substrate (0.85); this can also apply for longer times, if the kinetic model is used to extrapolate a_r . This factor may indicate the existence of another deactivation process that affects ability of this BG preparation in the presence of wheat

straw as substrate, if compared to the homogeneous system with cellobiose as substrate. Due to the well-known structure of this type of lignocellulosic substrate, one of the most relevant possibilities is the deactivation of enzymatic preparation by means of a non-specific and irreversible adsorption process of this kind of enzymes into lignocellulosic matrix. This process has been lately studied on bibliography (Martín-Sampedro et al., 2013; Palonen et al., 2004; Toyosawa et al., 2017; Wang et al., 2012; Zhu et al., 2009).

Finally, attempting to analyse the stability of the remaining BG enzyme in each of the samples retrieved during the saccharification experiment with wheat straw as substrate, these samples were used also to perform cellobiose hydrolysis tests at 50 °C, taking samples at several times during 60 minutes and measuring the remaining activity with pNPG as substrate as previously described. In Figure 5, the evolution of the remaining activity is shown for every experimental time that has been displayed on Figure 4. Results indicated that, although BG activity decreased during wheat straw saccharification till 80 % (Figure 4), the stability of the enzyme at every time till 72 hours was similar, so enzyme stability, regardless of the remaining concentration of

original enzyme, was similar at every time. It is interesting to comment that enzymes lose firstly its stability, during storage or in process, with a subsequent loss of its activity, as indicated by the Lumry-Eyring model for protein denaturation (Rogers & Bommarius, 2010). However, in this case, BG losses its activity during wheat straw saccharification till a remaining 80 % of the initial activity, but it does not lose stability.

Finally, the first-order partial thermal inactivation model (equation 10) was applied to the results shown in Figure 4, so to compare the kinetic parameters associated with the residual activity lost due to thermal effects. The results achieved by fitting equation 10 to the aforementioned experimental results, employing the methodology previously described, are shown in Table 3, together with the values of the kinetic parameters obtained for the experiments carried out at 50 °C with cellobiose as substrate (homogeneous system). By comparison, $\beta\tau$ has a slightly lower value in the heterogeneous system (wheat straw), which indicates that the final residual activity achieved at very long reaction time in this system is significantly lower in the homogeneous system (cellobiose). This factor combined with

the dramatic reduction in k_D value, strengthens the idea previously exposed for Figure 4 results: there is probably an adsorption effect on the lignocellulosic matrix that provokes changes on the thermal inactivation process, preventing the inactivation of the enzymes and increasing their stability. However, this adsorption involves a notable drop on total enzyme concentration in the liquid phase, which has a negative impact upon BG activity. Adsorption of EG and CBH enzymes on cellulosic biomass has been described (Martín-Sampedro et al., 2013; Palonen et al., 2004), but this phenomenon is also described for β -glucosidases (Haven & Jørgensen, 2013; Pareek et al., 2013).

4. CONCLUSIONS

Temperature effects in the activity and stability of a commercial β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* was studied. The remaining activity of the enzyme during cellobiose hydrolysis was fitted to a first order partial deactivation model. Coupling this model to a hyperbolic model with glucose double competitive inhibition and cellobiose acompetitive inhibition can explain glucose production from cellobiose, when correcting temperature-dependent terms. Finally, enzyme deactivation and its stability were

evaluated during wheat straw saccharification at 50 °C to observe that solid presence greatly enhances enzyme stability. Moreover, the stability of the remaining enzyme at any operation time is constant.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the funding granted by MINECO through contracts CTQ2013-45970-C2-1-R and PCIN-2013-021-C02-01.

6. REFERENCES

- Aditiya, H.B., Mahlia, T.M.I., Chong, W.T., Nur, H., Sebayang, A.H. 2016. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **66**, 631-653.
- Chundawat, S.P.S., Beckham, G.T., Himmel, M.E., Dale, B.E. 2011. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annu Rev Chem Biomol Eng.*, **2**.
- Esteban, J., Fuente, E., Blanco, A., Ladero, M., Garcia-Ochoa, F. 2015. Phenomenological kinetic model of the synthesis of glycerol carbonate assisted by focused beam reflectance measurements. *Chemical Engineering Journal*, **260**(Supplement C), 434-443.
- Guo, B., Sato, N., Biely, P., Amano, Y., Nozaki, K. 2016. Comparison of catalytic properties of multiple β -glucosidases of *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**(11), 4959-4968.
- Haven, M.Ø., Jørgensen, H. 2013. Adsorption of β -glucosidases in

- two commercial preparations onto pretreated biomass and lignin. *Biotechnology for Biofuels*, **6**(1), 165.
- Kuusik, S., Väljamäe, P. 2017. When substrate inhibits and inhibitor activates: implications of β -glucosidases. *Biotechnology for Biofuels*, **10**(1), 7.
- Ladero, M., Ruiz, G., Pessela, B.C.C., Vian, A., Santos, A., García-Ochoa, F. 2006a. Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2: Comparison to the free enzyme. *Biochemical Engineering Journal*, **31**(1), 14-24.
- Ladero, M., Santos, A., García-Ochoa, F. 2006b. Kinetic modelling of the thermal inactivation of an industrial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, **38**(1), 1-9.
- Lejeune, A., Vanhove, M., Lamotte-Brasseur, J., Pain, R.H., Frere, J.M., Matagne, A. 2001. Quantitative analysis of the stabilization by substrate of *Staphylococcus aureus* PC1 beta-lactamase. *Chem Biol*, **8**(8), 831-42.
- Martín-Sampedro, R., Rahikainen, J.L., Johansson, L.-S., Marjamaa, K., Laine, J., Kruus, K., Rojas, O.J. 2013. Preferential Adsorption and Activity of Monocomponent Cellulases on Lignocellulose Thin Films with Varying Lignin Content. *Biomacromolecules*, **14**(4), 1231-1239.
- Mathlouthi, M., Larreta-garde, V., Xu, Z.F., Thomas, D. 1989. Solute-Solvent and Water Activity of Small Carbohydrates: Application to the Study of Enzyme Stability in Aqueous Sugar Solutions. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **8**(2), 233-245.
- Nguyen, Q., Bowyer, J., Howe, J., Bratkovich, S., Groot, H., Pepke, E., Fernholz, K. 2017. Global production of second generation biofuels: trends and influences.
- Palonen, H., Tjerneld, F., Zacchi, G., Tenkanen, M. 2004. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *Journal of Biotechnology*, **107**(1), 65-72.
- Pareek, N., Gillgren, T., Jönsson, L.J. 2013. Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicelluloses. *Bioresource Technology*, **148**, 70-77.
- Rogers, T.A., Bommarius, A.S. 2010. Utilizing Simple Biochemical Measurements to Predict Lifetime Output of Biocatalysts in Continuous Isothermal Processes. *Chem Eng Sci*, **65**(6), 2118-2124.
- Singh, G., Verma, A.K., Kumar, V. 2015. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. *3 Biotech*, **6**(1), 3.
- Sluiter, A. 2008. *Determination of Insoluble Solids in Pretreated Biomass Material: Laboratory Analytical Procedure (LAP): Issue Date, 03/21/2008*. National Renewable Energy Laboratory.
- Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Wolfe, J. 2008a. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. *National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, NREL Technical Report No. NREL/TP-510-42621*.

- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. 2006. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. *National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO*.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. 2008b. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. vol. Version 2010. National Renewable Energy Laboratory, USA.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. 2005. Determination of extractives in biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, **1617**.
- Sørensen, A., Lübeck, M., Lübeck, P.S., Ahring, B.K. 2013. Fungal beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Biomolecules*, **3**(3), 612-631.
- Tamayo, J.J., Ladero, M., Santos, V.E., García-Ochoa, F. 2012. Esterification of benzoic acid and glycerol to α -monobenzoate glycerol in solventless media using an industrial free *Candida antarctica* lipase B. *Process Biochemistry*, **47**(2), 243-250.
- Teixeira da Silva Vde, C., de Souza Coto, A.L., de Carvalho Souza, R., Bertoldi Sanchez Neves, M., Gomes, E., Bonilla-Rodriguez, G.O. 2016. Effect of pH, Temperature, and Chemicals on the Endoglucanases and beta-Glucosidases from the Thermophilic Fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. Obtained by Solid-State and Submerged Cultivation. *Biochem Res Int*, **2016**, 9781216.
- Terefe, N.S., Sheean, P., Fernando, S., Versteeg, C. 2013. The stability of almond β -glucosidase during combined high pressure-thermal processing: a kinetic study. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**(7), 2917-2928.
- Toyosawa, Y., Ikeo, M., Taneda, D., Okino, S. 2017. Quantitative analysis of adsorption and desorption behavior of individual cellulase components during the hydrolysis of lignocellulosic biomass with the addition of lysozyme. *Bioresource Technology*, **234**(Supplement C), 150-157.
- Wang, Q.Q., Zhu, J.Y., Hunt, C.G., Zhan, H.Y. 2012. Kinetics of adsorption, desorption, and re-adsorption of a commercial endoglucanase in lignocellulosic suspensions. *Biotechnology and Bioengineering*, **109**(8), 1965-1975.
- Watanabe, A., Suzuki, M., Ujiie, S., Gomi, K. 2016. Purification and enzymatic characterization of a novel β -1,6-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **121**(3), 259-264.
- Wojtusik, M., Yepes, C.M., Villar, J.C., Cordes, A., Arrojo, M., Garcia-Ochoa, F., Ladero, M. In press. Kinetic modeling of cellobiose by β -glucosidases from *Aspergillus fumigatus* *Chemical engineering Research and Design*.
- Xu, X.Q., Han, W., Wu, X.B., Xie, Y., Lin, J., Chen, Q.X. 2017. Inactivation kinetics and conformation change of *Hypocrea orientalis* beta-glucosidase with guanidine hydrochloride. *J Biosci Bioeng*, **124**(2), 143-149.
- Xu, X.Q., Shi, Y., Wu, X.B., Zhan, X.L., Zhou, H.T., Chen, Q.X. 2015. Heat inactivation kinetics of *Hypocrea orientalis* beta-glucosidase with enhanced

- thermal stability by glucose. *International Journal of Biological Macromolecules*, **81**, 1012-1018.
- Zabed, H., Sahu, J.N., Suely, A., Boyce, A.N., Faruq, G. 2017. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **71**, 475-501.
- Zhang, Z., Wang, M., Gao, R., Yu, X., Chen, G. 2017. Synergistic effect of thermostable β -glucosidase TN0602 and cellulase on cellulose hydrolysis. *3 Biotech*, **7**(1), 54.
- Zhu, Z., Sathitsuksanoh, N., Percival Zhang, Y.H. 2009. Direct quantitative determination of adsorbed cellulase on lignocellulosic biomass with its application to study cellulase desorption for potential recycling. *Analyst*, **134**(11), 2267-2272.

7. Nomenclature

2GBE Second generation bioethanol

- a_0 Initial enzymatic activity ($\text{mol}_{\text{pNPG}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
- a_r Residual or remnant enzymatic activity ($\text{mol}_{\text{pNPG}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
- a_t Enzymatic activity at a given time t ($\text{mol}_{\text{pNPG}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
- BG β -glucosidase enzymes
- C_C Cellobiose concentration ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
- C_{C0} Initial cellobiose concentration ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
- C_E Enzyme concentration ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
- C_{E0} Initial enzyme concentration ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
- C_G Glucose concentration ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
- C_{pNPG} 4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside concentration ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
- E_{akD} Activation energy of kinetic parameter of enzyme deactivation constant ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$)
- E_{akcat} Activation energy of the catalytic constant ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$)
- EG Endo-glucanase enzymes
- EXG Exo-glucanase enzymes
- F_{exp} Value of F determined by means of the adjustment of the model to experimental data
- F_{tab} Tabulated value of F at 95 % of probability
- k_{cat} Catalytic constant ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)
- k_{cat0} Preexponential factor of the catalytic constant ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)
- k_D Enzyme deactivation constant (s^{-1})
- k_{D0} Arrhenius pre-exponential parameter of deactivation constant (s^{-1})
- K_i Substrate inhibition constant (mol^{-1})
- K_M Michaelis-Menten affinity constant (mol^{-1})

K_P	Product inhibition constant (mol^{-1})
LB	Lignocellulosic biomass
R_C	Cellobiose production rate ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
SQR	Sum of quadratic residues
%VE	Percentage of variation explained
X_G	Conversion to glucose
β_T	Asymptotic relative activity for deactivation model
β_{T0}	Empiric y-intercept for asymptotic relative activity
$k_{\beta T}$	Empiric constant for asymptotic relative activity model

8. CAPTIONS of TABLES and FIGURES

Table 1. Kinetic parameters obtained after a_r adjustment

Table 2. Kinetic and statistical parameters of the temperature dependent model determination

Figure 4. Evolution of remaining activity (a_r) with time for different temperatures. Experimental data with standard deviation (black filled squares for 40 °C, black empty squares for 50 °C, black filled circles for 60 °C and black empty circles for 70 °C) vs model results (black lines)

Figure 5. Evolution of β_T (A) and k_D (B) with temperature. Black filled squares are experimental values and black line corresponds to modelled results

Figure 6. Evolution of experimental y_G (black filled circle) *versus* modelled y_G (black line), for experiments carried out at 45 °C (A), 50 °C (B), 55 °C (C), 60 °C (D), 65 °C (E) and 70 °C (F).

Figure 7. Evolution of the remaining activity (black filled squares) and the glucose concentration (black filled circles) with reaction time for wheat straw saccharification experiment

Figure 8. Remaining stability of the samples taken for data shown in Figure 4: 0 hours (black filled squares), 6 hours (black empty squares), 12 hours (black filled circles), 24 hours (black empty circles), 36 hours (black filled triangles), 48 hours (black empty triangles), 60 hours (black filled diamonds) and 72 hours (black empty diamonds)

TABLES

Table 3. Kinetic parameters obtained after remaining activity adjustment (values and their error intervals at 95% confidence)

Parameter	Value & Interval
β_{T0}	4.02±1.03
$k_{\beta T}$	1.02±0.03
k_{D0}	$7.1 \cdot 10^9 \pm 3.5 \cdot 10^9$
E_{kD}	$7.2 \cdot 10^6 \pm 2.8 \cdot 10^6$

Table 4. Kinetic and statistical parameters of the temperature-dependent model

Kinetic parameter	Value	Statistical parameter	Value
k_{cat0}	$2.2 \cdot 10^7 \pm 0.2 \cdot 10^7$	F_{exp} vs. F_{tab}	4293 / 2.25
E_{akcat}	$4.9 \cdot 10^4 \pm 0.3 \cdot 10^4$	% VE	98.82
K_M	$2.8 \cdot 10^{-3}$	SQR	$6.2 \cdot 10^{-2}$
K_i	$8 \cdot 10^{-3}$		
K_p	$5.1 \cdot 10^{-4}$		
β_{T0}	4.02		
$k_{\beta T}$	1.02		
k_{D0}	$7.1 \cdot 10^9$		
E_{kD}	$7.2 \cdot 10^6$		

Table 5. Comparison between kinetic parameters for two different initial substrates

Homogenous system (cellobiose as substrate)		Heterogeneous system (wheat straw as substrate)	
Parameter	Value	Parameter	Value
β_T	0.88 ± 0.03	β_T	0.78 ± 0.08
k_D	0.035 ± 0.004	k_D	$9 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-4}$

FIGURES

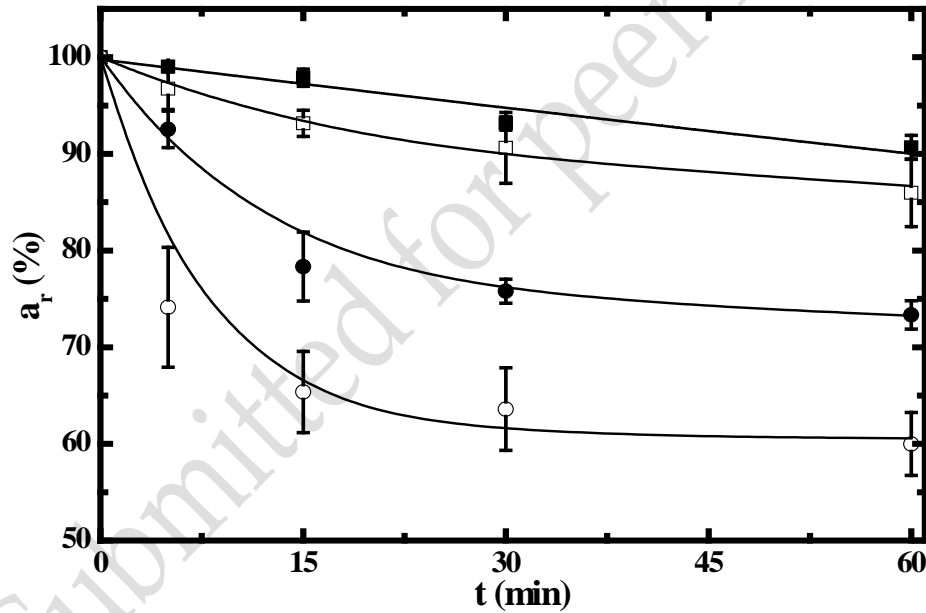


Figure 9. Evolution of remaining activity (a_r) with time for different temperatures. Experimental data with standard deviation (black filled squares for 40 °C, black empty squares for 50 °C, black filled circles for 60 °C and black empty circles for 70 °C) vs model results (dash black lines)

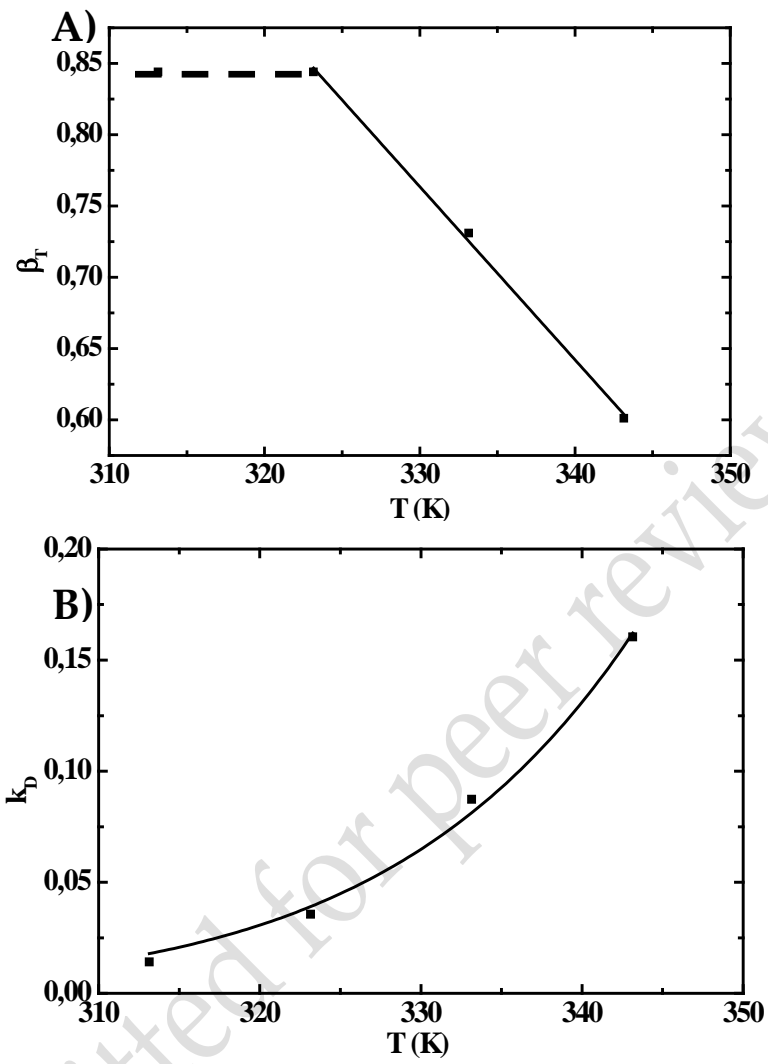


Figure 10. Evolution of β_T (A) and k_D (B) with temperature. Black filled squares are experimental values and black line corresponds to modelled results

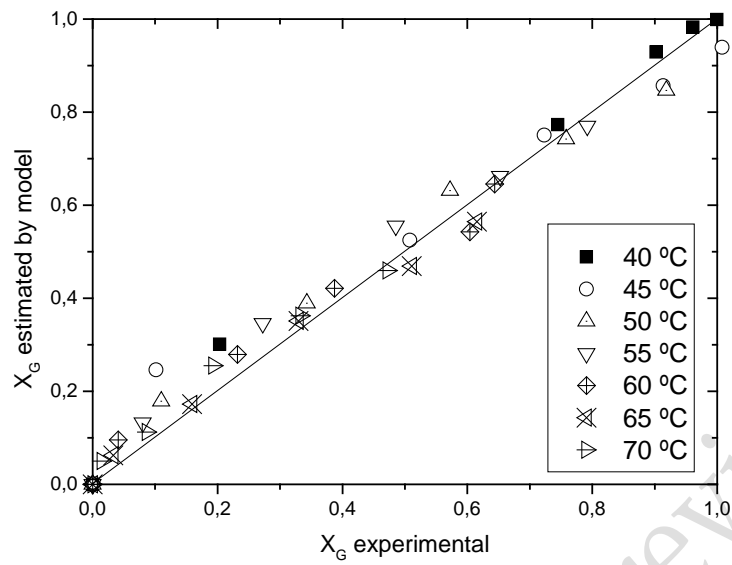


Figure 11. Evolution of experimental conversion of glucose (X_G) vs. the one estimated by the selected kinetic model at temperatures from 40 to 70 °C

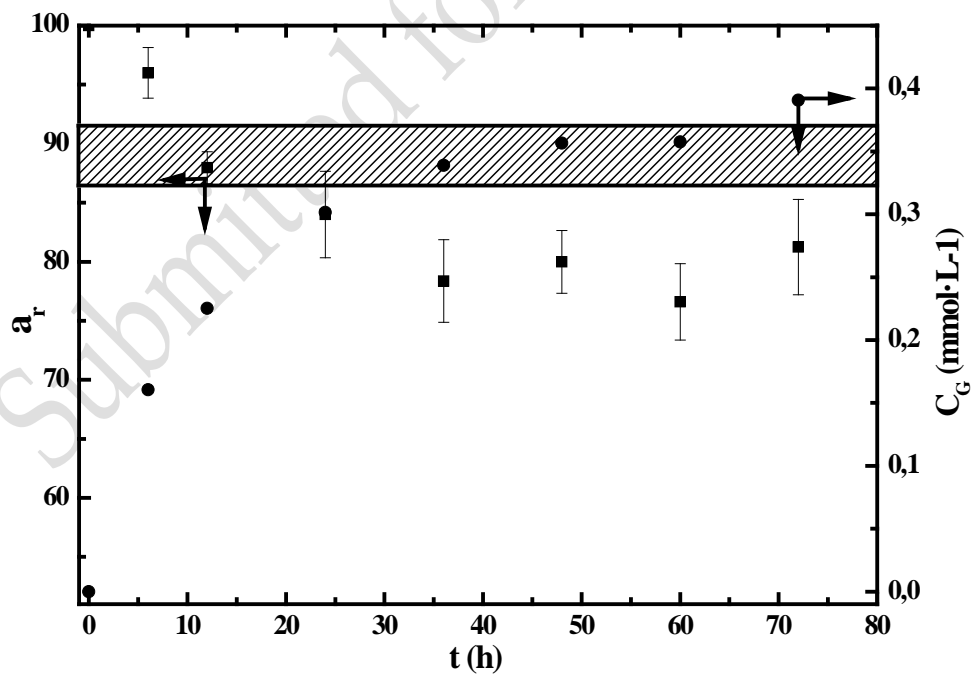


Figure 12. Evolution of the remaining activity (black filled squares) and the glucose concentration (black filled circles) with reaction time for wheat straw saccharification experiment

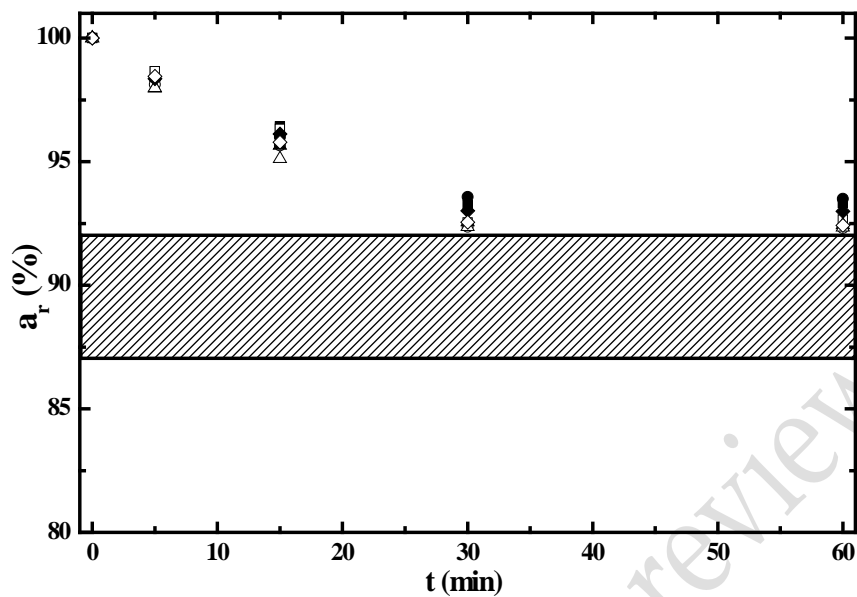


Figure 13. Remaining activity of the samples taken for data shown in Figure 4: 0 hours (black filled squares), 6 hours (black empty squares), 12 hours (black filled circles), 24 hours (black empty circles), 36 hours (black filled triangles), 48 hours (black empty triangles), 60 hours (black filled diamonds) and 72 hours (black empty diamonds)

Publicación 6

Autores: Mateusz Wojtusik, Juan Carlos Villar, Miguel Ladero, Félix García-Ochoa.

Título: Physico-chemical kinetic modelling of hydrolysis of a pre-treated corn stover: A two-step approach.

Revista: Bioresource Technology (2018).

Índice de impacto: 5.651

Categoría: Ingeniería agrícola, biotecnología y microbiología aplicada, combustibles y energía.

Resumen: Se ha propuesto un modelo cinético físico-químico para la descripción de la hidrólisis de paja de maíz pre-tratada a través de disolución con etanol-agua en presencia de ácido, suministrada por el INIA. Los experimentos de hidrólisis se llevaron a cabo con un cóctel enzimático pobre en enzimas β -glucosidasas, con un contenido del 1 % en peso (Celluclast 1.5L, Novozymes), y en condiciones experimentales en los que la transferencia de materia no juega un papel importante en la velocidad global del proceso. El modelo propuesto tiene un esquema de reacción en dos etapas en serie: despolimerización de la celulosa en celobiosa y posterior reacción de la misma para dar lugar al producto final, la glucosa. Para la descripción de la segunda etapa, se ha empleado un modelo cinético basado en el obtenido en las dos publicaciones anteriores, mientras que para la primera parte se optó por un modelo tipo Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto, y se postuló una ecuación cinética de activación de la enzima de primer orden total. Para plantear este modelo, se recurrió a la observación microscópica por SEM-EDS de muestras de hidrólisis así como a la consulta de modelos cinéticos similares previamente publicados en la

literatura. El modelo cinético, así como sus parámetros y su ajuste a los datos experimentales cumplieron con los criterios estadísticos y termodinámicos. Además, se probó la robustez del modelo aplicando las ecuaciones cinéticas obtenidas para otro sólido diferente (paja de maíz pre-tratada de origen industrial) y un cóctel enzimático industrial cuyo contenido en enzimas β -glucosidasas es mucho mayor. De esta manera, se consiguió obtener parámetros cinéticos de nuevo válidos de forma estadística y termodinámica para dos sistemas muy diferentes entre sí.

Physico-chemical kinetic modelling of hydrolysis of a steam-explosion pre-treated corn stover: A two-step approach

Mateusz Wojtusik¹, Juan C. Villar², Miguel Ladero^{*1}, Felix Garcia-Ochoa¹

¹Chemical Engineering and Materials Department, Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid, Spain

²Laboratory of Cellulose and Paper. INIA. Forest Research Center. 28040 Madrid, Spain.

ABSTRACT

A physico-chemical kinetic model for the hydrolysis of pre-treated corn stover is proposed. This model takes into account two reactions in series, the hydrolysis of cellulose to cellobiose and the production of glucose from cellobiose. Experiments have been carried out with an industrial enzymatic cocktail from *Trichoderma reesei* containing endo and exoglucanases and a very low activity of β -glucosidase. Kinetic parameters were calculated by fitting the proposed model to experimental data of cellulose and glucose concentrations with time. The kinetic parameters fulfill all statistical and physical criteria considered. The kinetic model has been validated with published saccharification data regarding differently pre-treated corn stover and enzymatic cocktail, in this case with a very high β -glucosidase activity (as it is common in modern industrial cellulase cocktails). In both cases, the kinetic model proposed could be fitted very appropriately to cellulose hydrolysis data.

KEYWORDS

Lignocellulose hydrolysis, kinetic model, cellulase, β -glucosidase, corn stover

*To whom correspondence must be addressed. mladerog@ucm.es

NOMENCLATURE

5-HPA	5-Hydroxypropionaldehyde
BG	β -glucosidase
C_C	Cellobiose concentration ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
C_{Cel}	Celullose concentration ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
C_{E1}	Endo and exoglucanase concentration ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
C_{E0}	Initial endo and exoglucanase concentration ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
C_{E2}	β -glucosidase concentration ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
C_{E20}	Initial β -glucosidase concentration ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
C_G	Glucose concentration ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
CS	Corn stover
EDS	Energy-dispersive X-ray spectroscopy
GMU	Glucose monomer units
H	Fractal parameter (dimension)
HPLC	High performance liquid chromatography
k_{cat1}	Catalytic constant of kinetic model for depolymerization reaction
k_{cat2}	Catalytic constant of kinetic model for cellobiose hydrolysis
k_{D1}	Endo and exoglucanase inactivation constant
k_{D2}	β -glucosidase inactivation constant
K_i	Acompetitive substrate inhibition constant for cellobiose hydrolysis
K_{M1}	Substrate affinity constant in kinetic model for depolymerization reaction
K_{M2}	Substrate affinity constant in kinetic model for cellobiose hydrolysis
K_{P1}	Product inhibition constant for depolymerization reaction
K_{P2}	Product inhibition constant for cellobiose hydrolysis
LB	Lignocellulosic biomass
NREL	National Renewable Energy Laboratory
PCS	Pre-treated corn stover
r_1	Depolymerization reaction rate
r_2	Cellobiose hydrolysis reaction rate
RID	Refractive index detector
SEM	Scanning electron microscopy
T_s	Total solids content (% w/w)
β	Asymptotic residual activity of endo and exoglucanases

1. INTRODUCTION

Two key problems that have to be addressed to ensure the sustainability of the global economy are the generation of waste and its valorization and the depletion of fossil resources (Nizami et al., 2017). To face them, lignocellulosic biomass (LB) and its processing into valuable products and biofuels stands as one of the most promising strategies. Although there are many processes to convert LB into valuable products, one thoroughly studied in the last years is its fractionation and the subsequent valorization of fractions. To this end, three stages are usually needed: firstly, LB is pre-treated in order to make its structure more accessible and reactive; secondly, pre-treated LB is converted into sugars by means of acid and/or enzymatic hydrolysis; and finally, the obtained monosaccharides are reagents for several catalytic processes or substrates for many biotechnological transformations into a wide range of products, such as biofuels and platform chemicals for further modification *via* several chemical or biochemical reactions (Farzad et al., 2017; Mika et al., 2018). One of the key steps of the aforementioned process is the enzymatic stage. As enzymes have high economic impact over the global

process, it is crucial to develop a very effective enzymatic hydrolysis to render the whole process economically feasible (Mika et al., 2018). For that instance, it is necessary to study two important aspects: the structure of the pre-treated LB and the kinetics of enzymatic hydrolysis, which reflects the pretreated LB reactivity.

LB biomass resources are diverse in origin, structure and composition, but one material that is gaining importance nowadays is corn stover (CS). CS is an agroindustrial residue with a relatively high content of cellulose (42.6 % w/w) and hemicellulose (21.6 % w/w), being its lignin content relatively low (less than 10 % w/w) (Bilal et al., 2018). To make CS susceptible to enzyme degradation, pre-treatment operations are mandatory. There is a wide variety of physical, physicochemical and chemical pre-treatments to be applied to CS (Aditya et al., 2016; Ravindran & Jaiswal, 2016). The extraction process based on ethanol-water mixtures or other aqueous mixtures can remove most of lignin and extractives, rendering a very reactive solid. This pre-treatment technique can be combined with sulphuric acid hydrolysis to eliminate most hemicelluloses in the solid (Ravindran & Jaiswal, 2016). This combination of

removing lignin and hemicelluloses profoundly enhances the subsequent hydrolysis process (Vergara et al., 2018).

Regarding the ulterior enzymatic hydrolysis step of pre-treated CS (PCS), this is a very complex mixture of combined reaction processes, in which there are many different physico-chemical factors that exert an important effect on the overall process rate. To describe the compositional evolution of this system during the reaction time, many authors have employed semi-mechanistical models which consider chemisorption and/or Michaelis-Menten enzyme/substrate interactions. However, these models have numerous parameters, so they need of sufficient experimental data for an accurate estimation of parameters and validation of the model (Sousa Jr. et al., 2011). Lately, there have been different approaches to describe enzymatic hydrolysis of LB on the grounds of the concurrent phenomena involved in the enzymatic process. One of these strategies is the employment of fractal kinetics, a type of models firstly proposed by Kopelman (1988). These kinetic models are based on the effects of the changing solid surface, that impedes to use the law of mass action, inasmuch as the solid presence

determines the attack of the enzyme over the substrate surface, reducing the allowed dimensions for an effective collision and reaction. Furthermore, as the reaction process is being held over this surface, the effect of the solid over the reaction rate evolves during the reaction time, which reflects on the value of the kinetic parameters (Kopelman, 1988). The simplest fractal models are able to describe the evolution of the main product of the enzymatic hydrolysis (glucose), employing only two kinetic parameters: the initial kinetic constant, that is the maximum value for the apparent kinetic constant and reflects kinetics at very low reaction times, and the fractal parameter (h), which is related to changes of the reactivity of the solid and accessibility of the enzyme complex to such solid and explains the reduction in the effective kinetic constant with time (Aguiar et al., 2013; Fockink et al., 2017; Wojtusik et al., 2016). However, fractal models lack of most subtleties behind the true mechanisms of the enzymatic phenomena, reflecting only a mere fraction of it that is related to the geometry of the substrate and its changes during the process.

There are other kinetic models in literature that are able to describe the evolution of the different species

assuming that the enzymes involved on the reaction process suffer an adsorption process inside LB substrate. Some authors assume that the underlying mechanism occurring during enzymatic degradation is the substrate-enzyme binding described by Michaelis-Menten mechanism (Makarova et al., 2017; Pratto et al., 2016). Other authors propose an adsorption mechanism of the enzymes over LB substrate, a phenomenon that provokes a decrease on enzyme activity (Neto et al., 2013; Scott et al., 2015; Tervasmäki et al., 2017). Although the aforementioned models are able to properly describe the trends of the products and substrate concentrations, they utilize a great number of kinetic parameters, needing of a considerable experimental effort for their validation.

From a different perspective, Tai et al. (2014) proposed a kinetic model to describe the enzymatic reaction based on an epidemic population model. In this statistically-based kinetic approach, authors had established three different populations of substrate: susceptible (able to be hydrolyzed), infected (in which enzymes are bounded to substrate) and removed (not susceptible to react with enzymes) (Tai et al., 2014). Finally, Qi & Wright (2016) and Tsai et al. (2014) determined a kinetic model

based on a reaction scheme with different concurrent reactions, and different inhibition phenomena associated with these reactions. Tsai et al. present a complex kinetic model, including glucose polymerization and the adsorption of the enzymes onto the substrate by means of a Langmuir adsorption model (Tsai et al., 2014). This model is adequate for pure cellulose substrates, as Avicel, but unable to converge with data obtained using barley straw (Tsai et al., 2014). Qi & Wright proposed a simpler model based on a two-step process, in which cellulose is converted to cellobiose prior to the release of the final product, glucose, coupled with a direct conversion of cellulose into glucose. All of the reactions are heavily affected by the presence of acetic acid, acting as an inhibitor (Qi & Wright, 2016).

The objective of this work is to propose and validate a phenomenological kinetic model able to represent the evolution of the main components during cellulose hydrolysis in a complex lignocellulose substrate: PCS. To this end, PCS was analysed to determine its internal structure prior to the kinetic model determination, being subsequently hydrolysed to obtain cellobiose and glucose. Firstly, runs will be performed using an enzymatic

cocktail with a low BG (β -glucosidase) activity, studying apart the cellulose hydrolysis and the glucose production, and combining the kinetic equations in an overall kinetic model. Secondly, the model will be validated by fitting it to data obtained with an industrial cocktail rich in BG activity, where cellobiose is almost inexistent in the liquid phase. This latter step was carried out using previously reported data to fit this newly proposed model (Wojtusik et al., 2016).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Analysis of lignocellulosic biomass

PCS was submitted by the Laboratory of Cellulose and Paper (INIA), Forest Research Center. To obtain it, CS was pre-treated employing an ethanol-water as solvent, using a procedure described elsewhere (Vergara et al., 2018). The pre-treatment process was carried out with a 33% v/v ethanol aqueous solution with 1 % w/w sulphuric acid at 160 °C for 45 minutes, using a ratio of 20 L of ethanol-water mixture per kg CS. PCS obtained has been analysed employing NREL methodology (Sluiter et al., 2006; Sluiter et al., 2008), in order to determine the initial structural composition of PCS. The morphology of initial PCS and solid residues obtained during

enzymatic hydrolysis was determined by scanning electron microscopy (SEM). To avoid the possible interference caused by water, samples were dried with acetone-water mixtures, progressively increasing the percentage of acetone (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 (2 times) % w/w) to avoid changes in the internal structure of the samples. Prior to microscopic observation, samples were plated with gold. During SEM analysis, energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) was employed to determine the elemental composition of several zones of the solids samples, estimating the carbon-oxygen ratio.

2.2. Enzymatic hydrolysis

Celluclast 1.5 L (a kind gift of Novozymes, Denmark) was employed as the enzymatic cocktail, which is obtained from a *Trichoderma reesei* strain. It is well known that *T. reesei* produces an enzymatic mixture with a very low content on β -glucosidase (BG) enzymes, with a huge proportion of endo and exo-glucanases (99 % w/w) versus BG (1% w/w) (Li et al., 2016). All experiments were carried out in a 50 mL round-bottomed flask, with 40 mL of total working volume. Temperature was maintained at 50 °C with a metallic heating jacket, and agitation was fixed at 250 rpm (high enough to overcome

mass transfer limitations) employing a flat-blade overhead impeller. Initial total solids content (Ts) was 10 % (w/w), and pH was fixed initially at 5.9, being controlled by a citrate buffer 50 mM (Sigma-Aldrich, Germany). Four enzyme cocktail concentrations were employed (26.10, 13.05, 6.53 and 2.61 g·L⁻¹, corresponding to 730.8, 365.4, 182.7 and 73.1 EGU). Samples were withdrawn at several experimental times. In order to stop the reaction process, HCl was added to every sample to reduce pH to 0.5. Liquid and solid fractions were separated by centrifugation.

2.3. Analytical methods

Liquid fractions were analysed with an Agilent 1100 series HPLC to determine the concentration of the compounds of interest, employing two different columns: Rezex RHM-Monosaccharide H⁺ (Phenomenex, US) and Rezex RSO-Oligosaccharide Ag⁺ (Phenomenex, US). For the analysis performed with Rezex RHM column, acidic water was employed as mobile phase, with a flow rate of 0.5 mL·min⁻¹ and 80 °C of temperature. Regarding Rezex RSO, deionized water was used as mobile phase, using 0.3 mL·min⁻¹ of flow rate and a temperature of 80 °C. To perform the analysis with RSO column, samples were neutralized with silver carbonate

(Alfa Aesar, US), and filtered prior to analysis. In both cases, a refractive index detector (RID) was employed. Calibration were carried out for both columns employing pure commercial compounds: glucose, xylose, cellobiose, arabinose, furfuraldehyde, 5-hydroxypropionaldehyde (5-HPA) (Sigma-Aldrich, Germany). For the degree of polymerization calibration curve, an oligosaccharide standard solution (Phenomenex, US) was utilized.

To determine the degree of polymerization, a calibration curve for the HPLC analysis of oligosaccharides, retention time of the different compounds observed in the chromatogram obtained after oligosaccharide standard solution analysis with RSO column were compared to the corresponding number of glucose monomer units (GMU). GMU was assigned to every detected peak assuming that glucose, whose retention time is the largest of all glucose based polymers, has one GMU. Also, consecutive peaks had been assigned with an increasing GMU number. As oligosaccharide standard is an hydrolyzed mixture of starch, all of the compounds detected on the chromatography analysis are produced during cellulose degradation.

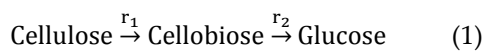
Therefore, it was assumed that only glucose polymers were present on the analysed standard.

Finally, as a part of the cellulose content determination, NREL methods were used to determine carbohydrates remaining in solid fraction (Sluiter et al., 2006; Sluiter et al., 2008).

2.4. Mathematical methods and kinetic model proposal

For the fitting of the models to experimental data, two software programs were employed, both including non-linear regression algorithms (Marquardt, 1963). For simple response fittings, OriginLab was chosen, whereas Aspen Custom Modeler was selected for the kinetic model fitting (multiple response), as described elsewhere (Wojtusik et al., 2016).

Regarding the kinetic model proposed, a two step reaction was employed to describe the mechanism of the reaction, as shown on the following scheme:



In which r_1 describes cellulose degradation process, being catalysed by endo- and exo-glucanases. Considering previously published studies (Sousa Jr. et al., 2011), a Michaelis-Menten kinetic equation with competitive product inhibition was employed to describe the

kinetics of this reaction, according to the following equation.

$$-\frac{dC_{Cel}}{dt} = r_1 = \frac{k_{cat1} \cdot C_{E1} \cdot C_{Cel}}{K_{M1} \cdot \left(1 + \frac{C_C}{K_{P1}}\right) + C_{Cel}} \quad (2)$$

As endo- and exo-glucanases are susceptible to be adsorbed onto the cellulose matrix, the evolution of the effective enzyme activity should be described (Toyosawa et al., 2017; Zhang et al., 2016). Assuming that immobilized enzyme progressively loses the ability to degrade cellulose, and that the adsorption process reaches an equilibrium during enzymatic reaction, a single-step first-order deactivation model with an asymptotic relative activity parameter (β) was used, as indicated in equation (3):

$$C_{E1} = C_{E10} \cdot (\beta + (1 - \beta) \cdot e^{-k_{D1}}) \quad (3)$$

Concerning the second reaction (cellobiose hydrolysis into glucose, catalysed by β -glucosidases), a Michaelis-Menten kinetic equation with acompetitive inhibition due to substrate and double competitive product inhibition was used (Resa & Buckin, 2011).

$$\frac{dC_G}{dt} = r_2 = \frac{k_{cat2} \cdot C_{E2} \cdot C_C}{K_{M2} \cdot \left(1 + \frac{C_G}{K_{P2}}\right)^2 + C_C \cdot \left(1 + \frac{C_C}{K_I}\right)} \quad (4)$$

As with glucanases, BG enzymes deactivate during enzymatic degradation process due to non-productive adsorption and progressive

deterioration (Dutta & Chakraborty, 2016; Vermaas et al., 2015). For this instance, a total first order inactivation process was proposed to describe the activity drop, as it expressed by equation (5).

$$C_{E2} = C_{E20} \cdot e^{-k_{D2}t} \quad (5)$$

Thus, employing equations from (2) to (5), it is possible to fit them to experimental data: the concentrations of the compounds determined by the analytical methods previously described. Once the kinetic parameters were estimated, the kinetic model achieved was employed to describe results previously published (Wojtusik et al., 2016). As in these experiments, the enzymatic cocktail employed has a much greater BG activity, r_2 rate was several orders of magnitude greater than r_1 . This fact has been reflected in two ways: firstly, as r_1 rate is negligible compared to r_2 rate, cellulose hydrolysis controls the global reaction rate. Secondly, as cellobiose is immediately consumed by BG after its release, cellobiose was not detected in these runs. Thus, equation (2) can be rewritten as follows:

$$-\frac{dC_{Cel}}{dt} = r_1 = \frac{k_{cat1} \cdot C_{E1} \cdot C_{Cel}}{K_{M1} + C_{Cel}} \quad (6)$$

Finally, this latter equation will be employed to fit the results published on

a previous work (Wojtusik et al., 2016), where the BG activity is very high.

In order to determine the goodness of fit and the significance of the kinetic constants, several statistical parameters were employed: WRSS, SEE, VE (%), RMSE, F value, and parameters' standard errors, all of which have been thoroughly described elsewhere (Wojtusik et al., 2016).

3. RESULTS and DISCUSSION

3.1. Pre-treated corn stover characterization

Compositional analysis carried out onto PCS has resulted in the following structural carbohydrate composition (all numbers on mass percentage): 39.5 glucanes, 11.2 xylanes, 0.8 arabinanes, 1.5 acetyl groups, 25.6 lignin, 19.3 extractives, and 2.1 ash. Moreover, in Figure 1, SEM images are displayed, while the results obtained with EDS compositional analysis are collected in Table 1. The SEM micrographs clearly show that, even for the latter stages of the reaction, complex structures on the samples remains, such as big fibers; moreover, there are some sections of the fibers and structural zones that have been peeled off as saccharification progress. These observations are coherent with literature, in which the enzymatic degradation of cellulose has been described as a sequential reaction,

where swollenin proteins are able to expand cellulose matrix and separate it from the fiber, enhancing reactions catalysed by glucanases (Dutta & Chakraborty, 2016; Zhang et al., 2016). Additionally, the formation of these new pores and surfaces may enhance the productive and non-productive adsorption of glucanase enzymes, leading to a significative decrease of reaction rate (Eibinger et al., 2014a; Eibinger et al., 2014b). For the purpose of developing the kinetic model proposed in this work, this factor has to be taken into account. Finally, regarding the carbon-oxygen (C-O) ratio, in Table 1, crystalline regions have an elemental composition closer to cellulose (which has a C-O ratio of 1.20, while those regions have values between 1.08 and 1.18). The elemental composition of the crystalline zone evolves slightly from 1.1 to near 1.2, suggesting a reduction in the hemicellulose content (rich in xylose, C-O ratio=1). However, amorphous zones resulted to have much less oxygen: a C-O ratio evolving from 1.50 to 1.40 during the saccharification; probably this is due to a higher content of lignin linked to this type of cellulose (average lignin C-O ratio: 2.8-4.5) and, maybe, a slight delignification along the process.

3.2. Kinetic model fitting

Initially, liquid fraction were analysed in order to determine all the compounds present during the enzymatic reaction. After the analysis of the oligosaccharide standard, a calibration curve that relates retention time and GMU was performed, and it is shown in Figure 2. Additionally, this oligosaccharide standard was compared to the reaction samples, to identify the possible compounds present in the reaction media. Considering the results obtained, the only oligosaccharide detected in significant concentration was cellobiose, whose retention time corresponded to a DP of 2. Although there were more peaks with a slightly higher DP, their tiny area suggested not to consider them to postulate the kinetic model. Therefore, this model should reflect only the temporal evolution of three compounds: cellulose, cellobiose and glucose. A two independent reaction in-series scheme is proposed, so two key compounds have to be selected. Bearing in mind that cellulose and glucose were detected with a low experimental error, both has been used as the aforementioned key compounds.

According to the procedure previously described, experimental results were employed to obtain the kinetic

parameters of the equations (2) to (5). Before any fitting was performed, initial reaction rates were evaluated, as well as the reaction rate at different experimental times in order to obtain the relationship between the enzyme concentration and the aforementioned rate. For this purpose, derivatives of experimental data were estimated at four experimental times (0, 2, 4 and 24 hours). Achieved results are shown in Figure 3. As can be seen, there is a clear linear correlation between the enzyme concentration and the initial reaction rate. However, at higher reaction times, a higher value of enzyme concentration not always means an increase in the reaction rate: hyperbolic or saturating trends replaces the linear trend observed for initial reaction rates. These results indicate that high enzyme concentrations can result in a deep reduction of the specific reaction rate (reaction rate to enzyme concentration ratio) as the process evolves, while, with lower enzyme concentrations, this reduction is relatively lower. So a high number of enzyme molecules can mean a considerable non-productive enzyme-enzyme aggregation and hinder the productive interaction enzyme-substrate, a phenomenon known as “overcrowding”, which reflects in an apparent deactivation, as non-

productive interactions seem to increase with processing time.

Due to the proposed kinetic model has numerous parameters to be evaluated, it is necessary to adopt a two-step approach in order to achieve the most statistically and physically coherent kinetic parameters. Firstly, equation (2), which describes cellulose consumption and degradation into cellobiose, was fitted to experimental results with the objective of getting the best initial parameters to perform the calculation of the second reaction kinetic parameters. Secondly, fixing the values estimated for equation (2), parameters corresponding to the second reaction were calculated. Once a first set of values for all kinetic constants was determined, a final estimation using the whole model to get optimal values for all kinetic parameters was performed.

Whilst the first step of the fitting process was carried out, an important trend of the β parameter was observed. Table 2 collects the values of this parameter calculated for every experiment performed: it can be observed that β adopts two very different values, depending on the enzyme concentration. For the runs with a higher amount of initial enzyme, β reaches a very low value, while for the lower enzyme amounts, this parameter

value is notably higher, suggesting a lower deactivation due to overcrowding in these later cases. In consequence, the different values of the β parameter have been taken into account when fitting the proposed kinetic model to the experimental results.

The results achieved during the fitting to the experimental data are shown in Tables 3 and 4. Likewise, model fitting to experimental evolution of cellulose, cellobiose and glucose are shown in Figure 4. As can be seen, the fitting to the experimental results satisfies statistical criteria, being able the model to precisely reflect the evolution of the different compounds during the enzymatic process. Furthermore, as F value obtained for the fitting was greater than the relevant tabulated F value, the modelled equations satisfy the null hypothesis criterion. On the other side, all the parameters shown on Table 3 had positive values, and with narrow confidence intervals at 95% confidence. If considering the values of the parameters achieved, it is important to state that the inhibition kinetic constants for both reactions (k_{p1} , k_{p2} and k_i) have lower values than the substrate affinity of both described enzymes (reflected in K_{m1} and K_{m2} parameters). This fact suggest an important

inhibitory effect on the reaction rate, especially due to glucose, product of the second reaction, and cellobiose, which exerts a negative influence over the rates of both reactions. Finally, the model involves deactivation for enzymes involved in both reactions. Although this was clearly known for exo and endo-glucanases, where activity loss is ascribe to adsorption into cellulosic matrix (Toyosawa et al., 2017; Zhang et al., 2016), this phenomenon also affects BG enzymes, an aspect that is seldom indicated in literature.

3.3. Kinetic model validation with previously published results

The enzymatic cocktail employed for this work has been reported to have only a small amount of BG enzymes (Li et al., 2016). As this factor leads to a lower cellulose conversion and glucose production, and may modify the effect of the parameters studied in this work, the kinetic model here determined was fitted also to the experimental data of one experiment in which BG enzymes were in excess, previously used to obtain potential and fractal kinetic models (Wojtusik et al., 2016). Therefore, if the kinetic model here achieved is able to properly describe these experimental results, it will be a further evidence that the kinetic model

here proposed is robust enough to describe hydrolysis processes carried out with two different enzymatic cocktails.

The previously published results correspond to a similar solid (PCS, but with a different pre-treatment (acid-diluted pre-treatment) and to a different enzymatic cocktail (Zylase ®, produced by Abengoa) (Wojtusik et al., 2016). However, for these previous experiments, no presence of cellobiose was reported. As Celluclast 1.5 L is a BG-deficient cocktail, it is safe to assume that Zylase ® has more BG activity (probably due to adequate supplements), which would lead to a faster cellobiose degradation, the second reaction of the reaction scheme as it is here proposed. As the reaction rate would be largely increased, therefore overall reaction rate would be controlled by the first depolymerization reaction, which has been described by means of the cellulose evolution (Wojtusik et al., 2016). Thus, the aforementioned evolution was fitted to the first equation of the achieved kinetic model present in this work. The results achieved for this fitting are shown on Table 5 and Figure 5. According to the results shown in Table 5, both statistical and thermodynamical criteria are satisfied,

all of the kinetic parameters had a positive optimal value and a narrow possible value interval at 95% confidence. Also, WRSS, SEE and RMSE have very low values, and %VE is close to 100% (more than 99%). Finally, the F-calculated was superior than F-tabulated value for the adequate degrees of freedom, which fulfil the null hypothesis.

Also, in Figure 5 is also shown the evolution of cellulose concentration for the one experiment carried out in this work with 26.10 g·L⁻¹ initial enzyme. As it can be seen, the kinetic model is able to nicely fit both experiments. What is more, both patterns are very diverse, as the cellulose degradation is faster for the experiments previously published, as expected if BG activity is much higher. Therefore, the kinetic model proposed, with slight changes in the value of some of its parameters, is valid for two different experimental conditions: diverse pre-treated solids and enzyme cocktails. In particular, the kinetic constant k_{cat1} and the Michaelis-Menten constant K_{M1} are identical, considering the standard error, in both cases. The deactivation constant for the depolymerisation enzymes (glucanases) is higher for Celluclast 1.5 L cocktail, indicating a lower stability of the mixture of glucanases from *T. reesei*. On

the other side, the average inhibition constant due to glucose (competitive inhibition) for these enzymes is one order of magnitude higher for Zylase cocktail, showing that these glucanases, are, on average, notably less inhibited by the action of glucose than those from *T. reesei* (Celluclast 1.5 L).

2. CONCLUSIONS

A kinetic model is proposed for the description of cellulose hydrolysis based on a reaction scheme formed by the hydrolysis of cellulose to cellobiose and cellobiose conversion to glucose. Its kinetic parameters were calculated by fitting the model to experimental results obtained when employing PCS substrates with two diverse pretreatments and two enzyme cocktails, with low (Celluclast 1.5L) and high (Zylase) activity of BG. The proposed kinetic model adequately describes the temporal evolution of all compounds involved in both cases. Zylase acting on acid pretreated CS seems to be more stable and less inhibited by glucose during cellulose depolymerization.

3. ACKNOWLEDGEMENTS

The technical assistance of Ms. Ana Vicente, of the Spanish National Centre for Electron Microscopy (ICTS), is

gratefully acknowledged. This work has been supported by MINECO under contracts CTQ2013-45970-C2-1-R, PCIN-2013-021-C02-01 and BSCH-UCM, GR35/10-A 910134.

4. BIBLIOGRAPHY

- Aditiya, H.B., Mahlia, T.M.I., Chong, W.T., Nur, H., Sebayang, A.H. 2016. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **66**, 631-653.
- Aguiar, R.S., Luciano Silveira, M.H., Pitarello, A.P., Corazza, M.L., Ramos, L.P. 2013. Kinetics of enzyme-catalyzed hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, **147**, 416-423.
- Bilal, M., Iqbal, H.M.N., Hu, H., Wang, W., Zhang, X. 2018. Metabolic engineering and enzyme-mediated processing: A biotechnological venture towards biofuel production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **82**, 436-447.
- Dutta, S.K., Chakraborty, S. 2016. Pore-scale dynamics of enzyme adsorption, swelling and reactive dissolution determine sugar yield in hemicellulose hydrolysis for biofuel production. *Scientific Reports*, **6**.
- Eibinger, M., Bubner, P., Ganner, T., Plank, H., Nidetzky, B. 2014a. Surface structural dynamics of enzymatic cellulose degradation, revealed by combined kinetic and atomic force microscopy studies. *FEBS Journal*, **281**(1), 275-290.
- Eibinger, M., Ganner, T., Bubner, P., Rošker, S., Kracher, D., Haltrich, D., Ludwig, R., Plank,

- H., Nidetzky, B. 2014b. Cellulose Surface Degradation by a Lytic Polysaccharide Monooxygenase and Its Effect on Cellulase Hydrolytic Efficiency. *Journal of Biological Chemistry*, **289**(52), 35929-35938.
- Farzad, S., Mandegari, M.A., Guo, M., Haigh, K.F., Shah, N., Görgens, J.F. 2017. Multi-product biorefineries from lignocelluloses: a pathway to revitalisation of the sugar industry? *Biotechnology for Biofuels*, **10**(1), 87.
- Fockink, D.H., Urio, M.B., Sánchez, J.H., Ramos, L.P. 2017. Enzymatic Hydrolysis of Steam-Treated Sugarcane Bagasse: Effect of Enzyme Loading and Substrate Total Solids on Its Fractal Kinetic Modeling and Rheological Properties. *Energy & Fuels*, **31**(6), 6211-6220.
- Kopelman, R. 1988. Fractal Reaction-Kinetics. *Science*, **241**(4873), 1620-1626.
- Li, C., Lin, F., Li, Y., Wei, W., Wang, H., Qin, L., Zhou, Z., Li, B., Wu, F., Chen, Z. 2016. A β -glucosidase hyper-production *Trichoderma reesei* mutant reveals a potential role of cel3D in cellulase production. *Microbial Cell Factories*, **15**(1), 151.
- Makarova, E.I., Budaeva, V.V., Kukhlenko, A.A., Orlov, S.E. 2017. Enzyme kinetics of cellulose hydrolysis of *Miscanthus* and oat hulls. *Biotech*, **7**(5), 317.
- Marquardt, D.W. 1963. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*, **11**(2), 431-441.
- Mika, L.T., Cséfalvay, E., Németh, Á. 2018. Catalytic Conversion of Carbohydrates to Initial Platform Chemicals: Chemistry and Sustainability. *Chemical Reviews*, **118**(2), 505-613.
- Neto, J.M., Garcia, D.d.R., Gomez Rueda, S.M., da Costa, A.C. 2013. Study of kinetic parameters in a mechanistic model for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse subjected to different pretreatments. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **36**(11), 1579-1590.
- Nizami, A.S., Rehan, M., Waqas, M., Naqvi, M., Ouda, O.K.M., Shahzad, K., Miandad, R., Khan, M.Z., Syamsiro, M., Ismail, I.M.I., Pant, D. 2017. Waste biorefineries: Enabling circular economies in developing countries. *Bioresource Technology*, **241**(Supplement C), 1101-1117.
- Pratto, B., de Souza, R.B.A., Sousa, R., da Cruz, A.J.G. 2016. Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugarcane Straw: Kinetic Study and Semi-Mechanistic Modeling. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **178**(7), 1430-1444.
- Qi, F., Wright, M. 2016. A novel optimization approach to estimating kinetic parameters of the enzymatic hydrolysis of corn stover. *AIMS Energy*, **4**(1), 52-67.
- Ravindran, R., Jaiswal, A.K. 2016. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, **199**, 92-102.
- Resa, P., Buckin, V. 2011. Ultrasonic analysis of kinetic mechanism of hydrolysis of cellobiose by β -glucosidase. *Analytical Biochemistry*, **415**(1), 1-11.
- Scott, F., Li, M., Williams, D.L., Conejeros, R., Hodge, D.B., Aroca, G. 2015. Corn stover semi-mechanistic enzymatic

- hydrolysis model with tight parameter confidence intervals for model-based process design and optimization. *Bioresource Technology*, **177**, 255-265.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. 2006. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. *National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO*.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. vol. Version 2010. National Renewable Energy Laboratory, USA.
- Sousa Jr., R., Carvalho, M.L., Giordano, R.L.C., Giordano, R.C. 2011. Recent trends in the modeling of cellulose hydrolysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **28**, 545-564.
- Tai, C., Arellano, M.G., Keshwani, D.R. 2014. Epidemic based modeling of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biotechnology Progress*, **30**(5), 1021-1028.
- Tervasmäki, P., Sotaniemi, V., Kangas, J., Taskila, S., Ojamo, H., Tanskanen, J. 2017. A discretized model for enzymatic hydrolysis of cellulose in a fed-batch process. *Bioresource Technology*, **227**, 112-124.
- Toyosawa, Y., Ikeo, M., Taneda, D., Okino, S. 2017. Quantitative analysis of adsorption and desorption behavior of individual cellulase components during the hydrolysis of lignocellulosic biomass with the addition of lysozyme. *Bioresource Technology*, **234**(Supplement C), 150-157.
- Tsai, C.-T., Morales-Rodriguez, R., Sin, G., Meyer, A.S. 2014. A Dynamic Model for Cellulosic Biomass Hydrolysis: a Comprehensive Analysis and Validation of Hydrolysis and Product Inhibition Mechanisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **172**(6), 2815-2837.
- Vergara, P., Wojtusik, M., Revilla, E., Ladero, M., Garcia-Ochoa, F., Villar, J.C. 2018. Wheat straw fractionation by ethanol-water mixture: Optimization of operating conditions and comparison with diluted sulfuric acid pre-treatment. *Bioresource Technology*, **256**, 178-186.
- Vermaas, J.V., Petridis, L., Qi, X.H., Schulz, R., Lindner, B., Smith, J.C. 2015. Mechanism of lignin inhibition of enzymatic biomass deconstruction. *Biotechnology for Biofuels*, **8**.
- Wojtusik, M., Zurita, M., Villar, J.C., Ladero, M., Garcia-Ochoa, F. 2016. Enzymatic saccharification of acid pretreated corn stover: Empirical and fractal kinetic modelling. *Bioresource Technology*, **220**, 110-116.
- Zhang, H., Chen, L., Lu, M., Li, J., Han, L. 2016. A novel film-pore-surface diffusion model to explain the enhanced enzyme adsorption of corn stover pretreated by ultrafine grinding. *Biotechnology for Biofuels*, **9**(1), 181.

5. TABLES AND FIGURES CAPTIONS

Table 6. EDS results performed on SEM analysed samples

Table 7. Final residual activity (β) value as a function of whole enzyme concentration

Table 8. Kinetic and statistical parameters achieved for the kinetic model fitted to PCS enzymatic saccharification data with *Trichoderma reesei* enzymatic cocktail (Celluclast 1.5 L)

Table 9. Statistical and kinetic parameters of the kinetic model validated with data from a classical enzymatic saccharification of PCS with zylase enzymatic cocktail

Figure 14. SEM captions for initial PCS (1), 2 (2), and 72 (3) hours of reaction, at four different amplifications: 500 nm (A), 200 nm (B), 50 nm (C) and 5 nm (D)

Figure 15. Calibration curve for the polymerization degree (PD=number of glucose units or moieties)

Figure 16. Reaction rate at four different reaction times: 0 hours (black filled circles and black line), 2 hours (black empty circles and dot line), 4 hours (black filled squares and dashed line) and 24 hours (black empty squares with dot-dashed line) versus initial enzyme concentration

Figure 17. Experimental evolution of cellulose (black filled circles), glucose (black empty circles) and cellobiose (black filled squares) versus time modelled evolution of glucose (black continuous line) and glucose (black dashed line), for experiments with 26.10 (A), 13.05 (B), 6.53 (C) and 2.61 (D) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of initial enzyme amount

Figure 18. Evolution of experimental cellulose (black filled circles for previously published results) (Wojtusik et al., 2016), black empty circles for experiment with 26.10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of initial enzyme (-this work-) versus modelled cellulose.

Table 10. EDS results performed on SEM analysed samples

Exp. Time (h)	Region	Carbon (% w/w)	Oxygen (% w/w)	C-O ratio
0	Crystalline	51.0	46.1	1.1
	Amorphous	56.5	36.5	1.5
2	Crystalline	40.8	39.1	1.0
	Amorphous	51.3	43.6	1.2
72	Crystalline	53.2	44.8	1.2
	Amorphous	55.0	39.3	1.4

Table 11. Final residual activity (β) value as a function of whole enzyme concentration

C_{E0} (g·L ⁻¹)	β
26.1	0.09±0.02
13.1	0.08±0.03
6.5	0.30±0.02
2.6	0.32±0.01

Table 12. Kinetic and statistical parameters achieved for the kinetic model fitted to PCS enzymatic saccharification data with *Trichoderma reesei* enzymatic cocktail (Celluclast 1.5 L)

Kinetic parameters		Statistical parameters	
Parameter	Value	Parameter	Value
k_{cat1} (mol·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	$(1.2\pm0.3)\cdot10^{-2}$	WRSS _{cel}	$1.8\cdot10^{-3}$
k_{cat2} (mol·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	$(6\pm1)\cdot10^{-1}$	WRSS _{glu}	$1.8\cdot10^{-4}$
K_{M1} (mol·L ⁻¹)	1.5 ± 0.1	SEE _{cel}	$4.9\cdot10^{-3}$
K_{M2} (mol·L ⁻¹)	$(3\pm1)\cdot10^{-1}$	SEE _{glu}	$1.5\cdot10^{-3}$
K_{P1} (mol·L ⁻¹)	$(1.1\pm0.7)\cdot10^{-2}$	% VE _{cel}	98.1
K_{P2} (mol·L ⁻¹)	$(2.3\pm0.8)\cdot10^{-2}$	% VE _{glu}	99.6
k_i (mol·L ⁻¹)	$(9\pm4)\cdot10^{-5}$	RMSE	$5.0\cdot10^{-3}$
k_{D1} (h ⁻¹)	$(8\pm3)\cdot10^{-2}$	% VE _{TOT}	98.5
k_{D2} (h ⁻¹)	$(4\pm1)\cdot10^{-2}$	F _C / F _T	12810 / 4.2

Table 13. Statistical and kinetic parameters of the kinetic model validated with data from a classical enzymatic saccharification of PCS with zylase enzymatic cocktail

Kinetic parameters		Statistical constants	
Parameter	Value	Parameter	Value
B	0.18±0.03	WRSS _{cel}	1.69·10 ⁻⁵
k _{cat1} (mol·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	(1.19±0.07)·10 ⁻²	SEE _{cel}	1.30·10 ⁻²
k _{D1} (h ⁻¹)	(4.8±0.9)·10 ⁻²	% VE _{cel}	99.07
K _{P1} (mol·L ⁻¹)	0.17±0.05	RMSE	1.24·10 ⁻²
K _{M1} (mol·L ⁻¹)	1.3±0.4	F _C / F _T	10510 / 4.20

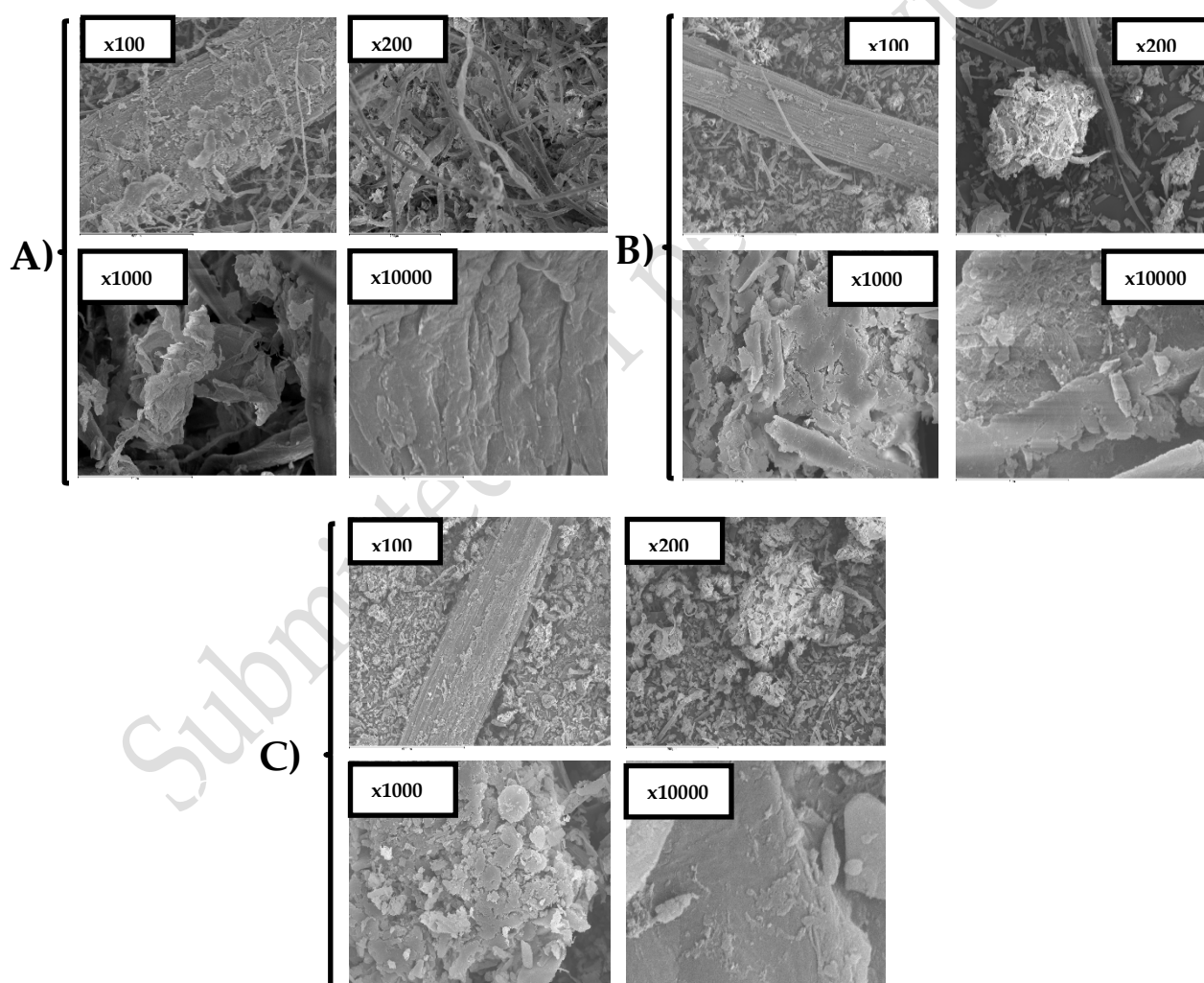


Figure 19. SEM captions for initial PCS (A), 2 (B), and 72 (C) hours of reaction, at four different amplifications: x100, x200, x1000 and x10000

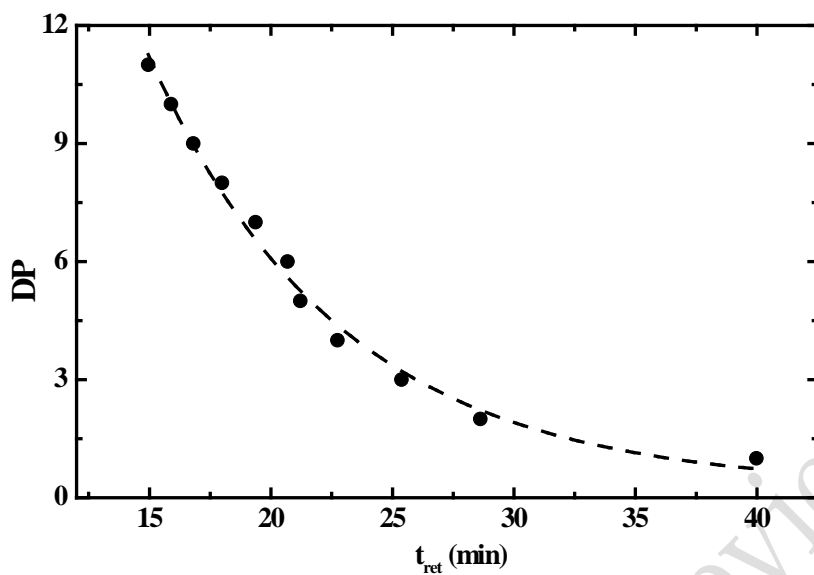


Figure 20. Calibration curve for the polymerization degree (PD=number of glucose units or moieties)

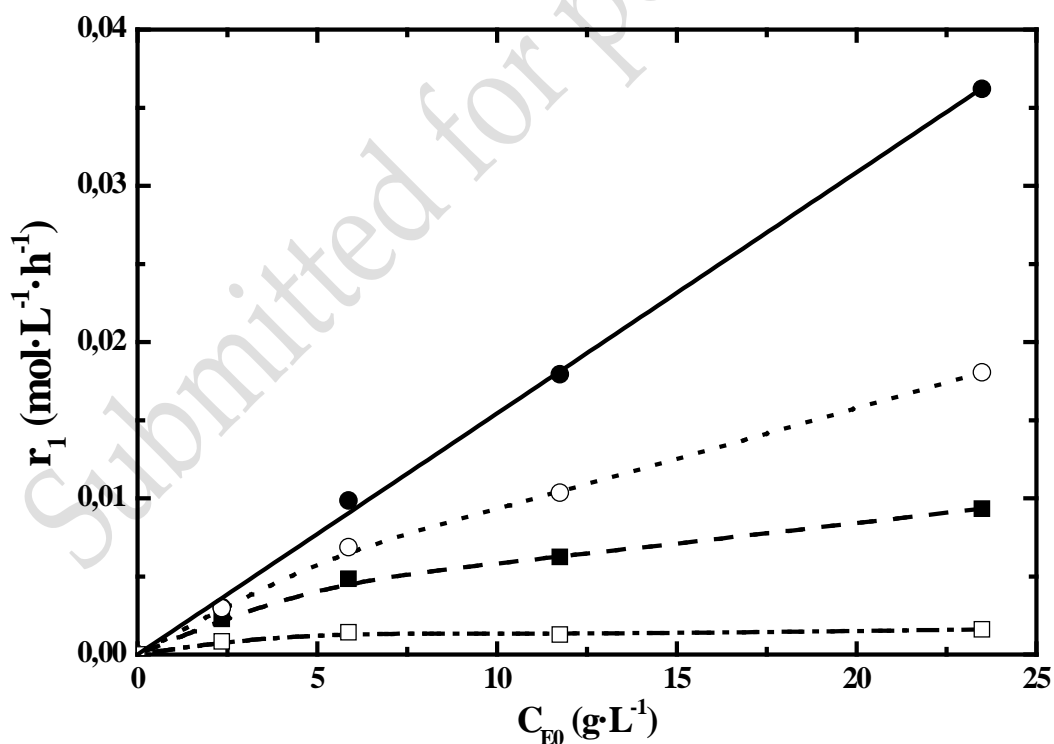


Figure 21. Reaction rate at four different reaction times: 0 hours (● and black line), 2 hours (○ and dot line), 4 hours (■ and dashed line) and 24 hours □ with dot-dashed line) versus initial enzyme concentration

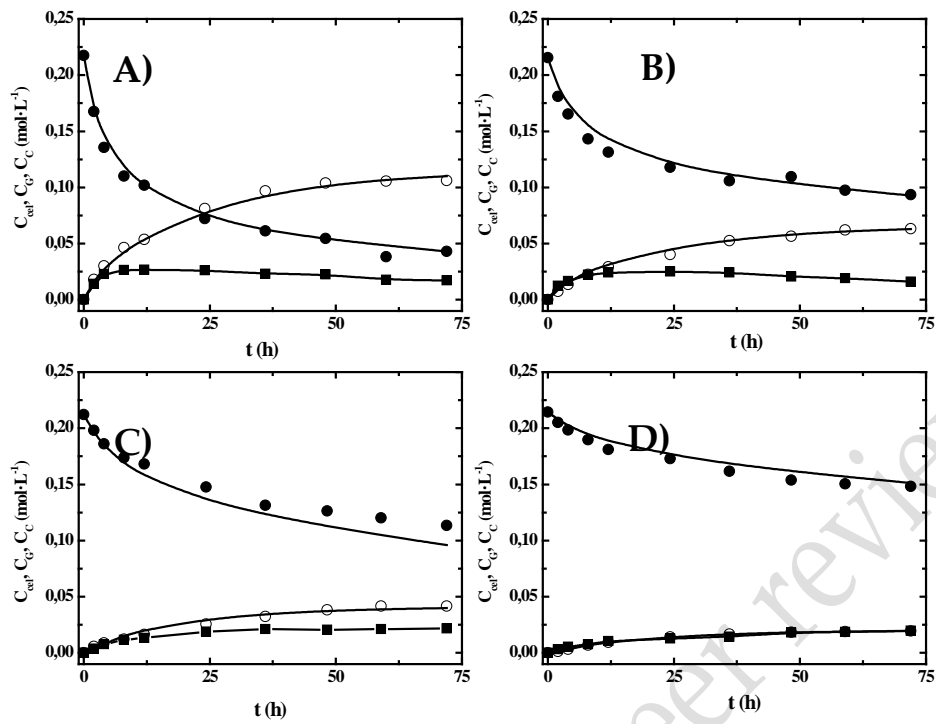


Figure 22. Experimental evolution of cellulose (●), glucose (○) and cellobiose (■) *versus* time modelled evolution of glucose and cellulose (black continuous line) and simulated evolution of cellobiose (black continuous line), for experiments with 26.10 (A), 13.05 (B), 6.53 (C) and 2.61 (D) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of initial enzyme amount

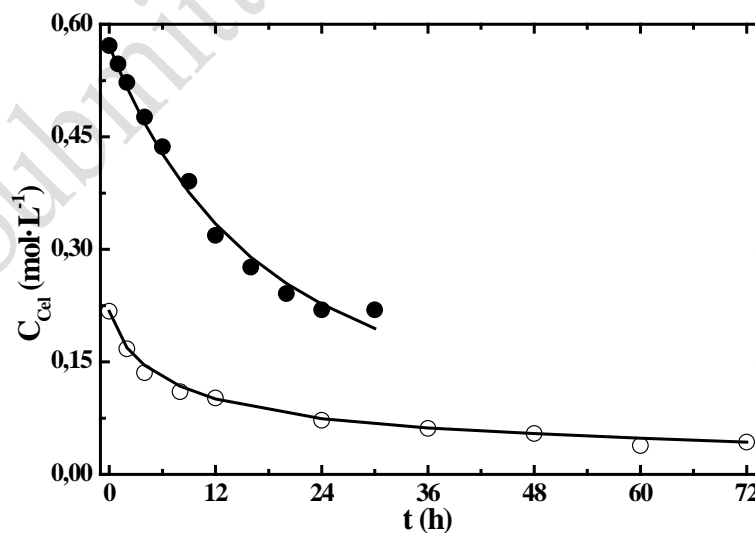


Figure 23. Evolution of experimental cellulose (● for previously published results (Wojtusik et al., 2016), ○ for experiment with $26.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of initial enzyme (–this work–)) *versus* modelled cellulose.